

Liliana Patrícia de Sousa Martins

Efeitos tóxicos subletais de paracetamol em dois níveis de organização  
biológica: *Lemna minor* e *Daphnia magna*

Universidade Fernando Pessoa

Faculdade Ciências da Saúde

Porto, 2013



Liliana Patrícia de Sousa Martins

Efeitos tóxicos subletais de paracetamol em dois níveis de organização  
biológica: *Lemna minor* e *Daphnia magna*

Universidade Fernando Pessoa

Faculdade Ciências da Saúde

Porto, 2013

iii

Liliana Patrícia de Sousa Martins

Efeitos tóxicos subletais de paracetamol em dois níveis de organização  
biológica: *Lemna minor* e *Daphnia magna*

Trabalho apresentado à Universidade Fernando Pessoa,  
como parte dos requisitos de obtenção do grau de  
Mestre em Ciências Farmacêuticas.

---

(Liliana Patrícia de Sousa Martins)

## Sumário

A presença de fármacos e seus metabolitos no compartimento aquático tem sido sistematicamente reportada em estudos de monitorização ambiental. Estas substâncias colocam novos desafios em termos ambientais, visto serem biologicamente ativas, concebidas para exercerem atividade biológica por determinados mecanismos de ação, podendo exibir efeitos deletérios nos organismos aquáticos mesmo em baixas concentrações. Neste sentido, o presente estudo teve como objetivo primordial determinar os efeitos subletais decorrentes da exposição de dois organismos aquáticos (a macrófita *Lemna minor* e o microcrustáceo *Daphnia magna*) a paracetamol. O estudo realizado sugere que o paracetamol representa risco ecotoxicológico para a macrófita *L. minor*, visto que se verificou uma diminuição dos parâmetros somáticos e um aumento significativo do teor em produtos finais da peroxidação lipídica (MDA), indicando a ocorrência de stress oxidativo. Contudo, as concentrações dos pigmentos fotossintéticos mantiveram-se constantes. Após a análise dos resultados obtidos constatou-se que o paracetamol também representa risco ecotoxicológico para *D. magna*. O teste de toxicidade aguda realizado revelou que a concentração de exposição mais elevada afetou significativamente a mobilidade/sobrevivência. O teste de toxicidade crônica revelou alterações significativas no ciclo de vida e na dinâmica populacional deste microcrustáceo. No que concerne às determinações enzimáticas, as atividades das enzimas antioxidantes, CAT e GSTs, não sofreram alterações, indicando que esta espécie possui mecanismos de destoxificação e de defesa antioxidante eficazes.

*Palavras – chave:* fármacos, paracetamol, *Daphnia magna*, *Lemna minor*, efeitos subletais, stress oxidativo.

## **Abstract**

The presence of pharmaceuticals and their metabolites in the aquatic compartment has been consistently reported in studies of environmental monitoring. These substances pose new challenges in environmental terms, because they are biologically active, and are designed to exert biological activity by certain mechanisms of action. However, they can display deleterious effects on aquatic organisms even at low concentrations. In this sense, the present study aimed to determine sublethal effects in two aquatic organisms (macrophyte *Lemna minor* and microcrustacean *Daphnia magna*) after exposure to paracetamol. The study suggests that acetaminophen represents ecotoxicological risk for *L. minor*, because there was a reduction of somatic parameters, and also a significant increase of end products from lipid peroxidation (MDA), indicating the occurrence of oxidative stress. However, the concentration of photosynthetic pigments remained constant. After analyzing the results, it was found that paracetamol also represents ecotoxicological risk to *D. magna*. The acute toxicity test showed that the highest exposure concentration has significantly affected mobility / survival. The chronic toxicity test revealed significant changes in the life cycle and population dynamics of this microcrustacean. Regarding the enzymatic determination, CAT and GSTs remained unchangeable, indicating that this species has effective detoxification mechanisms that constitute an efficient antioxidant defense.

*Key – words:* pharmaceuticals, paracetamol, *Daphnia magna*, *Lemna minor*, sublethal effects, oxidative stress.

## **Agradecimentos**

Ao Prof. Doutor Bruno Nunes gostaria de expressar um profundo reconhecimento pelo apoio, disponibilidade, orientação, motivação e partilha de conhecimentos determinantes na preparação e revisão do presente estudo.

Ao CESAM pelos recursos materiais disponibilizados, aos respetivos docentes, particularmente à Prof<sup>ª</sup> Doutora Sara Antunes pelo apoio, disponibilidade e orientações criteriosas.

À minha família pelo amor, carinho, compreensão, incentivos e por me apoiarem em todas as minhas escolhas.

Ao Rui Barata pela inestimável paciência, companheirismo, carinho e amizade.

Aos meus amigos pela amizade, carinho e entreaajuda prestada ao longo deste percurso académico.

## Índice

I.	Introdução geral.....	1
I. 1.	Fundamentação teórica .....	4
I. 1. 1.	Compostos antropogénicos.....	4
I. 1. 1. 1.	Fármacos como contaminantes ambientais .....	5
I. 1. 2.	Ecotoxicologia e testes ecotoxicológicos .....	9
I. 1. 3.	Biomarcadores de monitorização ambiental.....	13
I. 1. 3. 1.	Biomarcadores de stress oxidativo.....	15
I. 1. 4.	Organismos utilizados em testes ecotoxicológicos .....	17
I. 1. 4. 1.	<i>Lemna minor</i> .....	17
I. 1. 4. 2.	<i>Daphnia magna</i> .....	18
I. 1. 5.	Composto em estudo: paracetamol.....	20
I. 1. 6.	Estudos ecotoxicológicos com paracetamol .....	23
II.	Objetivos do estudo .....	26
III.	Materiais e Métodos .....	27
III. 1.	<i>Lemna minor</i> .....	27
III. 1. 1.	Condições de cultura do organismo-teste .....	27
III. 1. 1. 1.	Luz e temperatura .....	27
III. 1. 1. 2.	Meio de cultura .....	27
III. 1. 1. 3.	Manutenção do organismo-teste .....	28
III. 1. 2.	Teste de exposição crónico .....	28
III. 1. 2. 1.	Determinação do valor de EC <sub>50</sub> .....	28
III. 1. 2. 2.	Análise dos níveis de paracetamol.....	29
III. 1. 3.	Determinações .....	29
III. 1. 3. 1.	Determinação do conteúdo em clorofilas a, b e carotenóides totais	29
III. 1. 3. 2.	Determinação da peroxidação lipídica através da medição do conteúdo em MDA .....	29

III. 1. 3. 3.	Determinação da permeabilidade da membrana .....	30
III. 1. 4.	Análise estatística .....	30
III. 2.	<i>Daphnia magna</i> .....	31
III. 2. 1.	Condições de cultura do organismo-teste .....	31
III. 2. 1. 1.	Luz e temperatura .....	31
III. 2. 1. 2.	Meio de Cultura .....	31
III. 2. 1. 3.	Manutenção do organismo-teste .....	31
III. 2. 2.	Teste de exposição agudo .....	31
III. 2. 2. 1.	Determinação do valor de EC <sub>50</sub> .....	32
III. 2. 2. 2.	Análise dos níveis de paracetamol.....	32
III. 2. 3.	Teste de exposição crónico – avaliação de efeitos do paracetamol ao nível do ciclo de vida .....	32
III. 2. 4.	Determinações da atividade de enzimas antioxidantes.....	33
III. 2. 4. 1.	Determinação da atividade da enzima catalase.....	34
III. 2. 4. 2.	Determinação da atividade das isoenzimas glutathione S-transferases 34	
III. 2. 4. 3.	Determinação da proteína total .....	34
III. 2. 5.	Análise estatística .....	35
III. 2. 6.	Substância – teste.....	35
IV.	Resultados.....	36
IV. 1.	<i>Lemna minor</i> .....	36
IV. 2.	<i>Daphnia magna</i> .....	40
IV. 2. 1.	Teste de exposição agudo .....	40
IV. 2. 2.	Teste de exposição crónico .....	40
IV. 2. 3.	Determinações enzimáticas.....	42
V.	Discussão.....	43
V. 1.	<i>Lemna minor</i> .....	43
V. 2.	<i>Daphnia magna</i> .....	46

V. 2. 1.	Teste de exposição agudo .....	46
V. 2. 2.	Teste de exposição crónico .....	47
V. 2. 3.	Determinações enzimáticas.....	49
VI.	Conclusões.....	52
VII.	Referências Bibliográficas.....	54

## Índice de figuras

Figura 1. Representação esquemática das principais vias de introdução de resíduos farmacêuticos no meio ambiente (Adaptado de Halling-Sorensen <i>et al.</i> , 1998). .....	7
Figura 2. Níveis de organização biológica e resposta aos efeitos de compostos antropogénicos (Adaptado de Magalhães e Filho, 2008). .....	10
Figura 3. Representação esquemática do processo de biotransformação farmacêutica (Adaptado de Newman e Unger, 2003). .....	14
Figura 4. Redução do oxigénio molecular a água durante a respiração aeróbia, ocorrendo a formação de espécies reativas de oxigénio como intermediários (Adaptado de Newman e Unger, 2003). .....	15
Figura 5. Características da espécie <i>Lemna minor</i> (Adaptado de Centre for Ecology & Hydrology, 2004). .....	18
Figura 6. Adulto da espécie <i>Daphnia magna</i> , com as primeiras antenas assinaladas (Adaptado de Tatarazako e Oda, 2007). .....	19
Figura 7. Estrutura química do paracetamol (Adaptado de Bertolini <i>et al.</i> , 2006). .....	20
Figura 8. Representação esquemática das vias de destoxificação do paracetamol em mamíferos, plantas e fungos (Huber <i>et al.</i> , 2009). .....	22
Figura 9. Efeito do acetaminofeno nos parâmetros standard de <i>Lemna minor</i> , biomassa fresca (A) e número de frondes (B). As barras correspondem à média das 10 réplicas e as respetivas barras de erro padrão; * - diferenças significativas em relação ao controlo ( $p < 0,05$ ). .....	36
Figura 10. Efeito do acetaminofeno na permeabilidade membranar de <i>Lemna minor</i> . As barras correspondem à média das 10 réplicas e as correspondentes barras de erro padrão. ....	37
Figura 12. Efeito do acetaminofeno na peroxidação lipídica determinada através da medição dos níveis de TBARS. As barras correspondem à média das 10 réplicas e as correspondentes barras de erro padrão; * - diferenças significativas em relação ao controlo ( $p < 0,05$ ). .....	38

Figura 13. Resultados do teste de toxicidade aguda: número de animais mortos/ imobilizados. As barras correspondem à média das 4 réplicas e, correspondentes barras de erro padrão; * - diferenças significativas em relação ao controlo ( $p < 0,05$ ). .....	40
Figura 14. Resultados do teste de exposição crónico: idade da primeira reprodução (G), número de crias (H), número de ninhadas (I) e crescimento diário (J). As barras correspondem à média das 10 réplicas e, correspondentes barras de erro padrão; * - diferenças significativas em relação ao controlo ( $p < 0,05$ ). .....	41
Figura 15. Resultados do teste de exposição crónico: taxa de crescimento populacional (R). As barras correspondem à média das 10 réplicas e, correspondentes barras de erro padrão; * - diferenças significativas em relação ao controlo ( $p < 0,05$ ). .....	42
Figura 16. Efeito do acetaminofeno na atividade das enzimas CAT e GSTs. As barras correspondem à média das 10 réplicas e, correspondentes barras de erro padrão. ....	42

## **Índice de tabelas**

Tabela 1. Exemplos de estudos ecotoxicológicos com paracetamol. ....	24
--	----

## **Lista de abreviaturas**

ASTM (*American Society for Testing and Materials*)

CAT (Catalase)

COX (ciclooxigenase)

EC<sub>50</sub> (*effective concentration 50*)

EOCs (*Emerging Organic Contaminants*)

ETARs (Estações de Tratamento de Águas Residuais)

FDA (*Food and Drug Administration*)

g.l. (graus de liberdade)

GPX (Glutathione Peroxidase)

GSTs (Glutathione – S - transferases)

GRed (Glutathione Redutase)

I.C. (Intervalo de Confiança)

MDA (Malondialdeído)

LC<sub>50</sub> (*median Lethal Concentration*)

LOEC (*Lowest Observed Effect Concentration*)

NAPQI (N- acetil- *p*- benzoquinoneimina)

NOEC (*No Observed Effect Concentration*)

OECD (*Organization for Economic Co-operation and Development*)

ROS (*Reactive Oxygen Species*)

SOD (Superóxido Dismutase)

TBA (Ácido tiobarbitúrico)

TBARS (*thiobarbituric acid reactive substances*)

TCA (ácido tricloroacético)

US-EPA (*United States Environmental Protection Agency*)

## I. Introdução geral

Em Portugal, a despesa pública com medicamentos e produtos de saúde é uma das mais elevadas entre os países da União Europeia. São diversos os fatores que contribuíram para o aumento da despesa com medicamentos, destacando-se sobretudo o aumento do seu consumo (Furtado e Oliveira, 2011). Um dos aspetos atualmente considerados críticos relativamente ao consumo de medicamentos prende-se com a libertação no ambiente dos seus resíduos após utilização. Tais resíduos possuem características assinaláveis do ponto de vista toxicológico, pelo que é necessário empreender estudos que caracterizem os potenciais efeitos decorrentes da sua presença nas mais diversas matrizes ambientais.

Os fármacos e os seus resíduos (metabolitos ou produtos de degradação) são compostos distintos da maioria das substâncias que estão dispersas pelo ambiente, pois são biologicamente ativos, abrangendo várias classes farmacoterapêuticas e consequentemente com múltiplos mecanismos de ação (Brain *et al.*, 2004b). Geralmente, os mecanismos de destoxificação dos sistemas biológicos convertem os fármacos em metabolitos mais polares e hidrossolúveis, facilitando a excreção através da urina e/ou fezes (Correia, 2012). Este processo genérico de biotransformação, que não é exclusivo de fármacos, conduz à eliminação destas substâncias em fluxos de resíduos urbanos, nomeadamente por intermédio dos esgotos domésticos (Ternes, 1998; Stumpf *et al.*, 1999; Anddreozi *et al.*, 2003; Joss *et al.*, 2005; Xia *et al.*, 2005; Kinney *et al.*, 2006). Neste sentido, o aumento do consumo de fármacos tem contribuído para uma distribuição generalizada desses metabolitos no meio ambiente (Halling-Sorensen *et al.*, 1998; Daughton e Ternes, 1999; Jones *et al.*, 2002; Miao *et al.*, 2002).

Ao contrário dos compostos antropogénicos ditos convencionais (tais como pesticidas, detergentes e combustíveis), os fármacos são eliminados de forma contínua e em baixas concentrações (Halling-Sorensen *et al.*, 1998; Dorne *et al.*, 2007). Nas últimas décadas, muitos resíduos farmacêuticos têm sido detetados em águas superficiais dos Estados Unidos e da Europa, em concentrações na ordem das ng/L e µg/L (Halling-Sorensen *et al.*, 1998; Ternes, 1998; Hirsch *et al.*, 1999; Kolpin *et al.*, 2002). Estes compostos também têm sido detetados em efluentes de esgotos, águas residuais na proximidade de estações de tratamento de águas residuais (ETARs), águas subterrâneas e inclusivamente água de bebida. Os fármacos mais comumente encontrados em

ambientes aquáticos incluem antibióticos, anticonvulsivantes, antipiréticos, citostáticos e hormonas (Yang *et al.*, 2008). Muitos destes fármacos resistem à degradação metabólica e aos processos de tratamento convencionais nas ETARs, e apresentam elevada lipofilia, maximizando a bioacumulação e biomagnificação nos ecossistemas aquáticos e terrestres (Cleuvers, 2003).

A problemática ambiental dos fármacos e seus resíduos encontra-se intimamente ligada aos processos de tratamento e gestão de resíduos. Normalmente, as águas residuais são conduzidas para ETARs, que desempenham um papel fundamental na remoção de compostos antropogénicos. Contudo, em algumas regiões ou mesmo países estas instalações podem não existir, agravando este problema ambiental. Além disso, as taxas de remoção podem diferir de acordo com as características da substância, dos equipamentos e dos processos de tratamentos utilizados (Ternes, 1998; Stumpf *et al.*, 1999; Lindqvist *et al.*, 2005; Roberts e Thomas, 2006).

Os resíduos farmacêuticos encontrados no ambiente aquático ocorrem geralmente na forma de misturas, exibindo potenciais efeitos deletérios em organismos aquáticos (Altenburger *et al.*, 2000; Backhaus *et al.*, 2000; Faust *et al.*, 2001). Estas misturas contam com a presença de variadas classes farmacoterapêuticas, de entre as quais se destacam a dos anti-inflamatórios, analgésicos, e antipiréticos (Ternes, 1998; Stumpf, 1998; Yang *et al.*, 2008; Brandão *et al.*, 2011). O paracetamol, também designado por acetaminofeno (N-acetil-p-aminofenol), é largamente utilizado na terapêutica humana como antipirético e analgésico (Xu *et al.*, 2008). É considerado um dos fármacos mais consumidos por todo o mundo (Yang *et al.*, 2008; Lourenção *et al.*, 2009; Solé *et al.*, 2010). No entanto, alguns estudos sugerem que a sua presença ao nível do ambiente aquático não é totalmente desprovida de efeitos toxicológicos. Inclusivamente, o paracetamol é considerado atualmente como uma das substâncias cujo estudo ecotoxicológico é considerado importante, visto ser uma substância ambientalmente prioritária (Voogt *et al.*, 2009).

Assim, a avaliação dos riscos que estas substâncias colocam para a vida aquática conduziu ao desenvolvimento e implementação de testes de ecotoxicidade (Altenburger *et al.*, 2000; Backhaus *et al.*, 2000; Faust *et al.*, 2001; Brandão *et al.*, 2011). Os testes ecotoxicológicos avaliam efeitos agudos (através de parâmetros como a mortalidade e imobilização) e/ou efeitos crónicos (através de parâmetros como o crescimento ou a

reprodução) em organismos pertencentes a diferentes níveis tróficos, isto é, microrganismos, algas, plantas superiores, invertebrados, peixes e anfíbios (Crane *et al.*, 2006; Santos *et al.*, 2010). Contudo, poucos são os testes ecotoxicológicos que quantificam especificamente os efeitos decorrentes da presença de fármacos, sobretudo efeitos crónicos (Santos *et al.*, 2010).

Na avaliação da perturbação ambiental, por intermédio do desenvolvimento de testes ecotoxicológicos, a determinação das respostas biológicas (biomarcadores) dos organismos é essencial para avaliar os efeitos dos poluentes em vários níveis de organização biológica (Besten, 1998; Livingstone, 2001). Neste âmbito, os testes ecotoxicológicos são uma ferramenta imprescindível para avaliar o impacto que os resíduos farmacêuticos exibem sobre os organismos vivos, os ecossistemas e em última instância, a saúde pública (Santos *et al.*, 2010). Ao permitirem a avaliação de efeitos de agentes xenobióticos em mecanismos fisiológicos e metabólicos complexos, estes testes e a utilização de biomarcadores permitiu ganhar acesso detalhado aos processos que são alvo do exercício de toxicidade. Assim, muito mais do que quantificar efeitos genéricos (ex.: mortalidade), é hoje em dia possível efetuar análises que visam quantificar as alterações em processos biológicos individualizados, que poderão ser conducentes a um conjunto mais vasto de sintomas, com comprometimento da eficácia e desempenho de variados sistemas. Neste sentido, o objetivo primordial do presente trabalho é avaliar os efeitos toxicológicos decorrentes da exposição da planta aquática *Lemna minor* e do microcrustáceo de água doce *Daphnia magna* a paracetamol.

