



**MARIA DE FÁTIMA
PINTO BRANDÃO**

Impacto de fármacos em biomarcadores de *Lepomis gibbosus*



**MARIA DE FÁTIMA
PINTO BRANDÃO**

Impacto de fármacos em biomarcadores de *Lepomis gibbosus*

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Biologia Aplicada-Ramo Toxicologia e Ecotoxicologia, realizada sob a orientação científica do Doutor Bruno André Fernandes de Jesus da Silva Nunes, Professor Auxiliar da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade Fernando Pessoa e da co-orientação do Doutor Bruno Branco Castro, Equiparado a Investigador Auxiliar do Departamento de Biologia e CESAM, Universidade de Aveiro.

Dedico este trabalho aos meus pais, madrinha, afilhado, Rui e todos aqueles que de forma directa ou indirecta me apoiaram, acompanharam e acreditaram que era capaz de atingir e concluir esta etapa.

o júri

Presidente

Doutor António José Arsénia Nogueira

Professor associado com agregação, Departamento de Biologia, Universidade de Aveiro

Doutora Joana Luísa Lourenço Estevinho Pereira

Investigador Pós-Doutoramento, Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro

Doutor Bruno André Fernandes de Jesus da Silva Nunes

Professor auxiliar da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade Fernando Pessoa

Doutor Bruno Branco Castro

Investigador auxiliar do Departamento de Biologia e CESAM, Universidade de Aveiro

Agradecimentos

Ao Professor Doutor Fernando Gonçalves pela oportunidade de fazer parte desta equipa (LEADER) e acesso a todas as condições no seu laboratório necessárias ao desenvolvimento desta dissertação.

Ao Professor Doutor Bruno Nunes, pelo apoio científico e incentivos constantes, essenciais à elaboração da presente dissertação e especialmente pela sua compreensão, forma exigente e crítica de abordar os assuntos.

Ao Doutor Bruno Castro por todo apoio disponibilizado de forma irrestrita, ajuda e esclarecimento das dúvidas surgidas ao longo da elaboração desta dissertação e especialmente por me inculcir ânimo e força nos momentos mais difíceis.

A Doutora Sara Antunes por toda ajuda e disponibilidade prestadas durante a realização prática deste trabalho essenciais para o seu êxito.

Ao Sr. Aldiro e ao Doutor José Vingada e sua equipa (Sociedade Portuguesa de Vida Selvagem e da Universidade do Minho, Portugal) pelo empréstimo das redes de pesca.

Aos meus colegas, mas também amigos de laboratório, pelo incentivo, apoio, partilha de conhecimento e boa disposição com que contribuíram ao longo destes anos para o meu crescimento não só científico mas também pessoal.

As minhas amigas de longa data e companheiras de todos dias nesta etapa, especialmente a Sara por todo o apoio, ajuda tanto a nível laboratorial como de escrita e por ser a confidente em todos aqueles momentos em que a força me faltou; a Rita por ser aquela resmungona que sempre me inculciu a perfeição, mas também por me meter a sorrir quando a vontade era chorar e por ser a companheira de casa mais leal até ao momento; a Catarina pelo apoio e força que sempre me prestou. Também lhes agradeço todos os momentos de barga, risadas e brincadeira que tanto contribuíram para manter a estabilidade da minha vida ao longo deste tempo.

A todos os amigos que fiz ao longo desta jornada que me proporcionaram momentos de grande alegria e os quais ficaram eternos nesta fase da minha vida e espero continuar manter contacto nas novas etapas que se avizinham.

Ao Pisco por me apoiar em todos momentos, me dar a calma, a estabilidade e a ajuda necessárias para elaboração desta dissertação. Para além, do amor e companheirismo de grande valia para mim.

Por fim, aos meus Pais, Madrinha, Rui, Tiaguinho, Irmão e Avó, por terem sempre apostado em mim, dando-me apoio incondicional e força para ultrapassar mais esta etapa. Sem eles não teria sido possível atingir mais esta meta como todas as outras que me trouxeram até ela.

palavras-chave

fármacos, diazepam, carbamazepina, fenitoína, biomarcadores, stress oxidativo, *Lepomis gibbosus*.

resumo

A presença de resíduos farmacêuticos no ambiente aquático tem recentemente recebido grande atenção desde que níveis elevados de contaminação foram encontrados, não só nos efluentes de estações de tratamento de águas residuais, mas também em águas superficiais. Os compostos farmacêuticos são continuamente dispersos no ambiente, como resultado do uso humano e veterinário, e constituem uma preocupação ambiental relevante. Apesar das concentrações dos compostos farmacêuticos encontradas no meio ambiente se situarem numa gama que varia de ng L^{-1} a $\mu\text{g L}^{-1}$, estas podem ser suficientes para induzir efeitos tóxicos ao nível dos organismos não-alvo. Desta forma, o estudo dos efeitos tóxicos destes