## I. 1. Fundamentação teórica

### I. 1. 1. Compostos antropogénicos

De entre os contaminantes ambientais com maior relevância atual, podem estabelecer-se divisões ou categorias em função das suas propriedades físico-químicas, ou naturezas; assim, é possível distinguir muitos compostos em orgânicos e inorgânicos. No entanto, dadas as suas multiplicidades estruturais, fontes e potenciais efeitos toxicológicos decorrentes, talvez os compostos orgânicos coloquem desafios mais pronunciados. Os compostos orgânicos podem ter origem natural ou antropogénica (que resulta da atividade humana). As suas propriedades químicas e físicas afetam o seu destino no ambiente aquático, que pode ir de uma degradação ambiental quase imediata ou persistir por vários anos ou décadas. Os contaminantes inorgânicos mais comuns incluem compostos como o monóxido de carbono, dióxido de carbono, óxidos de azoto, dióxido de enxofre e, ainda os metais (na sua forma inorgânica) que constituem a maior subclasse destes contaminantes (Newman e Unger, 2003).

Neste ponto, é importante fazer a distinção entre contaminante e poluente, visto que este último é definido como toda a substância que resulta, pelo menos, em parte da atividade humana e, que causa um efeito deletério sobre os organismos vivos (Newman e Unger, 2003). Já um composto antropogénico pode ser definido como uma substância que deriva da atividade humana. Por sua vez, um xenobiótico pode ser descrito como uma substância química ou material estranho a um sistema biológico (Rand e Petrocelli, 1985).

Uma gama extensa de compostos orgânicos é utilizada pela sociedade para vários propósitos, tais como a produção e conservação de alimentos, processos industriais e manufatura de produtos farmacêuticos (Halling-Sorensen *et al.*, 1998; Daughton e Ternes, 1999; Lapworth *et al.*, 2012). Também denominados por EOCs - Compostos Orgânicos Emergentes (do inglês, *Emerging Organic Contaminants*), são particularmente relevantes dado o seu uso contínuo e potencial de toxicidade para a saúde humana e ecossistema aquático (Lapworth *et al.*, 2012).

#### I. 1. 1. 1. Fármacos como contaminantes ambientais

Os fármacos são compostos químicos amplamente utilizados no tratamento, cura, prevenção ou diagnóstico de inúmeras patologias (Herklotz *et al.*, 2010). Estes compostos são biotransformados pelos seres humanos ou animais e, em geral são convertidos em metabolitos mais polares e hidrossolúveis, mais facilmente excretados pela urina e/ ou fezes (Correia, 2012). Este processo conduz à eliminação destas substâncias em fluxo de resíduos urbanos (Ternes, 1998; Stumpf *et al.*, 1999; Andreatozzi *et al.*, 2003; Joss *et al.*, 2005; Xia *et al.*, 2005; Kinney *et al.*, 2006).

Na União Europeia, o consumo de fármacos é substancial e abrange cerca de 3000 substâncias diferentes, enquadradas em classes farmacoterapêuticas diversas, tais como analgésicos, anti-inflamatórios, anticoncepcionais, antibióticos, beta-bloqueadores, dislipidemiantes, anticonvulsivantes, antidepressivos, entre outros. Na medicina veterinária, os antibióticos e anti-inflamatórios constituem as classes de fármacos mais utilizados (Fent *et al.*, 2006).

Na realidade, toneladas de fármacos são produzidas e consumidas anualmente por todo o mundo (Fent *et al.*, 2006; Glassmeyer *et al.*, 2009). Estas substâncias biologicamente ativas são concebidas para atuarem de acordo com determinados mecanismos de ação e para resistirem à inativação metabólica antes de exercerem o seu efeito farmacológico. Todavia, estas propriedades são paradoxalmente responsáveis pela bioacumulação dos seus resíduos nos ecossistemas aquáticos e terrestres (Halling-Sorensen *et al.*, 1998; Fent *et al.*, 2006). Ao contrário dos poluentes convencionais, os resíduos farmacêuticos são libertados continuamente e em concentrações subterapêuticas para o meio ambiente (Halling-Sorensen *et al.*, 1998; Dorne *et al.*, 2007). A comunidade científica está consciente de que a presença destes EOCs pode representar risco para a fauna e a flora aquáticas (Kidd *et al.*, 2007; Pery *et al.*, 2008). Neste sentido, as investigações atuais têm contribuído para o desenvolvimento de técnicas cromatográficas capazes de identificar quantidades vestigiais destes compostos (Ternes *et al.*, 1998; Kolpin *et al.*, 2002). No entanto, uma significativa falta de conhecimento persiste em matéria de interações farmacológicas e toxicológicas que estes compostos possam exercer, daí que a legislação em vigor, tanto nos Estados Unidos da América como na União Europeia, submete novos medicamentos a uma avaliação de impacto ambiental (Santos *et al.*, 2010). Em 1998, a FDA (do inglês, *Food and Drug Administration*) publicou uma

diretriz para a avaliação do risco ambiental de resíduos farmacêuticos que atingem concentrações de 1 g/L no ambiente aquático (FDA, 1998).

A principal via de contaminação ambiental ocorre através da excreção na urina e/ou fezes de compostos na forma nativa ou como metabolitos (Fent *et al.*, 2006). No entanto, existem outros mecanismos de contaminação antropogénica, como os medicamentos de uso veterinário que são excretados através da urina e/ou fezes e, utilizados como fertilizantes na agricultura, ocorrendo a contaminação do ambiente superficial e subterrâneo por escoamento (kay *et al.*, 2005; kemper, 2008; Topp *et al.*, 2008); produtos farmacêuticos utilizados na aquicultura (Fent *et al.*, 2006); compostos usados em meios complementares de diagnóstico, descartados nas suas formas nativas (Santos *et al.*, 2010); por vezes, as famílias descartam os fármacos fora de validade diretamente na rede doméstica (Braund *et al.*, 2009; Persson *et al.*, 2009); aplicação de lamas de ETARs urbanas, hospitalares e industriais em solos agrícolas e florestais (Holm *et al.*, 1995; Fent *et al.*, 2006); descargas poluentes de indústrias farmacêuticas e de hospitais (Holm *et al.*, 1995; Li *et al.*, 2008), entre outros.

Neste ponto, o comportamento e o destino dos produtos farmacêuticos e seus metabolitos no ambiente aquático requer uma maior elucidação (Figura 1).

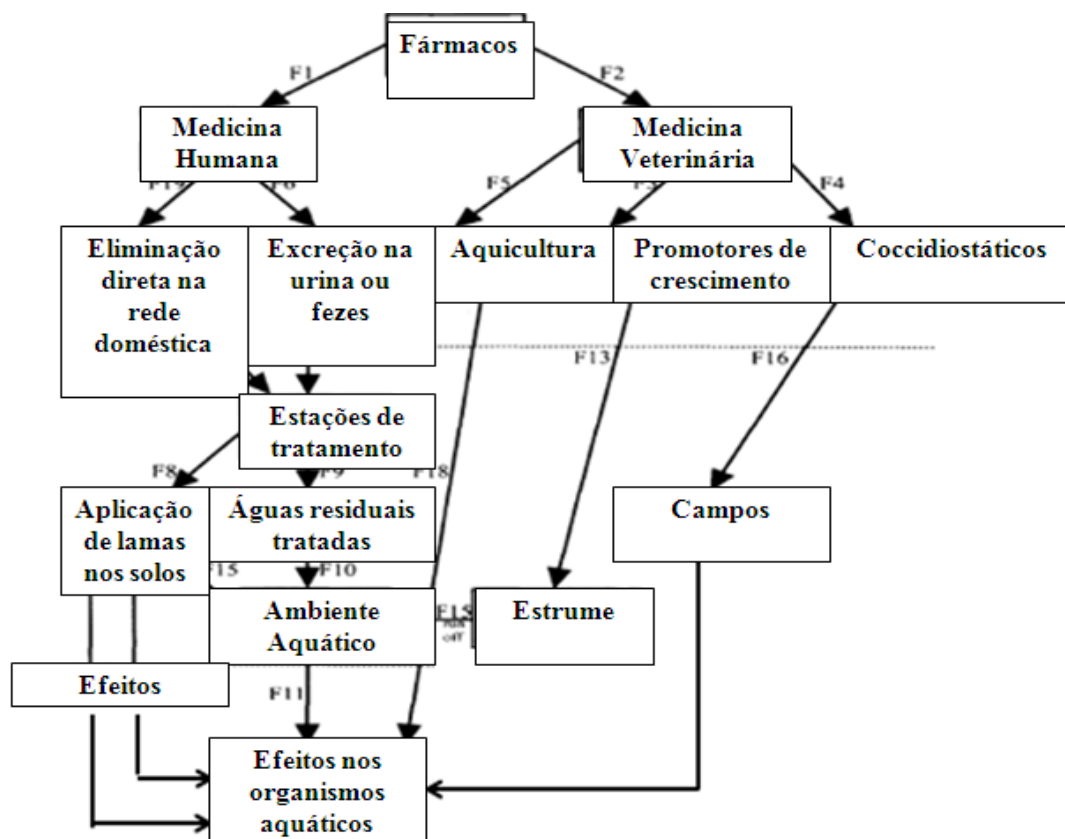


Figura 1. Representação esquemática das principais vias de introdução de resíduos farmacêuticos no meio ambiente (Adaptado de Halling-Sorensen *et al.*, 1998).

Como referido anteriormente, os fármacos e seus metabolitos atingem o meio ambiente por diversos mecanismos, podendo alcançar as águas superficiais e subterrâneas (Halling-Sorensen *et al.*, 1998; Daughton e Ternes, 1999). Geralmente, os resíduos farmacêuticos apresentam baixa volatilidade e considerável polaridade, assim a sua distribuição ocorre maioritariamente por transporte aquoso ou através dos alimentos na cadeia alimentar (Fent *et al.*, 2006). Nas águas de superfície alguns compostos podem sofrer degradação por fotólise (radiação solar) (Boreen *et al.*, 2003).

Normalmente, os efluentes são conduzidos para as ETARs, essenciais na remoção de produtos farmacêuticos. As operações realizadas numa ETAR incluem o tratamento preliminar, primário, secundário e terciário. O tratamento preliminar consiste na remoção de materiais em suspensão, areias e gorduras, com o objetivo de proteger o equipamento utilizado nos tratamentos posteriores (Cheremisinoff, 1996). O tratamento primário é um processo físico ou químico que envolve a decantação de partículas sólidas em suspensão, reduzindo a sua quantidade total em, pelo menos, 50% (Decreto-

lei n.º 152/97). O tratamento secundário envolve geralmente o tratamento biológico. Na literatura encontram-se descritos vários processos de tratamento biológico, mas o sistema de lamas ativadas é o mais utilizado. Neste processo, uma mistura complexa de microrganismos e algas, existentes em reatores arejados, oxidam a matéria orgânica biodegradável em formas menos nocivas (Erijman *et al.*, 2011). O tratamento de águas residuais finaliza com o tratamento terciário, que se baseia geralmente, num processo físico-químico de oxidação com ozono combinado com coagulação/floculação e flotação para a separação de sólidos formados no tratamento secundário. Tendo em conta o uso previsto do meio recetor do efluente, a desinfecção nem sempre é realizada nesta fase (Cheremisinoff, 1996).

No entanto, em algumas regiões ou mesmo países estas instalações podem não existir. As taxas de remoção também podem diferir de acordo com as características físico-químicas das substâncias, equipamentos, processos utilizados, temperatura e condições climáticas (Ternes, 1998; Stumpf *et al.*, 1999; Lindqvist *et al.*, 2005; Roberts e Thomas, 2006).

No que concerne ao paracetamol, em geral, é bem removido. Contudo, nos Estados Unidos da América este analgésico/antipirético foi encontrado no efluente final numa concentração de 10 µg/L (Fent *et al.*, 2006). Alguns estudos sugerem que a sua presença ao nível do ambiente aquático não é totalmente desprovida de efeitos toxicológicos. Assim, a libertação contínua de fármacos e seus metabolitos para o ambiente aquático pode constituir uma ameaça para os organismos aquáticos que são inadvertidamente expostos a concentrações subterapêuticas e misturas sinérgicas destas substâncias (Cleuvers, 2003; Santos *et al.*, 2010). Por este motivo, nas últimas décadas, a comunidade científica tem feito um esforço para avaliar os efeitos a curto e a longo prazo decorrentes da exposição a estes xenobióticos (Nunes *et al.*, 2005). Contudo, poucos são os testes ecotoxicológicos que quantificam especificamente os efeitos decorrentes da presença de fármacos, sobretudo efeitos crónicos (Santos *et al.*, 2010).

### I. 1. 2. Ecotoxicologia e testes ecotoxicológicos

O termo Ecotoxicologia surgiu pela primeira vez em 1969, pelo toxicologista René Truhaut (Truhaut, 1977). Segundo Truhaut (1977), a Ecotoxicologia é definida como a ciência que estuda os efeitos das substâncias naturais ou sintéticas sobre organismos vivos, populações e comunidades, que constituem a biosfera, compreendendo assim as interações das substâncias com o habitat natural dos organismos. Ramade (1977) descreveu esta ciência como o estudo das modalidades de contaminação do ambiente pelos poluentes provenientes da atividade humana, seus mecanismos de ação e seus efeitos sobre os organismos vivos.

Na década de 80, a poluição por metais pesados relacionada com a mineração e fundição, a utilização de agroquímicos e desastres ambientais como Chernobyl e ExxonValdez impulsionaram o estudo e a monitorização dos possíveis efeitos tóxicos de poluentes sobre os ecossistemas (Truhaut, 1977; Rattner, 2009). Neste contexto, o conceito de toxicidade consiste na resposta de um organismo a uma determinada dose de um composto, mantida acima da concentração limite após um período de exposição (Walker *et al.*, 2001). A Ecotoxicologia surgiu, assim, como uma ferramenta indispensável para a monitorização ambiental, baseada na resposta dos organismos a agentes químicos (Azevedo e Chasin, 2003). Ainda na década de 80, as agências ambientais começaram a desenvolver protocolos padronizados utilizando organismos aquáticos (OECD, 1984, 1992, 1998, 2004, 2006; USEPA, 1996, 2002).

Geralmente, os testes toxicológicos que avaliam os efeitos diretos (sobrevivência, reprodução e abundância da espécie) das substâncias químicas sobre os ecossistemas são reprodutíveis, mas os efeitos indiretos, tais como interações entre espécies, são negligenciados. Todavia, a Ecotoxicologia considera relevante a avaliação dos efeitos indiretos (alteração do tipo de presa, por exemplo), tendo em conta vários aspetos como a posição do organismo na cadeia trófica que influencia o nível de biomagnificação (níveis de exposição por ingestão superiores aos que causam mortalidade); além disso, várias espécies alimentam-se mais de um nível trófico. Por esta razão, as interações tróficas apresentam um grande impacto na organização de uma comunidade e podem definir a sensibilidade de uma espécie a um agente tóxico (Preston, 2002; Schmitt – Jansen *et al.*, 2008).

Os fármacos constituem uma das classes de agentes tóxicos mais importantes, dado o seu uso indiscriminado e atividade biológica. Além disso, alguns compostos resistem à degradação metabólica e são lipófilos. Estes dois fatores contribuem para a acumulação destas substâncias nos tecidos animais e, conseqüentemente podem exibir efeitos nocivos mesmo em baixas concentrações (Halling-Sorensen *et al.*, 1998, Daughton e Ternes, 1999, Jones *et al.*, 2002; Miao *et al.*, 2002, Nunes *et al.*, 2008). A exposição simultânea a vários compostos pode ainda causar efeitos tóxicos sinérgicos (Cleuvers, 2003). Assim, a avaliação destes efeitos no ambiente aquático é de extrema importância, dado o contínuo lançamento de contaminantes ambientais. Por este facto, nas últimas décadas têm sido propostos inúmeros bioindicadores e organismos para a avaliação do risco potencial destes compostos em ambientes aquáticos (Nunes *et al.*, 2005).

Os testes ecotoxicológicos avaliam efeitos observados após a exposição a compostos antropogénicos, a fim de antever uma resposta nos sistemas biológicos (Figura 2), estabelecendo uma curva dose-resposta (Magalhães e Filho, 2008). A curva dose-resposta representa a relação entre a dose e a proporção da população exposta que manifesta um efeito mensurável (Magalhães e Filho, 2008). Os testes ecotoxicológicos podem ser agudos (ensaios de curta duração) ou crónicos (ensaios de longa duração) (Santos *et al.*, 2010) e são realizados sob condições estáticas, semi-estáticas ou em fluxo contínuo (Newman e Unger, 2003; Magalhães e Filho, 2008).

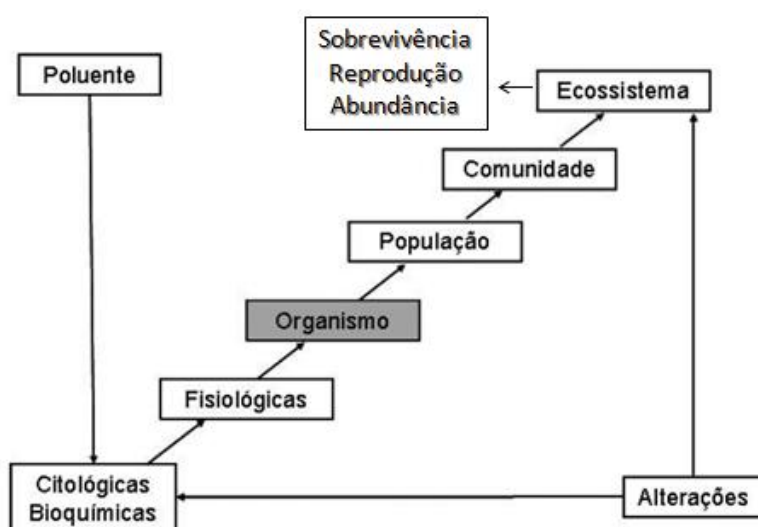


Figura 2. Níveis de organização biológica e resposta aos efeitos de compostos antropogénicos (Adaptado de Magalhães e Filho, 2008).

Os fármacos são avaliados quanto à toxicidade aguda por testes padronizados de curta duração, normalmente de acordo com o estabelecido nas diretrizes da OECD - Organização de Cooperação e Desenvolvimento Económico (do inglês, *Organisation for Economic Co-operation and Development*), utilizando organismos vivos, tais como algas, invertebrados e peixes (Fent *et al.*, 2006). Estes ensaios avaliam uma resposta rápida e severa dos organismos vivos a um estímulo, em geral por um período máximo de 96 horas (Rand e Petrocelli, 1985). Os efeitos observados abrangem a mortalidade e o estado de imobilidade em invertebrados, que antecede a letalidade. A LC<sub>50</sub> - Concentração Letal Média (do inglês, *median lethal concentration*) ou a EC<sub>50</sub> - Concentração Efetiva Média (do inglês, *effective concentration 50*) são determinadas por estes ensaios e, correspondem à concentração de composto que causa mortalidade ou imobilidade em 50% dos organismos expostos (Magalhães e Filho, 2008). Além disso, os dados de toxicidade aguda são valiosos na monitorização de efluentes industriais com o desígnio de minimizar o impacto ambiental (Santos *et al.*, 2010).

Os estudos de efeitos agudos predominam sobre os crónicos, provavelmente devido à complexidade experimental envolvida nestes (Santos *et al.*, 2010). Neste último caso, os efeitos observados podem incluir parâmetros como o crescimento, reprodução e o desenvolvimento de ovos (Magalhães e Filho, 2008; Santos *et al.*, 2010). Os organismos são expostos continuamente por longos períodos de tempo ou mesmo durante todo o seu ciclo de vida (Fent *et al.*, 2006). Estes ensaios dependem diretamente do desenvolvimento prévio de testes de curta duração, visto que as concentrações subletais (concentrações que permitem a sobrevivência mas afetam as funções biológicas) são calculadas a partir da LC<sub>50</sub> (Magalhães e Filho, 2008). Além disso, permitem o cálculo da NOEC - concentração de efeito não observado (do inglês, *No Observed Effect Concentration*), concentração de agente tóxico considerada segura, e da LOEC - concentração de efeito observado (do inglês, *Lowest Observed Effect Concentration*) (Magalhães e Filho, 2008).

Porém, os testes ecotoxicológicos apresentam algumas limitações. No ambiente aquático, os compostos antropogénicos podem sofrer interações e transformações (diluição, fotodegradação ou biodegradação, por exemplo), estando presentes em concentrações subletais (Magalhães e Filho, 2008). Por outro lado, os ensaios são

realizados em organismos individuais, sendo necessário efetuar extrapolações para descrever os efeitos nos seguintes níveis de organização biológica (Fent *et al.*, 2006).

Apesar dos obstáculos supracitados, a avaliação ecotoxicológica constitui uma ferramenta imprescindível para a detecção de ecotoxicidade em ambientes aquáticos, visto que os seus instrumentos de análise permitem sinalizar os riscos potenciais de inúmeros compostos antropogénicos.

### I. 1. 3. Biomarcadores de monitorização ambiental

Os organismos aquáticos são expostos, continuamente, a inúmeras substâncias que podem induzir efeitos deletérios (Livingstone, 2001). Na avaliação da perturbação ambiental, a determinação das respostas biológicas (biomarcadores) por intermédio de testes ecotoxicológicos é recomendável para avaliar os efeitos dos poluentes em diferentes níveis de organização biológica (Besten, 1998; Livingstone, 2001). A exposição a poluentes gera uma situação de stress nos organismos vivos e induz uma cascata de respostas biológicas que em teoria, servem como biomarcadores (van der Oost *et al.*, 2003).

Os biomarcadores podem ser definidos como qualquer resposta fisiológica, bioquímica, histológica, morfológica e comportamental, induzida por um contaminante ambiental a nível individual. Assim, as alterações biológicas induzidas em níveis de organização mais elevados - população, comunidade e ecossistema - são considerados também bioindicadores (Walker *et al.*, 2001). Nos anos 80, o conceito de biomarcador encontrava-se associado à medicina humana, sendo útil para o estabelecimento de diagnósticos médicos (Jemec *et al.*, 2010). No início da década de 90, verificou-se um aumento significativo do número de publicações científicas sobre a utilização de biomarcadores em estudos ambientais (Walker, 1992; Peakall, 1994).

Uma série de classificações de biomarcadores têm sido propostas. Contudo, a mais utilizada classifica os biomarcadores como biomarcadores de exposição, que detetam e quantificam o composto ou seus metabolitos, mas não dão informação sobre o grau de efeito adverso; biomarcadores de efeito, que detetam as alterações biológicas, mensuráveis em amostras ou sistemas biológicos; e biomarcadores de suscetibilidade, que apontam variações na capacidade de metabolização por polimorfismos nas enzimas envolvidas na biotransformação de xenobióticos (Timbrell, 1998; Walker *et al.*, 2001). Contudo, na literatura encontram-se descritas outras classificações que incluem os biomarcadores de neurotoxicidade (Peakall, 1992), de stress oxidativo (Livingstone, 2001), de genotoxicidade, endócrinos, histológicos, entre outros.

Neste contexto, a atividade das enzimas envolvidas na destoxificação de xenobióticos pode ser usada como biomarcador, assim como os metabolitos resultantes do processo

de biotransformação (Livingstone, 1991). O processo genérico de biotransformação pode contribuir para a eliminação, destoxificação, sequestro, redistribuição ou bioativação dos xenobióticos. Geralmente, os metabolitos são mais hidrossolúveis do que os fármacos que lhes deram origem, sendo facilmente excretados pela urina e/ou fezes. Contudo, este processo pode conduzir à bioativação, isto é, o metabolito resultante apresenta maior toxicidade do que o composto pai (Newman e Unger, 2003). As reações de bioconversão (Figura 3) são categorizadas em reações de fase I, que compreendem reações de oxidação, redução e hidrólise, que aumentam ligeiramente a polaridade do composto, mas expõem ou introduzem grupos funcionais; e, reações de fase II ou de conjugação com aminoácidos, sulfatos, ácido glucurónico, glutatona (Santos *et al.*, 2010), que requerem normalmente a ligação aos grupos funcionais expostos ou adicionados durante a fase I do metabolismo.

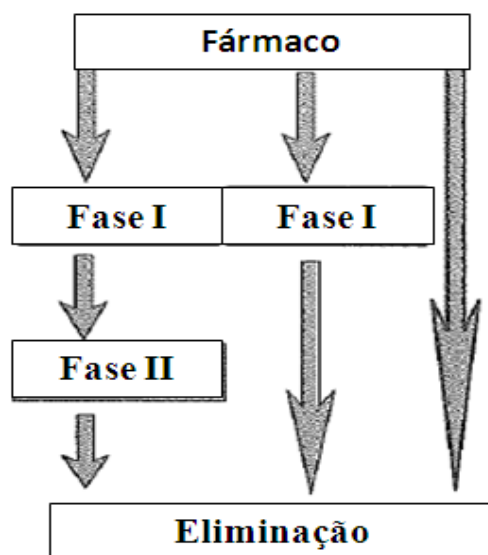


Figura 3. Representação esquemática do processo de biotransformação farmacêutica (Adaptado de Newman e Unger, 2003).

O uso de biomarcadores em Ecotoxicologia apresenta inúmeras vantagens, tais como o baixo custo, simplicidade dos procedimentos, aplicabilidade sob diferentes condições teste e sensibilidade a um elevado número de poluentes (Timbrell, 1998). Além disso, esta ferramenta não se limita a quantificar os níveis ambientais dos poluentes, fornecendo informações pertinentes sobre os mecanismos de toxicidade e respostas biológicas, mensuráveis nos organismos vivos e em amostras biológicas (van der Oost

*et al.*, 2003). Na seleção do biomarcador mais apropriado é necessário ter em linha de conta as características do organismo-teste, as condições laboratoriais, a via de exposição, a duração do teste, as concentrações de exposição e a alteração biológica esperada (Timbrell, 1998; Nunes *et al.*, 2008).

### I. 1. 3. 1. Biomarcadores de stress oxidativo

No metabolismo normal existe um equilíbrio entre as ROS - espécies reativas de oxigénio (do inglês, *Reactive Oxygen Species*) e os mecanismos de defesa antioxidante. A redução do oxigénio molecular a água durante a respiração aeróbia cria um potencial de stress oxidativo (Figura 4). Assim, o conceito de stress oxidativo define-se como uma condição biológica caracterizada por um desequilíbrio entre a produção das ROS e a sua destoxificação. A presença excessiva de ROS conduz a danos oxidativos dos componentes celulares (inativação enzimática, degradação proteica, danos nos ácidos nucleicos e peroxidação lipídica), encontrando-se associada a patologias e ao envelhecimento (Beckman e Ames, 1998; Drew e Leeuwenburgh, 2002; Barata *et al.*, 2005).

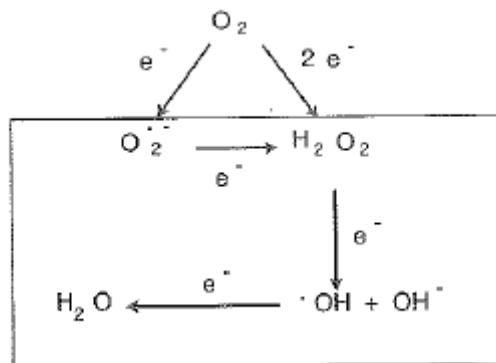


Figura 4. Redução do oxigénio molecular a água durante a respiração aeróbia, ocorrendo a formação de espécies reativas de oxigénio como intermediários (Adaptado de Newman e Unger, 2003).

As ROS incluem o radical anião superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), o peróxido de hidrogénio ( $H_2O_2$ ) e radical hidroxilo ( $\cdot OH$ ). Os organismos vivos desenvolveram duas estratégias para minimizar o dano oxidativo: a produção/ingestão pela dieta de compostos redutores, tais como vitaminas (C e E), catecolaminas, glutatona, ácido úrico (Newman e Unger, 2003); e a expressão de enzimas antioxidantes, como a superóxido dismutase (SOD),

catalase (CAT), glutationa peroxidase (GPx), glutationa redutase (GRed) e as isoenzimas glutationa – S – transferases (GSTs) (Barata *et al.*, 2005). Os xenobióticos podem causar danos direta ou indiretamente nos mecanismos de defesa antioxidante, contribuindo para o aumento da produção de ROS (Newman e Unger, 2003). Assim, o stress oxidativo ocorre perante a debilidade dos sistemas de defesa antioxidante, aumento da produção de ROS e incapacidade em reparar danos oxidativos celulares (Dorval e Hontela, 2003).

Neste contexto, o uso de biomarcadores em Ecotoxicologia tornou-se uma ferramenta imprescindível para avaliar os efeitos decorrentes da exposição de organismos vivos a inúmeros poluentes. Dentre os biomarcadores mais utilizados, os de stress oxidativo assumem uma posição de liderança nos ensaios de monitorização ambiental (Nunes *et al.*, 2006). Para a avaliação de parâmetros de stress oxidativo, recorre-se ao estudo da atividade das enzimas antioxidantes, tais como a SOD, CAT, GPX, GRed e GSTs (Nunes *et al.*, 2006). A SOD é responsável pela destoxificação do anião superóxido em peróxido de hidrogénio. A CAT reduz o peróxido de hidrogénio em água e oxigénio molecular (Brandão *et al.*, 2011). A GPX está envolvida na destoxificação do peróxido de hidrogénio e produtos resultantes da peroxidação lipídica. A GRed intervém na conversão da forma oxidada da glutaciona (Nunes *et al.*, 2006), novamente à sua forma reduzida e biologicamente ativa. As GSTs constituem um grupo de isoenzimas que intervêm na destoxificação de xenobióticos através da conjugação de metabolitos tóxicos com a glutaciona (Blanchette *et al.*, 2007). O processo de conjugação é de extrema importância, visto que permite a remoção de compostos reativos eletrofílicos, permitindo a proteção de proteínas e ácidos nucleicos (Nunes *et al.*, 2006).

O stress oxidativo induz a peroxidação lipídica das estruturas biológicas. Assim, a extensão da peroxidação lipídica pode ser determinada através da medição dos níveis de TBARS - espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (do inglês, *thiobarbituric acid reactive substances*), que correspondem maioritariamente ao malondialdeído (MDA) (Nunes *et al.*, 2006), produto do processo de degradação peroxidativa de lípidos membranares (Ortega-Villasante *et al.*, 2005).

#### I. 1. 4. Organismos utilizados em testes ecotoxicológicos

O consumo contínuo de fármacos representa uma ameaça potencial para a saúde pública, embora ainda seja difícil avaliar os efeitos de exposição sobre a saúde humana (Daughton e Ternes, 1999; Zwiener *et al.*, 2001; Stackelberg *et al.*, 2004). Assim, para a realização de testes de ecotoxicidade é necessário proceder à seleção de um organismo–teste. Dentre os organismos–teste utilizados mais frequentemente destacam-se: os microorganismos (para avaliação, por exemplo, do risco de resistência a antibióticos), algas e plantas superiores, invertebrados, peixes e anfíbios, representando os mais diversos ecossistemas e níveis tróficos (Crane *et al.*, 2006; Magalhães e Filho, 2008).

Os critérios de seleção de espécie abrangem: a abundância e disponibilidade; o cosmopolitismo da espécie; o conhecimento da sua biologia, fisiologia e hábitos alimentares; estabilidade genética e uniformidade das populações; baixo índice de sazonalidade; sensibilidade constante e apurada; facilidade de manipulação em laboratório (Rand e Petrocelli, 1985). A sensibilidade de um organismo pode manifestar-se ao nível bioquímico, fisiológico, morfológico e comportamental. E, depende não só do parâmetro monitorizado, como do nível nutricional do organismo, da idade, sexo, fase de desenvolvimento, características genéticas e condições ambientais (Magalhães e Filho, 2008).

Todavia, torna-se difícil encontrar uma espécie que satisfaça todos estes critérios, pelo que assim existem espécies padronizadas. Em estudos ecotoxicológicos mais abrangentes, é recomendada a utilização de, no mínimo, três espécies representativas de níveis tróficos diferentes, com o intuito de aumentar a probabilidade de obter uma resposta (Baun *et al.*, 1999).

##### I. 1. 4. 1. *Lemna minor*

A *Lemna minor*, vulgarmente designada por lentilha, é uma macrófita aquática da família *Lemnaceae*, que é constituída por um elevado número de espécies e quatro géneros distribuídos por todo o mundo (OECD, 2006). As macrófitas são seres autotróficos que constituem grande parte da biomassa do ambiente aquático e proporcionam uma importante fonte de carbono para a restante biosfera aquática (Greenberg *et al.*, 1992).

A sua aparência e taxonomia têm sido exaustivamente descritas. A *L. minor* apresenta frondes flutuantes ou submersas e uma raiz muito fina, raramente produz flores e reproduz-se através da produção de novas frondes (Figura 5). As plantas mais jovens tendem a ser mais claras, têm raízes mais curtas e duas a três frondes de diferentes tamanhos (OECD, 2006).



Figura 5. Características da espécie *Lemna minor* (Adaptado de Centre for Ecology & Hydrology, 2004).

A *L. minor* é uma espécie representativa de áreas temperadas e uma das plantas mais utilizadas em testes de ecotoxicidade dado o seu pequeno tamanho e a sua estrutura simples, reprodução assexuada e tempo de geração curto (OECD, 2006). Devido a variações interespecíficas, apenas são válidas comparações de sensibilidade para a mesma espécie (OECD, 2006; Hanson e Arts, 2007; Teodoroviæ *et al.*, 2011).

Em Ecotoxicologia, os bioensaios com *L. minor* apresentam como objetivo primordial a avaliação da fitotoxicidade de xenobióticos (Aliferis *et al.*, 2009). Atualmente, o ensaio ecotoxicológico para macrófitas aquáticas padronizado pela OECD, “*Lemna sp. Growth Inhibition Test*” é o único teste utilizado para avaliação do risco (OECD, 2006).

#### I. 1. 4. 2. *Daphnia magna*

*Daphnia magna* (género *Crustacea* e ordem *Cladocera*) é um microcrustáceo de água doce com cerca de 2,5 mm de comprimento (Koivisto, 1995), vulgarmente designado por pulga-da-água, e que se encontra em quase todos os corpos de água permanentes e alimenta-se de plâncton por filtração (Heckmann *et al.*, 2007; Tatarazako e Oda, 2007). Este crustáceo apresenta um único olho e dois pares de antenas utilizadas para a

locomoção (Figura 6). O tórax e abdômen encontram-se protegidos por uma carapaça que sofre muda diária (Tatarazako e Oda, 2007).



Figura 6. Adulto da espécie *Daphnia magna*, com as primeiras antenas assinaladas (Adaptado de Tatarazako e Oda, 2007).

Geralmente, *D. magna* reproduz-se por partenogênese cíclica, o que fornece seres geneticamente idênticos aos ascendentes. A partenogênese permite a rápida expansão da população de dáfrias. Perante condições ambientais desfavoráveis, tais como a escassez de alimentos e elevada densidade populacional, altera o modo de reprodução assexuada para sexuada (Hobaek e Larsson, 1990; Kleiven *et al.*, 1992).

No ambiente aquático, este microcrustáceo ocupa uma posição de relevo na cadeia alimentar, visto que constitui parte da dieta de peixes e predadores invertebrados. Como se alimenta de algas desempenha um papel importante no controlo da qualidade da água (Dodson e Hanazato, 1995).

A *Daphnia magna* é considerada uma das espécies aquáticas mais sensíveis aos compostos antropogénicos, sendo por isso amplamente utilizada em ensaios ecotoxicológicos. Além disso, apresenta características que facilitam a sua manipulação laboratorial, como o pequeno tamanho, tempo de geração curto, elevada fecundidade e uniformidade genética (reprodução assexuada) (Koivisto, 1995; Baird e Barata, 1998).

No âmbito da toxicologia ambiental, a utilização desta espécie de água doce como organismo padrão é adotada por entidades reguladoras internacionais, como a US-EPA (*United States Environmental Protection Agency*), ASTM (*American Society for Testing and Materials*), e é incluída igualmente como organismo-teste em diretrizes da OCDE (ASTM 1988, 2004; USEPA, 2002; OECD, 1998, 2004).

### I. 1. 5. Composto em estudo: paracetamol

O paracetamol (denominação comum internacional), também designado por acetaminofeno (N-acetil-p-aminofenol), foi sintetizado por Morse em 1878 e utilizado clinicamente por Von Mering em 1887 (Morse, 1878; Von Mering, 1893). A sua utilização foi descartada em favor da fenacetina. Mas estudos efetuados por Brodie e Axelrod (1948) conduziram à redescoberta do paracetamol como analgésico de substituição da fenacetina devido à nefrotoxicidade que esta exibia. Desde então, o paracetamol tornou-se num dos fármacos mais populares e amplamente utilizados em todo o mundo para o tratamento da dor e febre e, é provavelmente o mais prescrito em crianças (Pandolfini e Bonati, 2005).

O paracetamol é uma amida aromática acetilada (Figura 7) utilizada na terapêutica humana como antipirético e analgésico e desprovido de ação anti-inflamatória (Xu *et al.*, 2008).

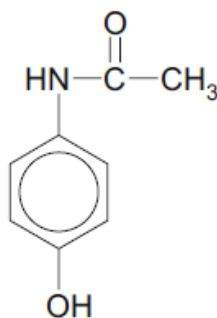


Figura 7. Estrutura química do paracetamol (Adaptado de Bertolini *et al.*, 2006).

O seu mecanismo de ação não está totalmente esclarecido. Contudo, encontra-se documentado que as propriedades analgésicas e antipiréticas do paracetamol se podem dever à inibição de uma isoforma da ciclooxigenase (COX) do sistema nervoso central, como a COX-3, na conversão do ácido araquidónico em prostaglandinas (eicosanóides) (Rang *et al.*, 2008). À semelhança dos mamíferos, nos invertebrados a síntese de eicosanóides também pode ser inibida (Hayashi *et al.*, 2008).

Em doses terapêuticas, cerca de 90% do paracetamol sofre metabolização hepática formando conjugados com o ácido glucurónico e o ião sulfato (Jaeschke e Bajt, 2006;

Xu *et al.*, 2008). Em condições normais, menos de 10% do paracetamol é metabolizado pelas isoenzimas do citocromo P450, sobretudo as CYP 2E1, 1A2 e 3A4, resultando na formação de um intermediário hepatotóxico, o N-acetil-p-benzoquinoneimina (NAPQI). Este intermediário é conjugado com a glutathiona reduzida do *pool* intracelular, permitindo assim a sua destoxificação (Xu *et al.*, 2008). Em caso de sobredosagem ou baixos níveis de glutathiona, o NAPQI livre rapidamente se liga covalentemente ao grupo tiol de proteínas celulares e induz uma série de eventos, tais como a oxidação de lípidos membranares e fragmentação de DNA e RNA, resultando na morte da célula (Jaeschke *et al.*, 2003; Jaeschke e Bajt, 2006; Xu *et al.*, 2008; Parolini *et al.*, 2010).

De acordo com o estudo efetuado por Huber *et al.* (2009), nas plantas as principais vias de destoxificação do paracetamol são a glicosilação e a oxidação com posterior conjugação do NAPQI com a glutathiona (Figura 8). Os metabolitos produzidos em maior quantidade e os considerados mais estáveis são os conjugados com glucose (Bartha *et al.*, 2010). Comparativamente com os mamíferos, a conjugação com a glutathiona representa apenas uma pequena porção dos metabolitos produzidos (Schröder e Collins, 2002; Huber *et al.*, 2009).

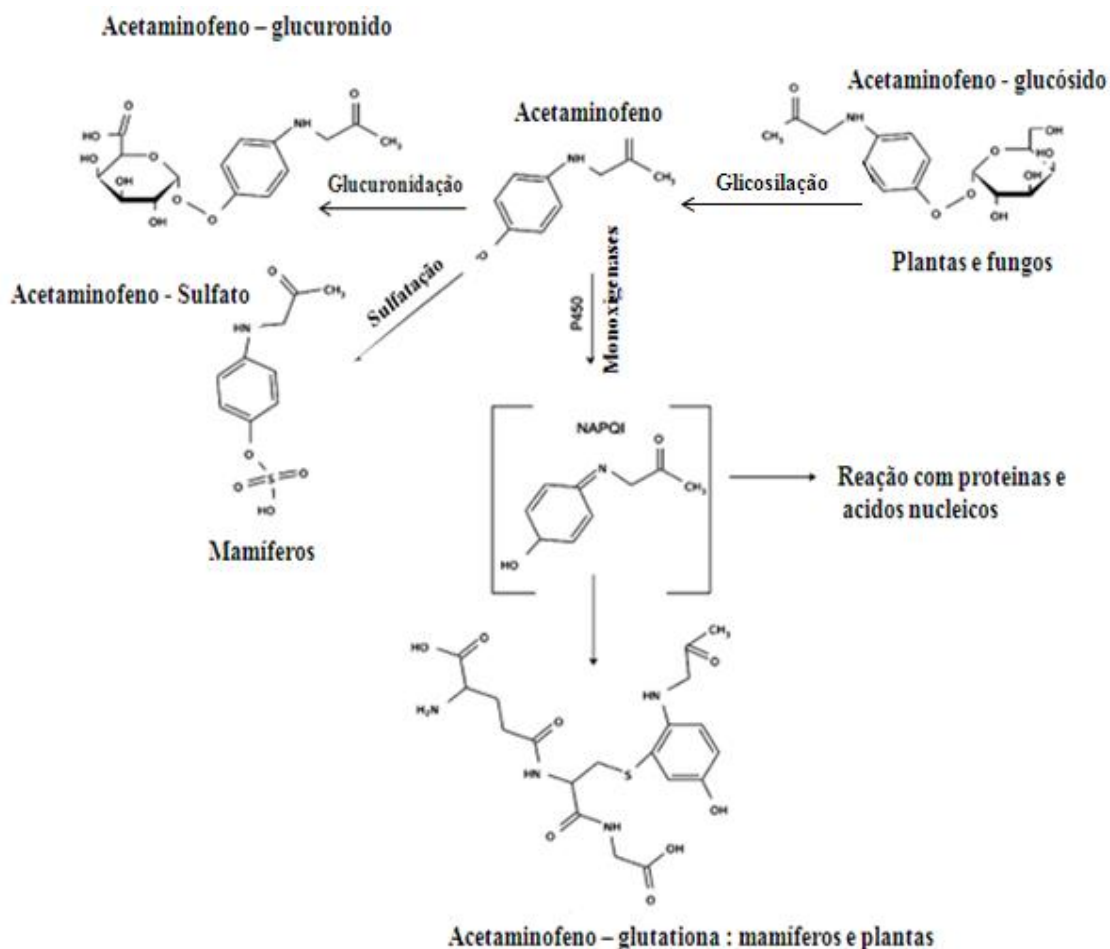


Figura 8. Representação esquemática das vias de detoxificação do paracetamol em mamíferos, plantas e fungos (Huber *et al.*, 2009).

Na maior parte dos organismos, o metabolismo oxidativo é mediado pelas isoenzimas do citocromo P450. Todavia, esta grande família de isoenzimas não se encontra bem desenvolvida em invertebrados aquáticos, contribuindo para diferenças significativas nos ensaios de exposição a xenobióticos (Snyder, 2000).

O mecanismo de toxicidade do paracetamol contribui para o stress oxidativo dos organismos expostos, devido à formação de um radical oxidante altamente reativo. O stress oxidativo desencadeia um conjunto de respostas adaptativas nos sistemas protetores, a modificação de macromoléculas e, em última instância, lesões tecidulares. Estes indicadores permitem avaliar as respostas biológicas dos organismos, sendo por isso utilizados como biomarcadores de exposição ao paracetamol (Livingstone, 2001; Nunes *et al.*, 2006, 2008).

#### I. 1. 6. Estudos ecotoxicológicos com paracetamol

Tal como foi já referido, o paracetamol é largamente utilizado na terapêutica humana como antipirético e analgésico (Xu *et al.*, 2008). É considerado seguro e constitui um dos fármacos mais consumidos por todo o mundo (Yang *et al.*, 2008; Lourenção *et al.*, 2009; Solé *et al.*, 2010). No entanto, alguns estudos sugerem que a sua presença ao nível do ambiente aquático não é totalmente desprovida de efeitos toxicológicos, podendo exibir efeitos hepatotóxicos em animais e seres humanos numa situação de sobredosagem (Jaeschke *et al.*, 2003; Jaeschke e Bajt, 2006; Xu *et al.*, 2008). Inclusivamente, o paracetamol é considerado atualmente como uma das substâncias cujo estudo ecotoxicológico é considerado importante (Voogt *et al.*, 2009). Esta amida aromática acetilada tem sido encontrada em concentrações de 6 µg/L em efluentes de ETARs Europeias (Ternes, 1998), de 10 µg/L em águas naturais dos Estados Unidos (Kolpin *et al.*, 2002) e acima de 65 µg/L no rio Tyne (Robert e Tomas, 2006), Reino Unido.

Assim, a avaliação dos riscos para a vida aquática conduziu ao desenvolvimento e implementação de testes de ecotoxicidade (Altenburger *et al.*, 2000; Backhaus *et al.*, 2000; Faust *et al.*, 2001; Brandão *et al.*, 2011). De acordo com os estudos ecotoxicológicos de Henschel *et al.* (1997), realizados em algas, embriões de peixes, bactérias e invertebrados, o paracetamol é considerado prejudicial para os organismos aquáticos.

Neste âmbito, foi realizada uma pesquisa bibliográfica com recurso a artigos científicos de revistas da especialidade, com o intuito de reunir informação pertinente sobre estudos ecotoxicológicos realizados com paracetamol. Essa informação encontra-se organizada na tabela que se segue, mostrando os valores das EC<sub>50</sub> ou LC<sub>50</sub> para cada ensaio (Tabela 1).

Tabela 1. Exemplos de estudos ecotoxicológicos com paracetamol.

<b>Espécie</b>	<b>Endpoint</b>	<b>Dados ecotoxicológicos</b>	<b>Referência</b>
<i>Vibrio fischeri</i>	EC <sub>50</sub> (30 minutos)	650 mg/L	Henschel <i>et al.</i> , 1997
<i>Vibrio fischeri</i>	EC <sub>50</sub> (15 minutos)	567, 5 mg/L	Kim <i>et al.</i> , 2007
<i>Daphnia magna</i>	EC <sub>50</sub> (48 horas, imobilização)	9,2 mg/L	Kühn <i>et al.</i> , 1989
<i>Daphnia magna</i>	EC <sub>50</sub> (24 horas)	40,814 mg/L	Lilius <i>et al.</i> , 1995
<i>Daphnia magna</i>	EC <sub>50</sub> (imobilização)	50 mg/L	Henschel <i>et al.</i> , 1997
<i>Daphnia magna</i>	EC <sub>50</sub> (48 horas, imobilização)	30,1 mg/L	Kim <i>et al.</i> , 2007
<i>Daphnia magna</i>	EC <sub>50</sub> (96 horas, imobilização)	26,6 mg/L	Kim <i>et al.</i> , 2007
<i>Daphnia magna</i>	NOEC (21 dias)	5,72 mg/L	Kim <i>et al.</i> , 2012
<i>Oryzias latipes</i>	LC <sub>50</sub> (48 horas)	> 160 mg/L	Kim <i>et al.</i> , 2007
<i>Oryzias latipes</i>	LC <sub>50</sub> (96 horas)	> 160 mg/L	Kim <i>et al.</i> , 2007
<i>Oryzias latipes</i>	Diminuição da sobrevivência juvenil (30 dias pós-eclosão)	95 mg/L	Kim <i>et al.</i> , 2012
<i>Scenedesmus subspicatus</i>	EC <sub>50</sub> (72 horas)	134 mg/L	Henschel <i>et al.</i> , 1997

Efeitos tóxicos subletais de paracetamol em dois níveis de organização biológica: *Lemna minor* e *Daphnia magna*

<i>Tetrahymena pyriformis</i>	EC <sub>50</sub> (inibição do crescimento)	112 mg/L	Henschel <i>et al.</i> , 1997
<i>Danio rerio</i>	LC <sub>50</sub> (48 horas)	378 mg/L	Henschel <i>et al.</i> , 1997
<i>Corbicula fluminea</i>	LOEC (Atividade das GSTs, 96 horas e 28 dias)	532,78 mg/L, 30,98 µg/L	Brandão <i>et al.</i> , 2011
<i>Lemna gibba</i>	EC <sub>10</sub> (7 dias)	>1,0 mg/L	Brain <i>et al.</i> , 2004 a

## II. Objetivos do estudo

A presença de fármacos e seus metabolitos no compartimento aquático tem sido sistematicamente reportada em estudo de monitorização ambiental. Contudo, poucos são ainda os estudos que quantificam os efeitos tóxicos decorrentes da sua presença. Neste sentido, o presente estudo teve como objetivo primordial determinar os efeitos toxicológicos decorrentes da exposição de *Lemna minor* e de *Daphnia magna* a paracetamol. Assim, para atingir o objetivo principal definiram-se como objetivos específicos:

Determinar em *L. minor*:

- a) a  $EC_{50}$  em termos de número de frondes e biomassa fresca;
- b) a peroxidação lipídica através da análise do conteúdo em MDA;
- c) a quantificação do conteúdo em pigmentos fotossintéticos;
- d) a determinação da permeabilidade membranar.

Determinar em *D. magna*:

- 1) a  $EC_{50}$  em ensaio ecotoxicológico agudo;
- 2) a avaliação de perturbações ao nível do ciclo de vida em ensaio ecotoxicológico crónico;
- 3) e determinação em termos da atividade de enzimas antioxidantes (CAT e GSTs).

### III. Materiais e Métodos

#### III. 1. *Lemna minor*

##### III. 1. 1. Condições de cultura do organismo-teste

A qualidade e a uniformidade das plantas selecionadas para o ensaio têm uma influência significativa nos resultados obtidos. De acordo com as orientações da OECD (2006), o material vegetal deve provir de uma monocultura saudável composta por colónias com duas a cinco frondes, sem lesões visíveis ou descoloração e livre de contaminação por outros organismos, tais como algas e protozoários. As plantas devem ser mantidas em condições de cultura adequadas (luz, temperatura, meio e pH). Neste estudo, as colónias utilizadas obedeceram a estes requisitos, sendo provenientes de monoculturas do Laboratório de Ecotoxicologia, do Centro de Estudos do Ambiente e do Mar (Aveiro).

##### III. 1. 1. 1. Luz e temperatura

As culturas e os recipientes do ensaio foram mantidos juntos em câmaras com uma intensidade de luz de 85-135  $\mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$ , o equivalente a 6500-10000 lux e, sem arejamento artificial durante a manutenção e o ensaio (OECD, 2006).

A temperatura manteve-se por volta dos  $24 \pm 2$  °C. O pH do meio manteve-se aproximadamente a  $6,5 \pm 1,5$  unidades (OECD, 2006).

##### III. 1. 1. 2. Meio de cultura

Neste estudo, o meio de cultura utilizado foi o meio Steinberg (Razinger *et al.*, 2008), constituído por macro e microelementos essenciais para a manutenção e crescimento das culturas de *L. minor*. Os elementos são essencialmente reagentes laboratoriais adicionados a água desionizada (OECD, 2006). Assim sendo, o meio foi obtido pela diluição de oito soluções stock em água desionizada preparadas a partir dos seguintes compostos químicos:  $\text{KNO}_3$  (350 mg/L),  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  (295 mg/L),  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (90 mg/L),  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  (12,60 mg/L),  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (100 mg/L),  $\text{H}_3\text{BO}_3$  (120  $\mu\text{g/L}$ ),  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (180  $\mu\text{g/L}$ ),  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (44  $\mu\text{g/L}$ ),  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  (180  $\mu\text{g/L}$ ),  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (760  $\mu\text{g/L}$ ) (OECD, 2006).

Esta diluição foi efetuada num recipiente adequado para autoclavagem, com cerca de 1800 mL de água desionizada. Esterilizou-se o meio por autoclavagem a 121 °C durante 20 minutos e, por fim adicionou-se uma última solução stock que não é passível de ser esterilizada por autoclavagem (OECD, 2006).

### III. 1. 1. 3. Manutenção do organismo-teste

Os organismos foram mantidos em meio fresco sob condições de assepsia por 7 dias antes de iniciar o ensaio (OECD, 2006).

### III. 1. 2. Teste de exposição crónico

Este estudo seguiu as orientações da OECD, *OECD Guidelines for the Testing of Chemicals* desenvolvido para a *Lemna minor* (OECD, 2006).

Foram usadas 9 frondes de *L. minor* para cada concentração e tratamento controlo e posteriormente, foram colocadas em recipientes de 100 mL previamente autoclavados. Uma solução stock de paracetamol de 1000 mg/L foi preparada em água destilada. As concentrações testadas foram 62,5 mg/L; 125 mg/L; 250 mg/L; 500 mg/L e 1000mg/L, sendo estas soluções preparadas a partir da solução stock e meio Steinberg. A gama de concentrações selecionada tem por base os ensaios preliminares efetuados. Os ensaios foram realizados em triplicado.

As condições de incubação foram controladas de acordo com as orientações da OECD (2006) durante os 7 dias de exposição.

#### III. 1. 2. 1. Determinação do valor de EC<sub>50</sub>

Este ensaio permitiu determinar o número de frondes, a área total, a biomassa fresca e calcular a EC<sub>50</sub>.

Após a determinação do valor de EC<sub>50</sub> foram testadas as concentrações subletais 22,5 mg/L, 45 mg/L e 90 mg/L de acordo com as orientações da OECD (2006).

### III. 1. 2. 2. Análise dos níveis de paracetamol

As concentrações de paracetamol das soluções stock e das soluções de exposição foram confirmadas através de uma versão adaptada do método colorimétrico descrito por Shihana *et al.* (2010).

### III. 1. 3. Determinações

#### III. 1. 3. 1. Determinação do conteúdo em clorofilas a, b e carotenóides totais

Os pigmentos fotossintéticos foram extraídos do material vegetal com etanol a 96% e a concentração destes foi determinada por espectroscopia UV-VIS (Lichtenthaler, 1987).

Para tal as amostras foram congeladas e, posteriormente fragmentadas com o auxílio de uma tesoura. Posteriormente transferiram-se 5 mg de material vegetal para tubos de eppendorf e adicionou-se 1 mL de etanol 96% a cada amostra. Agitaram-se as amostras no vórtex e foram incubadas à temperatura ambiente durante a noite. No dia seguinte, as amostras foram agitadas no vórtex e mediram-se as absorvâncias a 470 nm, 648,6 nm, 664,2nm e 750 nm (Lichtenthaler, 1987).

#### III. 1. 3. 2. Determinação da peroxidação lipídica através da medição do conteúdo em MDA

O MDA é um dos produtos resultantes da degradação peroxidativa dos lípidos membranares (Ortega-Villasante *et al.*, 2005). Assim sendo, procedeu-se ao ajuste da técnica de determinação de MDA reportada por Buege e Aust (1978).

Cada uma das amostras foi triturada em 600 µL de ácido tricloroacético (TCA) em almofariz de porcelana refrigerado, responsável pela precipitação de proteínas. Os tecidos vegetais triturados foram transferidos para tubos de eppendorf e colocados em banho de gelo. Em seguida, adicionaram-se 600 µL de ácido tiobarbitúrico (TBA) e colocaram-se as amostras em banho de água fervente durante 10 minutos. O TBA forma um complexo com o MDA cuja absorvância é determinada a 535 nm.

### III. 1. 3. 3. Determinação da permeabilidade da membrana

A permeabilidade da membrana é determinada através da medição da condutividade. A integridade da membrana vegetal é determinada como a percentagem de permeabilidade a eletrólitos, medindo a condutividade antes e depois de ferver as amostras durante 20 minutos (ASTM, 2004). Para tal, cada amostra de tecido vegetal foi colocada em 5 ml de água destilada durante 24 horas.

### III. 1. 4. Análise estatística

Os resultados deste estudo ecotoxicológico foram comparados por intermédio de uma análise de variância unifatorial, seguida de um teste de Dunnet para discriminar diferenças significativas relativamente ao tratamento controlo. Para o cálculo da  $EC_{50}$ , efetuou-se o método de Probit (OECD, 2006).

### III. 2. *Daphnia magna*

#### III. 2. 1. Condições de cultura do organismo-teste

Os animais utilizados na cultura monoparental de *D. magna* não devem apresentar sinais de stress, tais como elevada mortalidade, atraso na produção da primeira ninhada e estarem descolorados. As condições de incubação (luz, temperatura e meio) devem ser apropriadas e controladas; os animais empregues para o desenvolvimento deste teste ecotoxicológico foram neonatos, com uma idade inferior a 24 horas (OECD, 2004). As crias utilizadas neste estudo cumpriram estes requisitos, sendo também provenientes de monoculturas do Laboratório de Ecotoxicologia, do Centro de Estudos do Ambiente e do Mar (Aveiro).

##### III. 2. 1. 1. Luz e temperatura

A temperatura foi mantida entre os 18 °C e os 22 °C ( $\pm 1$ ). Os animais foram expostos a 16 horas de luz em recipientes sem arejamento (OECD, 2004).

##### III. 2. 1. 2. Meio de Cultura

Neste estudo, o meio de cultura utilizado foi o Meio ASTM hardwater, constituído por macro e microelementos essenciais para a manutenção dos organismos. O meio foi obtido pela diluição de três soluções stock em água desionizada preparadas a partir dos seguintes compostos químicos: Ca(OH)<sub>2</sub> (30 mg/L), CaCO<sub>3</sub> (12 mg/L), NaHCO<sub>3</sub> (192 mg/L), CaSO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O (120 mg/L), MgSO<sub>4</sub> (120 mg/L), KCl (8 mg/L) (Barry e Meehan, 2000).

##### III. 2. 1. 3. Manutenção do organismo-teste

Os neonatos foram mantidos em meio fresco, os recipientes de ensaio não foram arejados e não foi fornecido alimento durante o período de exposição (OECD, 2006).

#### III. 2. 2. Teste de exposição agudo

Este estudo seguiu as orientações descritas na norma OECD 202 (OECD, 2004) da Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Económico.

Foram utilizados 5 animais com menos de 24 horas de idade para cada tratamento, e colocados em tubos de ensaio com um volume final de 10 mL. A solução stock de paracetamol de 10 mg/L foi preparada em água destilada. As concentrações testadas foram 3,0 mg/L; 3,3 mg/L; 3,7 mg/L; 4,0 mg/L; 4,4 mg/L; 4,9 mg/L; 5,4 mg/L; 5,9 mg/L e 6,5 mg/L, sendo estas soluções preparadas a partir da solução stock e meio ASTM hardwater. Esta gama de concentrações foi selecionada tendo por base a concentração de 9,2 mg/L reportada por Kühn *et al.* (1989) e os ensaios preliminares realizados. Os ensaios foram realizados em quadruplicado.

As condições de incubação foram controladas de acordo com as orientações da OECD (2004) durante 48 horas de exposição.

#### III. 2. 2. 1. Determinação do valor de EC<sub>50</sub>

Este ensaio permitiu determinar a imobilidade dos organismos causada pela exposição a diferentes concentrações de paracetamol, de modo a calcular o valor de EC<sub>50</sub>. Neste estudo obteve-se uma EC<sub>50</sub> um pouco abaixo da reportada por Kühn *et al.* (1989).

Após a determinação da EC<sub>50</sub>, foram testadas as concentrações subletais 0,79 mg/L, 1,78 mg/L e 4,00 mg/L de acordo com as orientações da OECD (2006).

#### III. 2. 2. 2. Análise dos níveis de paracetamol

As concentrações de paracetamol das soluções stock e das soluções de exposição foram confirmadas através de uma versão adaptada do método colorimétrico descrito por Shihana *et al.* (2010).

#### III. 2. 3. Teste de exposição crónico – avaliação de efeitos do paracetamol ao nível do ciclo de vida

O desenho experimental para efetuar este ensaio crónico seguiu as orientações da guideline 211 da OECD (OECD, 1998).

Foram utilizados 10 animais com menos de 24 horas de idade, para cada tratamento, e colocados em recipientes de ensaio de 50 mL. A solução stock de paracetamol de 1000 mg/L foi preparada em água destilada. As concentrações testadas foram 0,53 mg/L; 0,79

mg/L; 1,2 mg/L; 1,7 mg/L; 2,7 mg/L; 4 mg/L, sendo estas soluções preparadas a partir da solução stock e meio ASTM hardwater (OECD, 1998).

As condições de incubação foram controladas de acordo com as orientações da OECD (1998) durante 21 dias de exposição. Os organismos foram acompanhados diariamente, com observações do seu estado e contagem dos neonatos. O meio foi renovado 3 vezes por semana, sendo que em cada renovação os neonatos foram retirados e contados, o que caracteriza este ensaio como semi-estático. Os organismos foram alimentados diariamente com algas vivas *Pseudokirchneriella subcapitata* (suspensão cultivada no laboratório, sob condições controladas; Stein, 1973) e extrato de algas (OECD, 1998).

### III. 2. 4. Determinações da atividade de enzimas antioxidantes

Para determinar a atividade de enzimas antioxidantes em *D. magna*, procedeu-se à realização de um ensaio de toxicidade aguda de acordo com as orientações OECD (OECD, 2004).

As concentrações de paracetamol testadas foram 0,79 mg/L; 1,78 mg/L; 4,00 mg/L. Para preparar estas soluções, foi obtida uma solução stock de paracetamol de 25 mg/L, que foi preparada em água destilada, e posteriormente diluída para conseguir as concentrações acima. Os ensaios foram realizados em quadruplicado, utilizando 60 organismos – teste por réplica, dando um total de 960 organismos expostos.

Após um período exposição de 48 horas, os organismos expostos foram isolados em tubos de eppendorf e procedeu-se ao seu imediato congelamento a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

De modo a efetuar as análises das atividades enzimáticas, foi necessário descongelar as amostras gradualmente em banho de gelo. Os organismos foram homogeneizados em 1 mL de tampão fosfato 50 mM, pH=7 com Triton X-100 0,1% e, em seguida procedeu-se à centrifugação das amostras a 15000G durante 10 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$  (Nunes *et al.*, 2008). O sobrenadante de cada amostra foi dividido em alíquotas de 400  $\mu\text{L}$  para as determinações enzimáticas e o restante para a quantificação da proteína total e, congelado de imediato a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

#### III. 2. 4. 1. Determinação da atividade da enzima catalase

A atividade da enzima CAT foi determinada pela diminuição da absorvância a 240 nm devido à decomposição do  $H_2O_2$  em água e  $O_2$  (Aebi, 1984). Para maximizar o ensaio, efetuou-se uma diluição de 1:2 em tampão fostato 50 mM, pH 7,0, realizando-se 2 leituras por amostra. A absorvância das amostras foi monitorizada espectralmente a 240 nm durante 30 segundos. A atividade da enzima foi expressa em  $\mu\text{mol } H_2O_2$  consumida por minuto por mg de proteína.

#### III. 2. 4. 2. Determinação da atividade das isoenzimas glutathione S-transferases

As isoenzimas GSTs catalisam a conjugação do substrato CDNB (1-cloro-2,4-dinitrobenzeno) com a glutathione, formando um tioéter, monitorizado pelo incremento de absorvância a 340 nm. Os resultados foram expressos em nanomoles de tioéter produzidas por minuto por mg de proteína. A atividade das GSTs foi determinada pelo método descrito por Habig *et al.* (1974) adaptado a microplaca, possibilitando a determinação de 4 leituras por réplica.

#### III. 2. 4. 3. Determinação da proteína total

A atividade enzimática é expressa em função da quantidade de proteína total presente nas amostras, por forma a expressar as atividades enzimáticas por miligrama de proteína.

A quantificação da proteína foi efetuada de acordo com o método descrito por Bradford (1976), adaptado a microplaca de 96 poços. O princípio do método tem por base a ligação do reagente de Bradford (corante) à proteína total, resultando num complexo corado e estável, quantificado a 595 nm. As determinações foram efetuadas em quadruplicado.

### III. 2. 5. Análise estatística

Os resultados dos ensaios, agudo e crónico, foram comparados por intermédio de uma análise de variância, seguida do teste de Dunnet para discriminar diferenças significativas relativamente aos tratamentos controlos. Para o cálculo da EC<sub>50</sub>, efetuou-se o método de Probit (OECD, 1998, 2004).

### III. 2. 6. Substância – teste

O paracetamol (CAS 103-90-2) foi adquirido a partir de Sigma-Aldrich (Alemanha), com um grau de pureza superior a 98%.

#### IV. Resultados

##### IV. 1. *Lemna minor*

O valor de EC<sub>50</sub> (446, 6 mg/L; intervalo de confiança – IC: 360,1 – 580,2) foi calculado tendo por base os ensaios preliminares efetuados. Após a determinação da EC<sub>50</sub> foram testadas as concentrações subletais 22,5 mg/L; 45 mg/L e 90 mg/L.

A exposição ao acetaminofeno causou uma diminuição da biomassa fresca, significativa para as duas concentrações mais elevadas ( $F = 2,62$ ; graus de liberdade (g.l.) = 3, 36;  $p < 0,05$ ; Figura 9A). Relativamente ao número de frondes, o ensaio revelou diferenças significativas entre o tratamento controlo e os tratamentos adotados, com uma significativa e redução dose-dependente do número de frondes ( $F = 61, 3$ ; g.l.= 3, 36;  $p < 0,01$ ; Figura 9B).

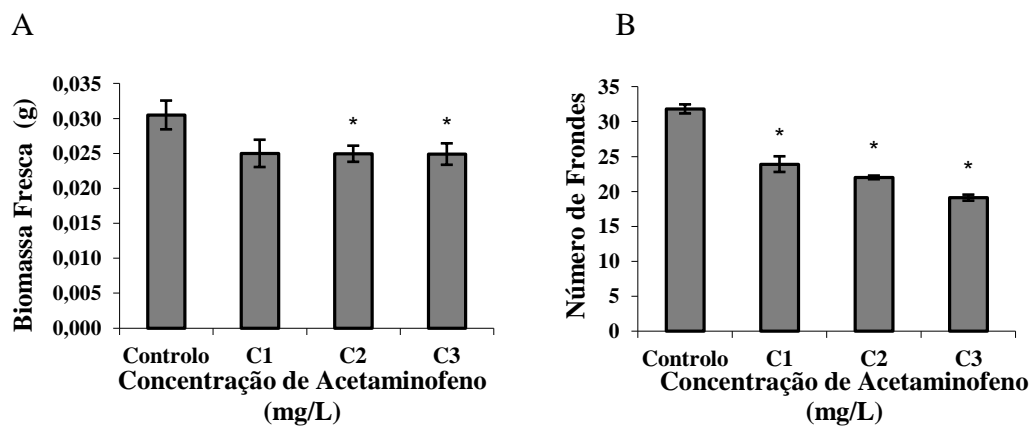


Figura 9. Efeito do acetaminofeno nos parâmetros standard de *Lemna minor*, biomassa fresca (A) e número de frondes (B). As barras correspondem à média das 10 réplicas e as respetivas barras de erro padrão; \* - diferenças significativas em relação ao controlo ( $p < 0,05$ ).

Em relação à permeabilidade membranar, não se verificou uma tendência marcada para o seu aumento. Não há valores significativamente diferentes em relação ao controlo ( $F = 0,000824$ ; g.l. = 3, 16;  $p > 0,05$ ; Figura 10).

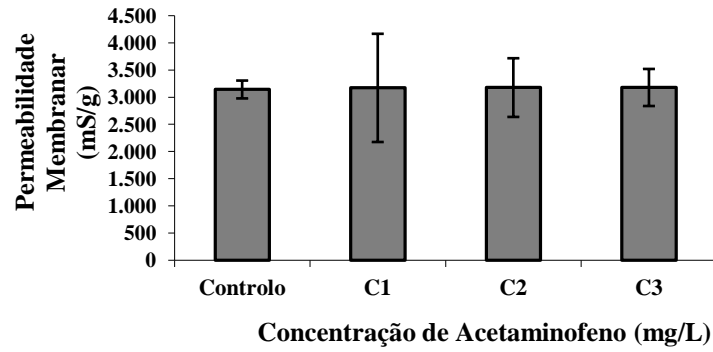


Figura 10. Efeito do acetaminofeno na permeabilidade membranar de *Lemna minor*. As barras correspondem à média das 10 réplicas e as correspondentes barras de erro padrão.

As concentrações dos pigmentos fotossintéticos mantiveram-se constantes, não revelando fitotoxicidade. Não se verificaram diferenças significativas em relação ao tratamento controlo (Clorofila a,  $F = 2,41$ ; g.l. = 3, 16;  $p > 0,05$ ; Figura 11C; Clorofila b,  $F = 4,73$ ; g.l. = 3, 16;  $p > 0,05$ ; Figura 11D; Carotenóides,  $F = 0,51$ ; g.l. = 3, 13;  $p > 0,05$ ; Figura 11E; Clorofilas Totais,  $F = 3,16$ ; g.l. = 3, 16;  $p > 0,05$ ; Figura 11F). Contudo, esta macrófita aquática mostrou sinais de clorose (alteração da coloração) a partir do quinto dia de exposição.

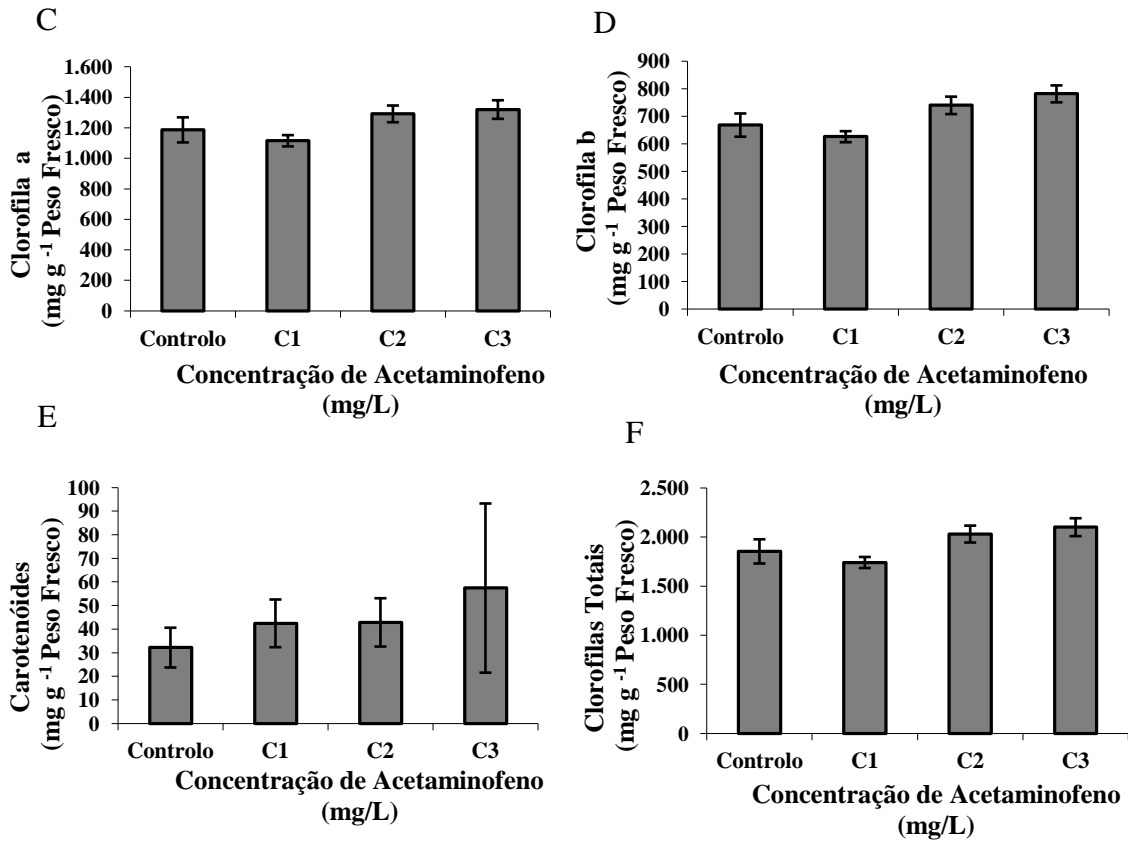


Figura 11. Efeito do acetaminofeno nas concentrações dos pigmentos fotossintéticos de *Lemna minor*. As barras correspondem à média das 10 réplicas e as correspondentes barras de erro padrão.

O acetaminofeno induziu degradação peroxidativa nos lípidos membranares, visto que o teor em MDA aumentou relativamente ao tratamento controlo ( $F = 14,4$ ; g.l. = 3, 16;  $p < 0,01$ ; Figura 12).

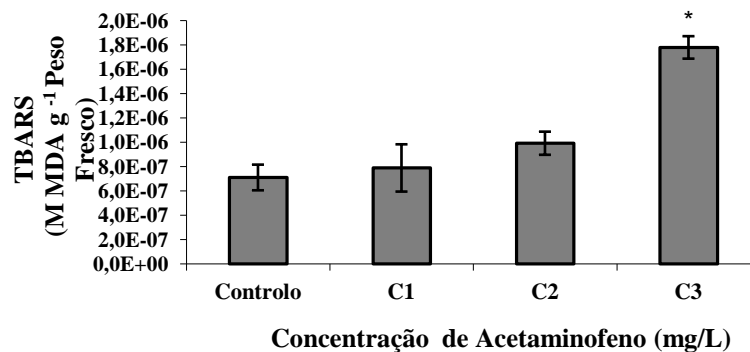


Figura 12. Efeito do acetaminofeno na peroxidação lipídica determinada através da medição dos níveis de TBARS. As barras correspondem à média das 10 réplicas e as

Efeitos tóxicos subletais de paracetamol em dois níveis de organização biológica: *Lemna minor* e *Daphnia magna*

correspondentes barras de erro padrão; \* - diferenças significativas em relação ao controlo ( $p < 0,05$ ).

#### IV. 2. *Daphnia magna*

##### IV. 2. 1. Teste de exposição agudo

O valor de  $EC_{50}$  (4,7 mg/L; IC: 4,2 – 5,0) foi calculado a partir da  $EC_{50}$  reportada por Kühn *et al.* (1989). Após a determinação da  $EC_{50}$  foram testadas as concentrações subletais 0,79 mg/L; 1,78 mg/L e 4,00 mg/L.

O teste de toxicidade aguda revelou diferenças significativas entre o tratamento controle e a concentração de exposição mais elevada ( $F = 5,47$ ; g.l. = 3, 12;  $p < 0,01$ ; Figura 13).

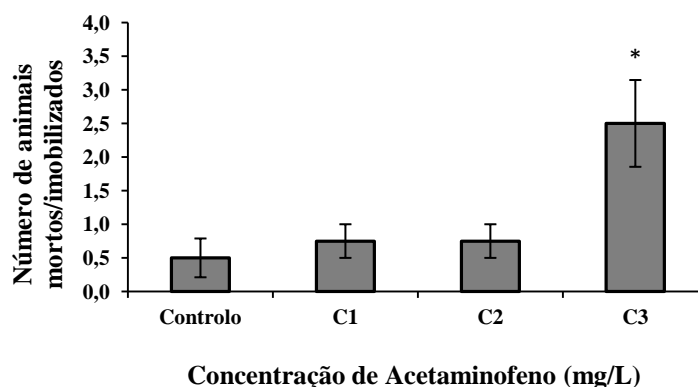


Figura 13. Resultados do teste de toxicidade aguda: número de animais mortos/imobilizados. As barras correspondem à média das 4 réplicas e, correspondentes barras de erro padrão; \* - diferenças significativas em relação ao controle ( $p < 0,05$ ).

##### IV. 2. 2. Teste de exposição crônico

A idade da primeira reprodução não sofreu alterações em todos os tratamentos, exceto na concentração de exposição mais elevada, na qual o início da primeira reprodução foi antecipado ( $F = 5,59$ ; g.l. = 6, 63;  $p < 0,01$ ; Figura 14G). Na fecundidade, os efeitos mais significativos foram observados nas 3 concentrações de exposição mais elevadas, visto que se verificou uma significativa e dose - dependente redução do número de crias ( $F = 44, 02$ ; g.l. = 6, 63;  $p < 0,01$ ; Figura 14H) e de ninhadas ( $F = 39, 514$ ; g.l. = 6, 63;  $p < 0,01$ ; Figura 14I) por fêmea. Ao longo do ensaio, o crescimento diário das fêmeas foi menor nas concentrações de exposição de 1,2 mg/L e de 1,7 mg/L,

comparativamente com o tratamento controlo ( $F = 4,97$ ; g.l. = 40, 340;  $p < 0,05$ ; Figura 14J). Não foi possível avaliar o crescimento diário nas concentrações de exposição mais elevadas, visto que os animais expostos não atingiram o final do ensaio.

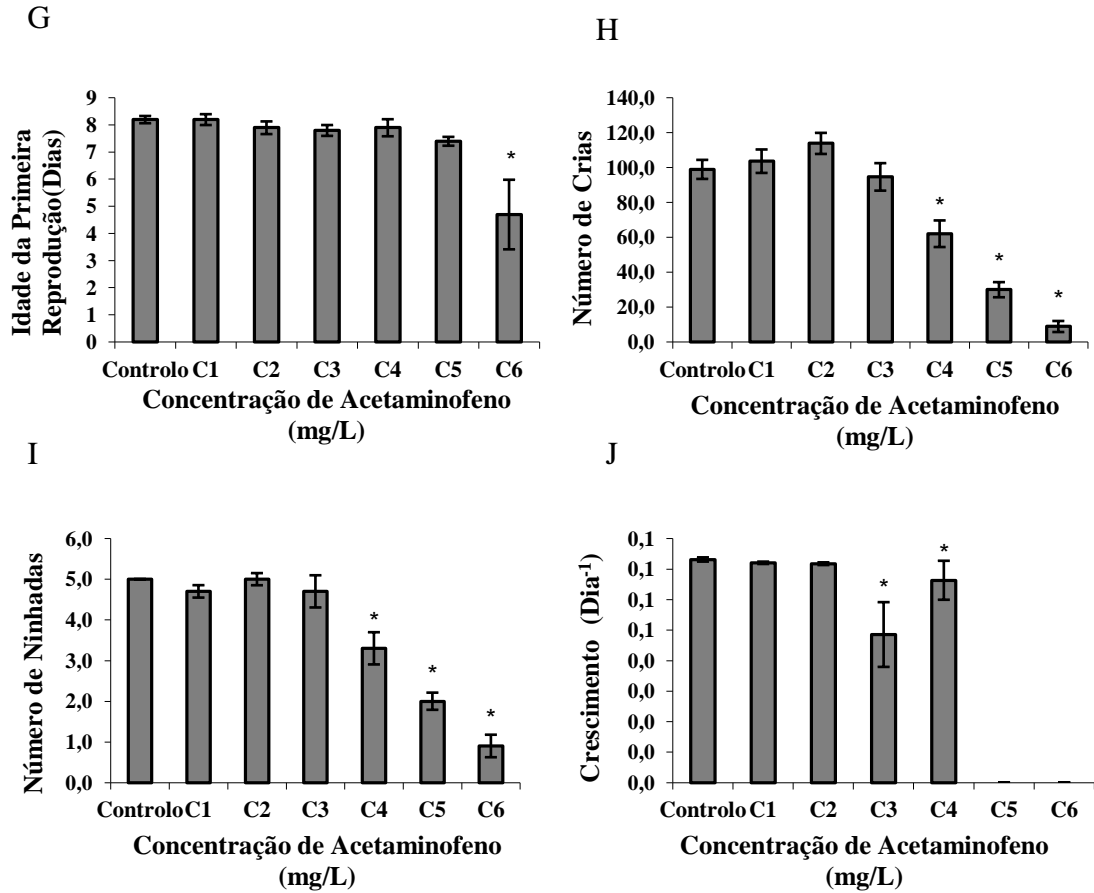


Figura 14. Resultados do teste de exposição crónica: idade da primeira reprodução (G), número de crias (H), número de ninhadas (I) e crescimento diário (J). As barras correspondem à média das 10 réplicas e, correspondentes barras de erro padrão; \* - diferenças significativas em relação ao controlo ( $p < 0,05$ ).

A taxa de crescimento populacional apresentou uma redução significativa na concentração de exposição mais elevada, pois a população encontrava-se em declínio devido à reduzida fecundidade ( $F = 9,57$ ; d.f. = 6, 63;  $p < 0,01$ ; Figura 15).

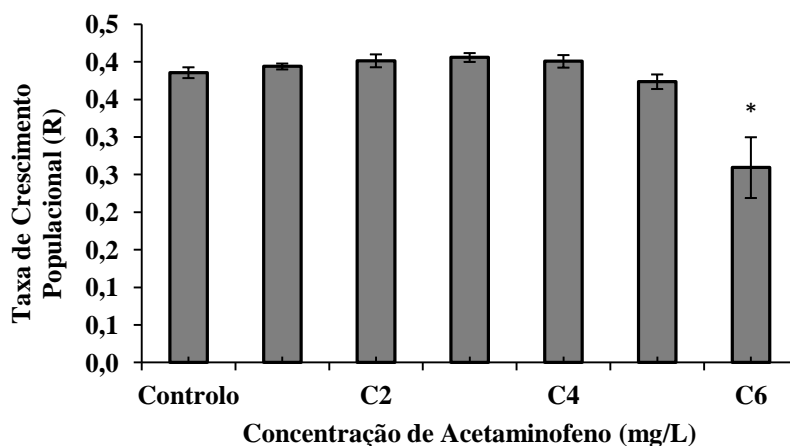


Figura 15. Resultados do teste de exposição crónica: taxa de crescimento populacional (R). As barras correspondem à média das 10 réplicas e, correspondentes barras de erro padrão; \* - diferenças significativas em relação ao controlo ( $p < 0,05$ ).

#### IV. 2. 3. Determinações enzimáticas

A exposição a acetaminofeno não induziu diferenças significativas na atividade das enzimas CAT ( $F = 0,57$ ; g.l. = 3, 10;  $p > 0,05$ ; Figura 16K) e GSTs ( $F = 1,25$ ; g.l. = 3,10;  $p > 0,05$ ; Figura 16L).

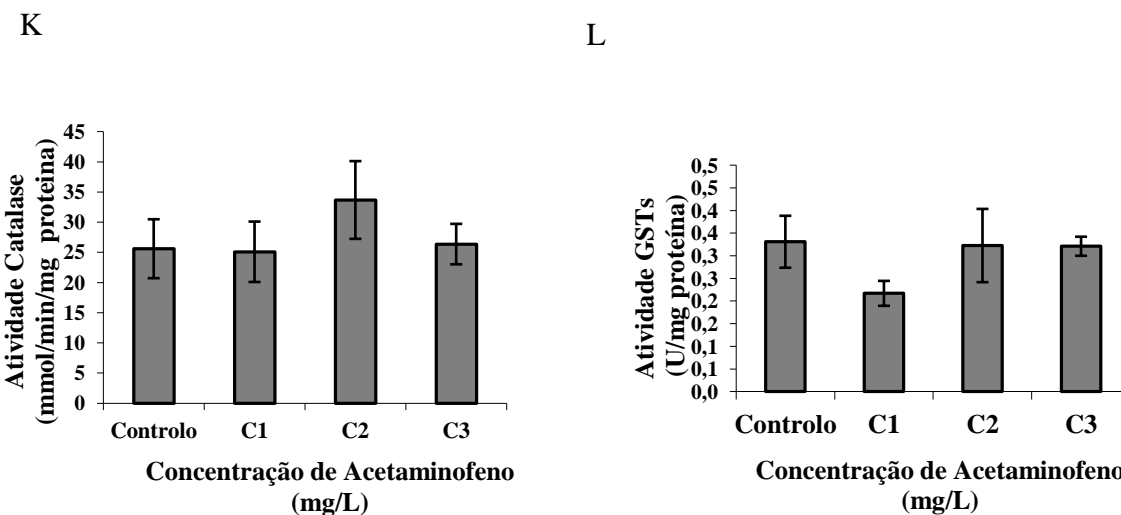


Figura 16. Efeito do acetaminofeno na atividade das enzimas CAT e GSTs. As barras correspondem à média das 10 réplicas e, correspondentes barras de erro padrão.

## V. Discussão

### V. 1. *Lemna minor*

Nos mamíferos, o acetaminofeno sofre metabolização hepática formando conjugados com o ácido glucurónico e o ião sulfato, posteriormente eliminados na urina (Jaeschke e Bajt, 2006; Xu *et al.*, 2008; Bartha *et al.*, 2010). Apenas um pequena quantidade deste analgésico é metabolizada pelas isoenzimas do citocromo P450, formando um intermediário hepatotóxico, o NAPQI. Em condições normais, este intermediário é conjugado com a glutathiona, permitindo assim a sua destoxificação (Xu *et al.*, 2008). Em caso de sobredosagem ou baixos níveis de glutathiona, o NAPQI livre rapidamente se liga a proteínas celulares e ácidos nucleicos, induzindo uma série de eventos (Jaeschke *et al.*, 2003; Jaeschke e Bajt, 2006; Bertolini *et al.*, 2006; Xu *et al.*, 2008).

Os mecanismos de destoxificação das plantas são algo diferentes. As plantas apresentam cascatas de destoxificação que se assemelham às funções hepáticas dos mamíferos, surgindo assim o conceito de “fígado verde”. Durante o metabolismo de xenobióticos, ocorrem reações enzimáticas de fase I, seguindo-se a destoxificação por conjugação (fase II) e, ainda o sequestro de compostos em organelos sensíveis (fase III) (Schröder e Collins, 2002). Nas plantas, a glicosilação e a oxidação, com posterior conjugação do NAPQI com a glutathiona, constituem as principais vias de destoxificação do acetaminofeno (Huber *et al.*, 2009). Os metabolitos produzidos em maior quantidade e os considerados mais estáveis são os conjugados com glucose (Bartha *et al.*, 2010). Para a maioria dos compostos, a conjugação com a glutathiona representa apenas uma pequena porção dos metabolitos produzidos (Huber *et al.*, 2009).

No presente estudo, a exposição de *L. minor* a acetaminofeno causou uma diminuição da biomassa fresca, sobretudo nas duas concentrações mais elevadas. O presente estudo revelou também uma significativa e dose-dependente redução do número de frondes. Adicionalmente, o biomarcador indicativo da peroxidação lipídica sofreu um forte incremento, permitindo concluir que ocorreu a instalação de um cenário de stress oxidativo associado à exposição ao paracetamol.

Alguns estudos sugerem que a presença de acetaminofeno ao nível do ambiente aquático não é totalmente desprovida de efeitos toxicológicos (Jaeschke *et al.*, 2003;

Jaeschke e Bajt, 2006; Xu *et al.*, 2008). Os efeitos do paracetamol em termos de stress oxidativo em plantas, com consequências ao nível da sua morfologia, foram já reportados anteriormente. No estudo conduzido por Bartha *et al.* (2010), a exposição da planta *Brassica juncea* a acetaminofeno causou a diminuição da atividade das GSTs, o que originou alterações morfológicas, como a inibição do crescimento da raiz e a descoloração. Na raiz verificou-se uma diminuição da atividade das GSTs, mas o teor em conjugados acetaminofeno-glutationa não foi significativamente inferior. A redução da atividade das GSTs pode dever-se à inibição desta família de isoenzimas pelo acetaminofeno ou à diminuição das defesas antioxidantes (Bartha *et al.*, 2010). É de salientar que a conjugação com a glutatona ocorre exclusivamente na presença do NAPQI, um radical oxidante altamente reativo que requer a ativação do acetaminofeno pelas isoenzimas do citocromo P450 (Huber *et al.*, 2009).

Relativamente ao stress oxidativo, o acetaminofeno induziu degradação peroxidativa nos lípidos membranares, visto que o teor em MDA aumentou significativamente. Apesar da existência dos mecanismos fisiológicos antioxidantes, por vezes ocorrem danos oxidativos nas estruturas biológicas. Tal facto pode estar relacionado como uma elevada produção de ROS ou uma diminuição das defesas antioxidantes (Brandão *et al.*, 2011). Brandão *et al.* (2011), já havia demonstrado os efeitos tóxicos do acetaminofeno com envolvimento peroxidativo, ao expor o molusco *Corbicula fluminea* a concentrações crescentes deste fármaco. Ortega-Villasante *et al.* (2005) também evidenciou um significativo dano oxidativo causado pela exposição de caules e raízes de *Medicago sativa* a cádmio. Este metal causou uma depleção da glutatona reduzida no *pool* intracelular, o que desencadeou stress oxidativo nas células vegetais. Estes resultados encontram-se de acordo com os dados reportados por Razinger *et al.* (2008), visto que neste ensaio se verificou um aumento significativo do teor de MDA acima da concentração de 10 mM de cádmio.

A responsividade das plantas relativamente a agentes capazes de causar stress oxidativo é reforçada pelo número de estudos já publicados que a demonstram. Alguns destes estudos referem especificamente uma associação entre esses efeitos tóxicos e reduções na produtividade da biomassa, fator que assume particular importância no ecossistema. São diversos os estudos que reportam alterações análogas provocadas por outros agentes nocivos. Razinger *et al.* (2008) reportou uma diminuição do número de frondes em *L. minor* após a exposição a diferentes concentrações de cádmio. Os resultados

apresentados sobre a toxicidade do cádmio encontram-se de acordo com o estudo realizado por Teodorović *et al.* (2011), no qual também se verificou uma diminuição do número de frondes em *L. minor* exposta ao herbicida atrazina. Também Brain *et al.* (2004b) reportou fitotoxicidade em parâmetros somáticos (biomassa fresca, peso seco, número e tamanho de raízes) para uma mistura de compostos farmacêuticos (atorvastatina, acetaminofeno, cafeína, sulfometoxazol, carbamazepina, levofloxacina, sertralina e trimetoprim) nas macrófitas aquáticas, *Myriophyllum sibiricum* e *Lemna gibba*. Neste estudo, também se verificou um aumento da permeabilidade membranar, como resultado da diminuição da atividade fotossintética. Todavia, no presente estudo não se verificou uma tendência marcada para o aumento da condutividade.

O presente estudo demonstrou a ausência de efeitos do paracetamol relativamente ao comprometimento da produção de pigmentos fotossintéticos. Tal como neste estudo, trabalhos prévios recorreram à medição de pigmentos fotossintéticos como critério ecotoxicológico para avaliar os efeitos do paracetamol em plantas. No estudo elaborado por Bartha *et al.* (2010), verificou-se uma diminuição no teor de pigmentos fotossintéticos (clorofilas a e b, carotenóides) após a exposição da espécie *B. juncea* a acetaminofeno, revelando que a atividade fotossintética da planta foi afetada. No presente estudo, as concentrações dos pigmentos fotossintéticos mantiveram-se constantes, não revelando fitotoxicidade. À semelhança deste estudo, no ensaio desenvolvido por Brain *et al.* (2004b), as concentrações de pigmentos fotossintéticos não sofreram alterações significativas após a exposição de *M. sibiricum* e *L. gibba* a uma mistura de 8 fármacos. Neste ensaio, os parâmetros somáticos demonstraram ser fortes indicadores de fitotoxicidade comparativamente com os pigmentos. Contudo, no presente estudo, *L. minor* apresentou uma alteração da coloração a partir do quinto dia de exposição. Este sinal de stress não causou uma diminuição significativa do teor em pigmentos fotossintéticos, visto que as concentrações se mantiveram constantes.

Este estudo demonstrou que o acetaminofeno é capaz de exercer efeitos nocivos sobre a macrófita aquática *L. minor*. Os parâmetros somáticos e a medição do teor em MDA demonstraram ser fortes indicadores de fitotoxicidade comparativamente com os pigmentos fotossintéticos.

## V. 2. *Daphnia magna*

### V. 2. 1. Teste de exposição agudo

Em doses terapêuticas, cerca de 90% do paracetamol sofre metabolização hepática (Jaeschke e Bajt, 2006; Xu *et al.*, 2008) e, menos de 10% do paracetamol é metabolizado pelas isoenzimas do citocromo P450, resultando na formação de um intermediário hepatotóxico, o NAPQI (Xu *et al.*, 2008). Contudo, esta grande família de isoenzimas não se encontra bem desenvolvida em invertebrados aquáticos, contribuindo para diferenças significativas nos ensaios de exposição a xenobióticos (Snyder, 2000). O mecanismo de toxicidade do paracetamol contribui para o stress oxidativo dos organismos expostos, devido à formação do NAPQI (Livingstone, 2001; Nunes *et al.*, 2006, 2008).

À semelhança do presente estudo, estudos prévios recorreram à sobrevivência como critério para avaliar os efeitos do paracetamol em termos de stress oxidativo no microcrustáceo *D. magna*. Kim *et al.* (2007) determinou um valor de EC<sub>50</sub> às 48 horas de 30,1 mg/L e às 96 horas de 26,6 mg/L. Na literatura encontram-se documentados valores de EC<sub>50</sub> de 50 mg/L às 48 horas (Henschel *et al.*, 1997), 40,814 mg/L às 24 horas (Lilius *et al.*, 1995), 11,85 mg/L às 48 horas (Kim *et al.*, 2012) e 9,2 mg/L às 48 horas (Kühn *et al.*, 1989). O valor de EC<sub>50</sub> reportado por Kühn *et al.* (1989) é próximo do valor determinado no presente estudo, 4,7 mg/L.

O teste de toxicidade aguda realizado revelou que a concentração de exposição mais elevada afetou significativamente a mobilidade/sobrevivência dos organismos expostos. Também Henschel *et al.* (1997) reportou um aumento significativo da toxicidade durante o ensaio de exposição agudo de *D. magna*, visto que o valor de EC<sub>50</sub> diminuiu (EC<sub>50</sub> às 24 horas – 293 mg/L; EC<sub>50</sub> às 48 horas – 50 mg/L). Kim *et al.* (2012) também relatou uma significativa redução da sobrevivência do peixe *Oryzias latipes* após a exposição crónica a acetaminofeno.

## V. 2. 2. Teste de exposição crónico

Os ensaios de toxicidade agudos predominam sobre os crónicos, provavelmente devido à complexidade experimental envolvida nestes (Santos *et al.*,2010). Neste último caso, os organismos são expostos continuamente por longos períodos de tempo ou mesmo durante todo o seu ciclo de vida (Fent *et al.*,2006). Os dados obtidos no ensaio crónico realizado evidenciaram inequivocamente o potencial toxicológico do acetaminofeno sobre o ciclo de vida de *D. magna*. Vários estudos ecotoxicológicos sugerem que o acetaminofeno é capaz de alterar as respostas ao nível do sistema endócrino, perturbando assim a reprodução. Todavia, os seus efeitos a este nível não se encontram totalmente esclarecidos (Kim *et al.* 2012). No ensaio conduzido por Kim *et al.* (2012), a exposição prenatal ao acetaminofeno afetou o sucesso reprodutivo da descendência de organismos aquáticos expostos, visto que se verificou uma diminuição no número de ovos eclodidos no peixe *Oryzias latipes*. Este dado ecotoxicológico, assim com a determinação da vitelogenina (biomarcador representativo da desregulação endócrina em animais ovíparos), sugerem que este fármaco pode causar desregulação endócrina. Neste ensaio verificou-se um aumento dos seus níveis nos machos indicando exposição a compostos químicos similares ao estrogénio, o que pode causar um desequilíbrio na síntese de hormonas sexuais.

No presente ensaio, a exposição de *D. magna* a concentrações crescentes de acetaminofeno também afetou o sucesso reprodutivo deste microcrustáceo, visto que se verificou uma significativa e dose-dependente redução do número de crias e de ninhadas. Já o ensaio acerca da toxicidade crónica do acetaminofeno em *D. magna* publicado por Kim *et al.* (2012) não reportou efeitos na sobrevivência e reprodução deste organismo aquático.

Os dados aqui obtidos encontram-se em linha com dados referentes a outros compostos. No ensaio conduzido por Heckmann *et al.* (2007), *D. magna* foi exposta a diferentes concentrações do anti-inflamatório não esteroide ibuprofeno, durante 14 dias com o objetivo de avaliar os efeitos ecotoxicológicos ao nível do ciclo de vida e da dinâmica populacional. Os efeitos mais significativos foram observados ao nível do ciclo reprodutivo, sendo que a idade da primeira reprodução foi adiada na concentração de exposição de 40 mg/L e o número de crias por fêmea diminuiu em todos os tratamentos.

Encontra-se documentado que as propriedades analgésicas e antipiréticas do paracetamol se podem dever à inibição de uma isoforma da COX do sistema nervoso central, como a COX-3, envolvida na conversão do ácido araquidónico em prostaglandinas (Rang *et al.*, 2008). À semelhança do acetaminofeno, o ibuprofeno atua por inibição reversível da COX, na conversão do ácido araquidónico em diferentes eicosanóides, que atuam na inflamação e, ainda a nível neuronal e reprodutivo, sendo que vários estudos reportam que estes mediadores desempenham um papel vital na reprodução (Heckmann *et al.*, 2007; Hayashi *et al.*, 2008).

Embora não sendo dados obtidos para o acetaminofeno, a similaridade dos resultados para o número de crias é evidente. Todavia, no presente estudo a idade da primeira reprodução não sofreu alterações em todos os tratamentos, exceto na concentração de exposição mais elevada, para a qual o início da primeira reprodução foi antecipado. Tal como Heckmann *et al.* (2007), o estudo realizado também apresentou uma redução significativa da taxa de crescimento populacional na concentração de exposição mais elevada.

Ao longo do presente ensaio, o crescimento diário das fêmeas foi significativamente menor nas concentrações de exposição de 1,2 mg/L e de 1,7 mg/L. É de salientar que não foi possível avaliar o crescimento diário nas concentrações de exposição mais elevadas, visto que os animais expostos não atingiram o final do ensaio. Contrariamente ao reportado neste ensaio, no estudo de Heckmann *et al.* (2007) verificou-se um aumento da superfície corporal a partir do 8º dia de exposição ao ibuprofeno.

Também Hayashi *et al.* (2008) realizou um ensaio semelhante ao conduzido por Heckmann *et al.* (2007), no qual o crustáceo *D. magna* foi exposto a diferentes concentrações de ibuprofeno (20 mg/L, 40 mg/L e 80 mg/L) durante 10 dias, seguindo-se um período de recuperação de 10 dias. Durante o período de exposição, o número de descendentes diminuiu nas concentrações de exposição de 20 mg/L e de 40 mg/L, sendo que na concentração de exposição mais elevada não ocorreu reprodução. A idade da primeira reprodução foi adiada em todos os tratamentos e, os organismos expostos a 80 mg/L só iniciaram a seu ciclo reprodutivo ao quarto dia do período de recuperação. A taxa de crescimento populacional apresentou uma redução significativa na concentração de exposição mais elevada; estes resultados são consistentes com os dados apresentados no presente estudo e no ensaio elaborado por Heckmann *et al.* (2007). Notavelmente, no

final do período de recuperação, a taxa de crescimento populacional não apresentou diferenças significativas em relação ao tratamento controlo. Segundo Hayashi *et al.* (2008), o mecanismo de ação reversível do ibuprofeno fornece uma explicação plausível para esta rápida recuperação

Os estudos apresentados são relevantes, pois sugerem que o acetaminofeno e ibuprofeno podem afetar o ciclo de vida e a dinâmica populacional de *D. magna*. No entanto, é difícil obter conclusões definitivas, visto que apesar de apresentarem um mecanismo de ação farmacológica similar, as condições de exposição foram distintas e as suas toxicidades são também diversas. Além disso, as concentrações testadas são superiores às encontradas nas águas de superfície, 10 µg/L em águas naturais dos Estados Unidos da América (kolpin *et al.*, 2002) e acima de 65 µg/L no rio Tyne (Robert e Tomas, 2006), Reino Unido. Contudo, é mais provável que no meio ambiente ocorram exposições crónicas a tóxicos (Nunes *et al.*, 2008), podendo ocorrer exposições a níveis superiores aos reportados, tornando estes resultados ecologicamente relevantes.

### V. 2. 3. Determinações enzimáticas

O uso de biomarcadores constitui uma ferramenta valiosa para avaliar os efeitos ecotoxicológicos de inúmeros compostos químicos sobre os organismos aquáticos (Nunes *et al.*, 2006). Como já foi demonstrado, o mecanismo de toxicidade do paracetamol contribui para o stress oxidativo dos organismos expostos. O stress oxidativo desencadeia um conjunto de respostas adaptativas nos sistemas protetores, a modificação de macromoléculas e, em última instância, lesões celulares e tecidulares. A utilização de biomarcadores de exposição ao paracetamol permite avaliar as respostas biológicas dos organismos (Livingstone, 2001; Nunes *et al.*, 2006, 2008). Neste âmbito, foram selecionadas as atividades de duas enzimas chave como parâmetros indicativos de stress oxidativo, a CAT e as GSTs. A CAT é a enzima responsável pela decomposição do peróxido de hidrogénio em água e oxigénio molecular. A formação de peróxido de hidrogénio é comum perante cenários de stress oxidativo, após a destoxificação do anião superóxido em peróxido de hidrogénio, reação catalisada pela enzima SOD. Assim, a atividade desta enzima pode aumentar perante níveis elevados de peróxido de hidrogénio (Brandão *et al.*, 2011).

No estudo elaborado por Brandão *et al.* (2011), a exposição do molusco *C. fluminea* a paracetamol não causou alterações significativas na atividade da CAT. Este dado é consistente com o resultado obtido no presente estudo, pois a exposição de *D. magna* ao paracetamol não induziu alterações significativas na atividade da CAT, o que sugere que a degradação catalítica do peróxido de hidrogénio não foi acompanhada pelo aumento da atividade da enzima ou a formação de peróxido de hidrogénio não foi favorecida pela exposição ao paracetamol (Brandão *et al.*, 2011). No ensaio elaborado por Solé *et al.* (2010), também não se verificaram alterações significativas na atividade da CAT após a exposição do organismo aquático *Mytilus galloprovincialis* ao paracetamol durante 10 dias. No entanto, perante um cenário de stress oxidativo será expectável ocorrer um aumento da atividade de enzimas antioxidantes, tal como foi relatado por Parolini *et al.* (2010). Segundo este autor, a exposição do bivalve *Dreissena polymorpha* a paracetamol induziu um aumento significativo da atividade da enzima CAT. A responsividade dos organismos aquáticos relativamente a agentes capazes de causar stress oxidativo é reforçada pelos diversos estudos publicados. São diversos os ensaios que reportam alterações na atividade das enzimas antioxidantes provocadas por outros agentes nocivos. No estudo conduzido por Barata *et al.* (2005), a atividade da CAT aumentou significativamente em *D. magna* exposta a menandiona, paraquato e cobre, manteve-se inalterada durante a exposição ao endossulfão e diminuiu na presença de cádmio. O cádmio é conhecido por induzir danos oxidativos e alterar a resposta das enzimas antioxidantes. Também no ensaio conduzido por Razinger *et al.* (2008), a atividade da enzima CAT diminuiu após a exposição de *L. minor* ao cádmio.

As GSTs constituem um grupo de isoenzimas envolvidas na destoxificação de xenobióticos através da conjugação de metabolitos tóxicos com a glutatona (Blanchette *et al.*, 2007). Na maioria dos organismos, o processo de conjugação é de extrema importância na via de destoxificação do paracetamol, visto que permite a destoxificação de um radical altamente reativo, o NAPQI (Xu *et al.*, 2008). Brandão *et al.* (2011) relatou uma significativa diminuição da atividade das GSTs após a exposição aguda e crónica de *C. fluminea* a paracetamol, sugerindo que este fármaco pode inibir a atividades destas isoenzimas. Já o ensaio conduzido por Barata *et al.* (2005) reportou um aumento significativo da atividade das GSTs em *D. magna* exposta aos pesticidas endossulfão e menandiona, sugerindo que esta família de isoenzimas metabólicas de fase II é responsável pela destoxificação destes compostos químicos.

No ensaio conduzido por Nunes *et al.* (2008), as GSTs foram significativamente inibidas nas brânquias e fígado do peixe *Gambusia holbrooki* após a exposição ao clofibrato. Noutro ensaio elaborado pelo mesmo autor foi demonstrado que a exposição do crustáceo *Artemia parthenogenetica* a clofibrato não induziu diferenças significativas na atividade das GSTs (Nunes *et al.*, 2006); este resultado está de acordo com os resultados obtidos no presente ensaio. Contudo, não podem ser efetuadas comparações, pois os ensaios diferem nas condições de exposição, no organismo exposto e no agente tóxico. O clofibrato é um agente pro-oxidante que atua por um mecanismo completamente diferente do paracetamol, dado que estimula a  $\beta$ -oxidação hepática de ácidos gordos e a lipólise (Nunes *et al.*, 2006).

Os resultados obtidos no presente ensaio sugerem que o paracetamol não causou um cenário de stress oxidativo muito evidente, pois as atividades das enzimas antioxidantes não sofreram alterações. Estes resultados não foram contudo consistentes com os obtidos nos ensaios agudo e crónico, pois o ciclo de vida e a dinâmica populacional de *D. magna* foram significativamente prejudicados.

## VI. Conclusões

Nos últimos anos, o consumo de fármacos tem vindo a aumentar na União Europeia. Um dos aspetos críticos relativamente a este aumento prende-se com a sua libertação para o meio ambiente. Os fármacos e os seus resíduos (metabolitos ou produtos de degradação) são substâncias biologicamente ativas, concebidas para exercerem determinados mecanismos de ação e para resistirem à inativação metabólica antes de exercerem o seu efeito farmacológico. Todavia, estas propriedades são paradoxalmente responsáveis pela bioacumulação dos seus resíduos e ocorrência de efeitos nos organismos aquáticos e terrestres (Halling-Sorensen *et al.*, 1998; Fent *et al.*, 2006), podendo exibir efeitos deletérios mesmo em baixas concentrações (Halling-Sorensen *et al.*, 1998, Daughton e Ternes, 1999, Jones *et al.*, 2002; Miao *et al.*, 2002, Nunes *et al.*, 2008).

Assim, o presente estudo teve como objetivo primordial determinar os efeitos toxicológicos decorrentes da exposição dos organismos aquáticos *Lemna minor* e *Daphnia magna* a paracetamol. O estudo realizado sugere que o paracetamol representa risco ecotoxicológico para a macrófita *L. minor*, visto que se verificou uma diminuição dos parâmetros somáticos (biomassa fresca e número de frondes) e um aumento significativo do teor em MDA, indicando a ocorrência da degradação peroxidativa dos lípidos membranares. Os parâmetros somáticos e a quantificação do teor em MDA demonstraram ser fortes indicadores de fitotoxicidade, comparativamente com os pigmentos fotossintéticos, visto que as suas concentrações se mantiveram constantes. Um aspeto a ter em consideração em trabalhos futuros com esta espécie relacionado com o stress oxidativo causado pelo paracetamol será a determinação da atividade de enzimas antioxidantes.

Após a análise dos resultados obtidos e a comparação com estudos prévios, constatou-se que o paracetamol também representa risco ecotoxicológico para o microcrustáceo *D. magna*. O teste de toxicidade aguda realizado revelou que a concentração de exposição mais elevada afetou significativamente a mobilidade/sobrevivência dos organismos expostos. O teste de toxicidade crónica revelou alterações no ciclo de vida e na dinâmica populacional de *D. magna*, pois verificou-se uma significativa redução do

número de crias e de ninhadas e uma redução da taxa de crescimento populacional na concentração de exposição mais elevada. O crescimento diário das fêmeas foi significativamente menor nas concentrações de exposição de 1,2 mg/L e de 1,7 mg/L.

No que concerne às determinações enzimáticas, as atividades das enzimas antioxidantes não sofreram alterações. Estes resultados não foram consistentes com os obtidos nos ensaios agudo e crónico, visto que o ciclo de vida e a dinâmica populacional foram prejudicados. É de salientar que as concentrações de exposição são superiores às encontradas nas águas de superfície. Contudo, tal como se verificou no presente estudo, é mais provável que no meio ambiente ocorram exposições crónicas a tóxicos (Nunes *et al.*, 2008), que apresentam um elevado potencial para exibir efeitos nefastos ao nível reprodutivo e metabólico (Daughton e Ternes, 1999).

## VII. Referências Bibliográficas

- Aebi, H. (1984). Catalase *in vitro*. *Methods in Enzymology*, 6, pp. 105 – 121.
- Aliferis, K.A., Materzok, S., Paziotou, G.N., Chrysayi-Tokousbalides, M. (2009). *Lemna minor* L. as a model organism for ecotoxicological studies performing H NMR fingerprinting. *Chemosphere*, 76, pp. 967 – 973.
- Altenburger, R., Backhaus, T., Boedeker, W. (2000). Predictability of the toxicity of multiple chemical mixtures to *Vibrio fischeri*: mixtures composed of similarly acting chemicals. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 19, pp. 2341–2347.
- Andreozi, R., Raffaele, M., Nicklas, P. (2003). Pharmaceutical in STP effluents and their solar photo degradation in aquatic environment. *Chemosphere*, 50, pp. 1319–3152.
- ASTM International. (1988). Standard Guide for Conducting Acute Toxicity Tests with Fishes, Macroinvertebrates, and Amphibians. E729 – 88a.
- ASTM International. (2004). Standard Guide for Conducting *Daphnia magna* Lifecycle Toxicity Tests. E 1693–97 (reapproved 2004).
- ASTM. (2004). Standard Guide for Conducting Static, Axenic, 14-Day Phytotoxicity Tests in Test Tubes with the Submersed Aquatic Macrophyte, *Myriophyllum sibiricum* Komarov E 1913 – 04.
- Azevedo, F.A., Chasin, A.A.M. (2003). *As bases toxicológicas da Ecotoxicologia..* São Paulo, Editora Rima, pp. 340.
- Backhaus, T., Altenburger, R., Boedeker, W. (2000). Predictability of the toxicity of a multiple mixture of dissimilarly acting chemicals to *Vibrio fischeri*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 19, pp. 2348 – 2356.
- Baird, D.J., Barata, C. (1998). Genetic variation in the response of *Daphnia* to toxic substances: Implications for Risk Assessment. In: Forbes, V.E. (Ed.). *Genetics and Ecotoxicology*. Taylor and Francis, Braun-Brunfield, Ann Arbor, pp. 207 – 221.

- Barata, C., Varo, I., Navarro, J. C., Arun, S., Porte, C. (2005). Antioxidant enzyme activities and lipid peroxidation in the freshwater cladoceran *Daphnia magna* exposed to redox cycling compounds. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 140, pp. 175 – 186.
- Barry, M.J., Meehan, B.J. (2000). The acute and chronic toxicity of lanthanum to *Daphnia carinata*. *Chemosphere*, 41, pp. 1669 – 1674.
- Bartha, B., Huber, C., Harpaintner, R., Schröder, P. (2010). Effects of acetaminophen in *Brassica juncea* L. Czern.: investigation of uptake, translocation, detoxification, and the induced defense pathways. *Environmental Science Pollution Research*, 17, pp. 1553 – 1562.
- Baun, A., Kloeft, L., Bjerg, P.L., Nyholm, N. (1999). Toxicity testing of organic chemicals in groundwater polluted with land fill leached. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 18, pp. 2046 – 2053.
- Beckman, K.B., Ames, B.N. (1998). The free radical theory of aging matures. *Physiological Reviews*, 78, pp. 547 – 581.
- Bertolini, A., Ferrari, A., Ottani, A., Guerzoni, S., Tacchi, R., Leone, S. (2006). Paracetamol: New Vistas of an Old Drug. *Central Nervous System Drug Reviews*, 12, pp. 3–4.
- Besten, P.J. (1998). Concepts of the implementation of biomarkers in environmental monitoring. *Marine Environmental Research*, 46, pp. 253 – 256.
- Blanchette, B., Feng, X., Singh, B.R. (2007). Marine glutathione S-transferases. *Marine Biotechnology*, 9, pp. 513 – 542.
- Boreen, A.L., Arnold, W.A., McNeill, K. (2003). Photodegradation of pharmaceuticals in the aquatic environment: a review. *Aquatic Sciences*, 65, pp. 320 – 341.
- Bradford, M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, pp. 248 – 254.

Brain, R.A., Johnson, D.J., Richards, S.M., Sanderson, H., Sibley, P.K., Solomon, K.R. (2004a). Effects of 25 pharmaceutical compounds to *Lemna gibba* using a seven - day static- renewal test. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 23, pp. 371 – 382.

Brain, R.A., Johnson, D. J., Richards, S. M., Hanson, M.L., Sanderson, H., Lam, M.W., Young, C., Mabury, S.A., Sibley, P.K., Solomon, K.R. (2004b). Microcosm evaluation of the effects of an eight pharmaceutical mixture to the aquatic macrophytes *Lemna gibba* and *Myriophyllum sibiricum*. *Aquatic Toxicology*, 70, pp. 23 – 40.

Brandão, F.P., Pereira, J.L., Gonçalves, F., Nunes, B. (2011). The Impact of Paracetamol on Selected Biomarkers of the Mollusc Species *Corbicula fluminea*. [Em linha]. Disponível em <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/tox.20774/pdfEnvironmental>>. [Consultado em 28/10/2012].

Braund, R., Peake, B.M., Schieffelbien, L. (2009). Disposal practises for unused medications in New Zeland. *Environment International*, 35, pp. 952 – 955.

Brodie, B.B., Axelrod, J. (1948). The fate of acetanilide in man. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 94, pp. 29 – 38.

Buege, J.A., Aust, S.D. (1978). Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymology*, 52, pp. 302 – 310.

Centre for Ecology & Hydrology. (2004). Information Sheet Lemna species (Duckweeds) [Em linha]. Disponível em <[http://www.ceh.ac.uk/sci\\_programmes/documents/Duckweeds.pdf](http://www.ceh.ac.uk/sci_programmes/documents/Duckweeds.pdf)>. [Consultado em 10/01/2013].

Cheremisinoff, N. P. (1996). *Biotechnology for waste and wastewater treatment*. Westwood, New Jersey, Noyes Publications, pp. 1 – 15.

Cleuvers, M. (2003). Aquatic ecotoxicity of pharmaceuticals including the assessment of combination effects. *Toxicology Letters*, 142, pp. 185 – 194.

Correia, M.A. (2012). Drug Biotransformation. In: Katzung, B.G., Masters, S.B., Trevor, A.J. (Eds.). *Basic and Clinical Pharmacology*. 12th Edition. United States, McGraw-Hill, pp. 15 – 36.

Crane, M., Watts, C., Boucard, T. (2006). Chronic aquatic environmental risks from exposure to human pharmaceuticals. *Science of the Total Environment*, 367, pp. 23 – 41.

Daughton, C.G., Ternes, T.A. (1999). Pharmaceuticals and personalcare products in the environment: Agents of subtle change? *Environmental Health Perspectives*, 107, pp. 907 – 938.

Decreto-lei n.º 152/97. [Em linha]. Disponível em <<http://dre.pt/pdf1s/1997/06/139A00/29592967.pdf>> [Consultado em 20/02/2013]

Dodson, S.I., Hanazato, T. (1995). Commentary on effects of anthropogenic and natural organic chemicals on development, swimming behavior, and reproduction of *Daphnia*, a key member of aquatic ecosystems. *Environmental Health Perspectives*, 103(4), pp. 7 – 11.

Dorne, J.L.C.M., Ragas, A.M.J., Frampton, G.K. (2007). Trends in human risk assessment of pharmaceuticals. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 387, pp. 1167–1172.

Dorval, J., Hontela, A. (2003). Role of glutathione redox cycle and catalase on defense against oxidative stress induced by enosulfan in adrenocortical cells os rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Toxicology and Applied Pharmacology*, 192, pp. 191 – 200.

Drew, B., Leeuwenburgh, C. (2002). Aging and the role of reactive nitrogen species. *Annals of New York Academy of Sciences*, 959, pp. 66 – 81.

Erijman, L., Figuerola, E.L.M., Guerrero, L.D., Ayarza, J.M. (2011). Impacto de los recientes avances en el análisis de comunidades microbianas sobre el control del proceso de tratamiento de efluentes. *Revista Argentina de Microbiología*, 43, pp. 127 – 135.

Faust, M., Altenburger, R., Backhaus, T. (2001). Predicting the joint algal toxicity of multicomponent S-triazine mixtures at low-effect concentrations of individual toxicants. *Aquatic Toxicology*, 56, pp. 13 – 32.

FDA - Center for Drug Evaluation and Research. (1998). Guidance for Industry- Environmental Assessment of Human Drugs and Biologics Applications, Revision 1. FDA Center for Drug Evaluation and Research, Rockville.

Fent, k., Weston, A.A., Caminada, D. (2006). Ecotoxicology of human pharmaceuticals. *Aquatic Toxicology*, 76, pp. 122 – 159.

Furtado, C., Oliveira, R. (2011). Infarmed: Análise da Evolução do Mercado Total de Medicamentos entre 2003-2010. [Em linha]. Disponível em <[http://www.infarmed.pt/portal/page/portal/INFARMED/MONITORIZACAO\\_DO\\_MERCADO/OBSERVATORIO/INTRODUCAO\\_DE\\_FICHEIROS/Monit-MT-2003-2010\\_20110513\\_.pdf](http://www.infarmed.pt/portal/page/portal/INFARMED/MONITORIZACAO_DO_MERCADO/OBSERVATORIO/INTRODUCAO_DE_FICHEIROS/Monit-MT-2003-2010_20110513_.pdf)>. [Consultado em 28/10/2012].

Glassmeyer, S.T., Hinchey, E.H., Boehme, S.E., Daughton, C.G., Ruhoy, I.S., Conerly, O., Daniels, R.L., Lauer, L., McCarthy, M., Nettesheim, T.G., Sykes, K., Thompson V.G. (2009). Disposal practises for unwanted residential medications in the United States. *Environment International*, 35, pp. 566 – 572.

Greenberg, B.M., Huang, X.D., Dixon, D.G. (1992). Applications of the aquatic higher plant *Lemna gibba* for ecotoxicological riskassessment. *Journal of Aquatic Ecosystem Health*, 1, pp. 147 – 155.

Habig, W.H., Pabst, M.J., Jakoby, W.B. (1974). Glutathione-S-transferases—the first enzymatic step in mercapturic acid formation. *Journal of Biological Chemistry*, 249, pp. 7130 – 7139.

Halling-Sorensen, B., Nors Nielsen, S., Lanzky, P.F., Ingerslev, F., Holten Lützhof, H.C., Jorgensen, S.E. (1998). Occurrence, fate and effects of pharmaceutical substances in the environment-a review. *Chemosphere*, 36 (2), pp. 357 – 393.

Hanson, M.L., Arts, G.H.P. (2007). Improving regulatory risk assessment - using aquatic macrophytes. *Integrated Environmental Assessment and Management*, 3, pp. 466 – 467.

Hayashi, Y., Heckmann, L.H., Callaghan, A., Sibly, R.M. (2008). Reproduction recovery of the crustacean *Daphnia magna* after chronic exposure to ibuprofen. *Ecotoxicology*, 17, pp. 246 – 251.

Heckmann, L.H., Callaghan, A., Helen L. Hooper, H.L., Connon, R., Hutchinson, T.H., Maund, S.J., Sibly, R.M. (2007). Chronic toxicity of ibuprofen to *Daphnia magna*: Effects on life history traits and population dynamics. *Toxicology Letters*, 172, pp. 137 – 145.

Henschel, K.P., Wenzel, A., Diedrich, M., Fliedner, A. (1997). Environmental hazard assessment of pharmaceuticals. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 25(3), pp. 220 – 225.

Herklotz, P.A., Gurung, P., Heuvel, B.V., Kinney, C.A. (2010). Uptake of human pharmaceuticals by plants grown under hydroponic conditions. *Chemosphere*, 78, pp. 1416 – 1421.

Hirsch, R., Ternes, T., Herberer, K. (1999). Occurrence of antibiotics in the aquatic environment. *Science of the Total Environment*, 225, pp. 109 – 118.

Hobaek, A., Larsson, P. (1990). Sex determination in *Daphnia magna*. *Ecology*, 71, pp. 2255 – 2268.

Holm, J.V., Rugge, K., Bjerg, P.L., Christensen, T.H. (1995). Occurrence and distribution of pharmaceutical organic-compounds in the groundwater downgradient of a landfill (Grindsted, Denmark). *Environmental Science & Technology*, 29 (5), pp. 1415 – 1420.

Huber, C., Bartha, B., Harpaintner, R., Schröder, P. (2009). Metabolism of acetaminophen (paracetamol) in plants-two independent pathways result in the formation of a glutathione and a glucose conjugate. *Environmental Science Pollution Research*, 16, pp. 206 – 213.

Jaeschke, H., Bajt, M.L. (2006). Intracellular signaling mechanisms of acetaminophen-induced liver cell death. *Toxicological Sciences*, 89, pp. 31 – 41.

Jaeschke, H., Knight, T.R., Bajt, M.L. (2003). The role of oxidant stress and reactive nitrogen species in acetaminophen hepatotoxicity. *Toxicology Letters*, 144, pp. 279 – 288.

Jemec, A., Drobne, D., Tisler, T., Sepeié, K. (2010). Biochemical biomarkers in environmental studies – lessons learnt from enzymes catalase, glutathione S-transferase and cholinesterase in two crustacean species. *Environmental Science and Pollution Research*, 17, pp. 571 – 581.

Jones, O.A.H., Voulvoulis, N., Lester, J.N. (2002). Aquatic environmental assessment of the top 25 English prescription pharmaceuticals. *Water Research*, 36, pp. 5013 – 5022.

Joss, A., Keller, E., Alfredo, A.C. (2005). Removal of pharmaceuticals and fragrances in biological waste water treatment. *Water Research*, 39, pp. 3139 – 3152.

Kay, P., Blackwell, P.A., Boxall, A.B.A. (2005). Transport of veterinary antibiotics in overland flow following the application of slurry to arable land. *Chemosphere*, 59, pp. 951 – 959.

Kemper, N. (2008). Veterinary antibiotics in the aquatic and terrestrial environment. *Ecological Indicators*, 8, pp. 1 – 13.

Kidd, K.A., Blanchfield, P.J., Mills, K.H., Palace, V.P., Evans, R.E., Lazorchak, J.M., Flick, R.W. (2007). Collapse of a fish population after exposure to a synthetic estrogen. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States*, 104, pp. 8897 – 8901.

Kim, Y., Choi, K., Jung, J., Park, S., Kim, P.-G., Park, J. (2007). Aquatic toxicity of acetaminophen, carbamazepine, cimetidine, diltiazem and six major sulfonamides, and their potential ecological risks in Korea. *Environment International*, 33, pp. 275 – 370.

Kim, P., Park, Y., Ji, K., Seo, J., Lee, S., Choi, K., Kho, Y., Park, J., Choi K. (2012). Effect of chronic exposure to acetaminophen and lincomycin on japonese medaka

(*Oryzias latipes*) and freshwater cladocerans *Daphnia magna* and *Moina macrocopa*, and potential mechanisms of endocrine disruption. *Chemosphere*, 89, pp. 10 – 18.

Kinney, C.A., Edward, F.T., Zaugg, S.D. (2006). Survey of organic wastewater contaminants in biosolids destined for land application. *Environmental Science & Technology*, 40, pp. 7207 – 7215.

Kleiven, O.T., Larsson, P., Hobaek, A. (1992). Sexual reproduction in *Daphnia magna* requires three stimuli. *Oikos*, 65, pp. 197 – 206.

Koivisto, S. (1995). Is *Daphnia magna* an ecologically representative zooplankton species in toxicity tests? *Environmental Pollution*, 90, pp. 263 – 267.

Kolpin, D.K., Furlong, E.T., Meyer, M.T. *et al.* (2002). Pharmaceuticals, hormones, and other organic wastewater contaminants in US streams, 1999–2000: A national reconnaissance. *Environmental Science & Technology*, 36, pp. 1202 – 1211.

Kühn, R., Pattard, M., Pernak, K-D, Winter, A. (1989). Results of the harmful effects of selected water pollutants (anilines, phenols, aliphatic compounds) to *Daphnia magna*. *Water Research*. 23, pp. 495 – 499.

Lapworth, D.J., Baran, N., Stuart, M.E., Ward, R.S. (2012). Emerging organic contaminants in groundwater: A review of sources, fate and occurrence. *Environmental Pollution*, 163, pp. 287 – 303.

Li, D., Yang, M., Hu, J., Zhang, Y., Chang, H., Jin, F. (2008). Determination of penicillin G and its degradation products in a penicillin production wastewater treatment plant and the receiving river. *Water Research*, 42, pp. 307 – 317.

Lichtenthaler, H.K. (1987). Chlorophylls and Carotenoids: Pigments of photosynthetic biomembranes. *Methods in Enzymology*, 148, pp. 350 – 382.

Lilius, H., Hastbacka, T., Isomaa, B. (1995). A comparison of the toxicity of 30 reference chemicals to *Daphnia magna* and *Daphnia pulex*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 14, pp. 2085 – 2088.

- Lindqvist, N., Tuhkanen, T., Kronberg, L. (2005). Occurrence of acidic pharmaceuticals in raw and treated sewages and in receiving waters. *Water Research*, 39, pp. 2219 – 2228.
- Livingstone, R. (1991). Organic xenobiotic metabolism in marine invertebrates. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 7, pp. 5 – 185.
- Livingstone, D.R. (2001). Contaminated-stimulated reactive oxygen species production and oxidative damage in aquatic organisms. *Marine Pollution Bulletin*, 42, pp. 656 – 666.
- Lourenção, B.C., Medeiros, R.A., Filho, R.C.R. *et al.* (2009). Simultaneous voltammetric determinate on of paracetamol and caffeine in pharmaceutical formulations using a borondoped diamond electrode. *Talanta*, 78, pp. 748 – 752.
- Magalhães, D.P., Filho, A.S.F. (2008). A ecotoxicologia como ferramenta no biomonitoramento de ecossistemas aquáticos. *Oecologia Brasiliensis*, 12, pp. 355 – 381.
- Miao, X.S., Koenig, B.G., Metcalfe, C.D. (2002). Analysis of acidic drugs in the effluents of sewage treatment plants using liquid chromatography-electrospray ionisation tandem mass spectrometry. *Journal Chromatography A*, 952, pp. 139 – 147.
- Morse, H.N. (1878). Ueber eine neue Darstellungsmethode der Acetylamidophenole. *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft*, 11, pp. 232 – 233.
- Newman, M.C., Unger, M.A. (2003). *Fundamentals of Ecotoxicology*. 2ª Edição. Florida, Lewis Publisher, pp. 172 – 177.
- Nunes, B., Carvalho, F., Guilhermino, L. (2005). Acute toxicity of widely used pharmaceuticals in aquatic species: *Gambusia holbrooki*, *Artemia parthenogenetica* and *Tetraselmis chuii*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 61, pp. 413 – 419.
- Nunes, B., Carvalho, F., Guilhermino, L. (2006). Effects of widely used pharmaceuticals and a detergent on oxidative stress biomarkers of the crustacean *Artemia parthenogenetica*. *Chemosphere*, 62, pp. 581 – 594.
- Nunes, B., Gaio, A.R., Carvalho, F., Guilhermino, L. (2008). Behaviour and biomarkers of oxidative stress in *Gambusia holbrooki* after acute exposure to widely used

pharmaceuticals and a detergent. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 71, pp. 341 – 354.

OECD. (1984). OECD Guidelines for testing chemicals 204: Fish, Prolonged Toxicology Test: 14 – day Study .

OECD. (1992). OCDE Guidelines for testing Chemicals 203: Fish, Acute Toxicity Test.

OECD. (1998). OECD Guideline for the Testing of Chemicals 211: *Daphnia magna* Reproduction Test.

OECD. (2004). OECD Guideline for the Testing of Chemicals 202: *Daphnia* sp. Acute Immobilisation Test.

OECD. (2006). OECD Guideline for the Testing of Chemicals 221: *Lemna* sp. Growth Inhibition Test.

Ortega-Villasante, C., Rellán-Álvarez, R., Del Campo, F.F. *et al.* (2005). Cellular damage induced by cadmium and Mercury in *Medicago sativa*. *Journal of Experimental Botany*, 56, pp. 2239 – 2251.

Pandolfini, C., Bonati, M. (2005). A literature review on off-label drug use in children. *European Journal of Pediatrics*, 164, pp. 552 – 558.

Voogt, P., Janex-Habibi, M.L., Sancher, F. (2009). Development of a common priority list of pharmaceuticals relevant for the water cycle. *Water Science & Technology*, 59, pp. 39 – 46.

Parolini, M., Binelli, A., Cogni, D., Provini, A. (2010). Multi-biomarker approach for the evaluation of the cyto-genotoxicity of paracetamol on the zebra mussel (*Dreissena polymorpha*). *Chemosphere*, 79, pp. 489 – 498.

Peakall, D. (1992). *Animal Biomarkers as Pollution Indicators*. London, Chapman & Hall, pp. 20 – 37.

Peakall, D. (1994). The role of biomarkers in environmental assessment (1). Introduction. *Ecotoxicology*, 3, pp. 157 – 160.

- Persson, M., Sabelstrom, E., Gunnarsson, B. (2009). Handling of unused prescription Drugs - knowledge, behaviour and attitude among Swedish people. *Environment International*, 35, pp. 771 – 774.
- Pery, A.R.R., Gust, M., Vollat, B., Mons, R., Ramil, M., Fink, G., Ternes, T., Garric, J. (2008). Fluoxetine effects assessment on the life cycle of aquatic invertebrates. *Chemosphere*, 73, pp. 300 – 304.
- Preston, B. (2002). Indirect effects in aquatic ecotoxicology: Implications for ecological risk assessment. *Environmental Management*, 29, pp. 331 – 323.
- Ramade, F. (1977). *Écotoxicologie*. Paris, Masson Publisher, pp. 205.
- Rand, G.M., Petrocelli, S.R. (1985). *Fundamentals of aquatic toxicology*. Washington, Hemisphere Publishing, pp. 665.
- Rang, H.P., Dale, M.M., Ritter, J.M., Flower, R.J. (2008). Fármacos anti-inflamatórios e imunossupressores. In: Rang, H.P., Dale, M.M., Ritter, J.M. et al. (Eds.). *Rang & Dale Farmacologia*. 6ª Edição. Rio de Janeiro, Elsevier, pp. 226 – 247.
- Rattner, B.A. (2009). History of wildlife toxicology. *Ecotoxicology*, 18, pp. 773 – 783.
- Razinger, J., Dermastia, M., Koce, J.D., Zrimec, A. (2008). Oxidative stress in duckweed (*Lemna minor* L.) caused by short-term cadmium exposure. *Environmental Pollution*, 153, 687 – 694.
- Roberts, P.H., Thomas, K.V. (2006). The occurrence of selected pharmaceuticals in wastewater effluent and surface waters of the lower Tyne catchment. *Science of the Total Environment*, 356, pp. 143 – 153.
- Schmitt – Jansen, M., Veit, U., Dudel, G., Altenburger, R. (2008). An ecological perspective in aquatic ecotoxicology: Approaches and challenges. *Basic and Applied Ecology*, 9, pp. 337 – 345.
- Schröder, P., Collins, C.J. (2002) Conjugating enzymes involved in xenobiotic metabolism of organic xenobiotics in plants. *International Journal of Phytoremediation*, 4, pp. 247 – 265.

Shihana, F., Dissanayake, D., Dargan, P., Dawson, A. (2010). A modified low-cost colorimetric method for paracetamol (acetaminophen) measurement in plasma. *Clinical Toxicology*, 48, pp. 42 – 46.

Snyder, M.J. (2000). Cytochrome P450 enzymes in aquatic invertebrates: Recent advances and future directions. *Aquatic Toxicology*, 48, pp. 529 – 547.

Santos, L.H.M.L.M.; Araújo, A.N.; Fachini, A., Pena, A., Delerue-Matos, C., Montenegro, M.C. (2010). Ecotoxicological aspects related to the present of pharmaceuticals in the aquatic environment. *Journal of Hazardous Materials*, 175, pp. 45 – 95.

Sole', M., Shaw, J.P., Frickers, P.E., Readman, J.W., Hutchinson, T.H. (2010). Effects on feeding rate and biomarker responses of marine mussels experimentally exposed to propranolol and acetaminophen. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 396, pp. 649 – 656.

Stackelberg, P.E., Furlong, E.T., Meyer, M.T., Zaugg, S.D., Henderson, A.K., Reissman, D.B. (2004). Persistence of pharmaceutical compounds and other organic wastewater contaminants in a conventional drinking-water-treatment plant. *Science of the Total Environment*, 329, pp. 99 – 113.

Stein, J.R. (1973). Handbook of Phycological Methods – Culture Methods and Growth Measurements. Cambridge, Cambridge University Press.

Stumpf, M., Ternes, T.A., Haberer, k. (1998). Isolierung von Ibuprofen – Metaboliten und deren Bedcutung als Kontaminanten der aquatischen Umwelt. *Vom Wasser*, 91, pp. 291 – 303.

Stumpf, M., Ternes, T.A., Wilken, R.D., Rodrigues, S.V., Baumann, W. (1999). Polar residues in sewage and natural waters in the state of Rio de Janeiro, Brazil. *Science of the Total Environment*, 225, pp. 135 – 141.

Tatarazako, N., Oda, S. (2007). The water flea *Daphnia magna* (Crustacea, Clodocera) as a test species for screening and evaluation of chemicals with endocrine disrupting effects on crustaceans. *Ecotoxicology*, 16, pp. 197 – 203.

- Timbrell, J.A. (1998). Biomarkers in toxicology. *Toxicology*. 129, pp. 1 – 12.
- Teodorović, I., Knežević, V., Tunić, T., Čučak, M., Lečić, J.N., Leovac, A., Tumbas, I.I. (2011). *Myriophyllum aquaticum* versus *Lemna minor*: sensitivity and recovery potential after exposure to atrazine. *Environmental Toxicology and Chemistry*; 31, pp. 417 – 426.
- Ternes, A.T. (1998). Occurrence of drugs in german sewage treatment plants and rivers. *Water Research*, 32, pp. 3245 – 3260.
- Topp, E., Monteiro, S.C., Beck, A., Coelho, B.B., Boxall, A.B.A., Duenk, P.W., Kleywegt, S., Lapen, D.R., Payne, M., Sabourin, L., Li, H., Metcalfe, C.D. (2008). Runoff of pharmaceuticals and personal care products following application of biosolids to an agricultural field. *Science of the Total Environment*, 396, pp. 52 – 59.
- Truhaut, R. (1977). Ecotoxicology: objectives, principles and perspectives. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 1, pp. 151 – 173.
- USEPA – Environmental Protection Agency. (1996). Aquatic invertebrate toxicity test, freshwater daphnids: ecological effects test guidelines. EPA 712-C-96-114.
- USEPA – Environmental Protection Agency. (2002). Methods for measuring the acute toxicity of effluents and receiving waters to freshwater and marine organisms. EPA 821-R-02-1.
- USEPA – Environmental Protection Agency. (2002). Short-term methods for estimating the chronic toxicity of effluents and receiving waters to freshwater organisms. 4th Edition. U.S. Environmental Protection Agency Office of Water, Washington. EPA-821-R-02-013.
- van der Oost, R., Beyer, J., Vermeulen, N.P.E. (2003). Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 13, pp. 57 – 149.
- Von Mering, J. (1893). Beitrage zur Kenntniss der Antipyretica. *Therapeutische Monatshefte*, 7, pp. 577 – 587.

Walker, C.H. (1992). Biochemical responses as indicators of toxic effects of chemicals in ecosystems. *Toxicology Letters*, 64/65, pp. 527 – 533.

Walker, C., Hopkin, S., Sibly, R., Peakall, D. (2001). *Principles of Ecotoxicology*. 2<sup>a</sup> Edição. New York, Taylor and Francis, pp. 35 – 205.

Xia, K., Bhandari, A., Das, K., Pillar, G. (2005). Occurrence and fate of pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) in biosolids. *Journal Environmental Quality*, 34, pp. 91 – 104.

Xu, J.J., Hendriks, B.S., Zhao, J., Graaf, D. (2008). Multiple effects of acetaminophen and p38 inhibitors: Towards pathway toxicology. Minireview. *FEBS Letters*, 582, pp. 1276 – 1282.

Yang, L., Yu, L.E., Ray, M.B. (2008). Degradation of paracetamol in aqueous solutions by TiO<sub>2</sub> photocatalysis. *Water Research*, 42, pp. 3480 – 3488.

Zwiener, C., Gremm, T.J., Frimmel, F.H. (2001). Pharmaceutical residues in the aquatic environment and their significance for drinking water production. In: Kummerer, K. (Ed.). *Pharmaceuticals in the Environment: Sources, Fate, Effects and Risks*. Berlin, Springer, pp. 81 – 89.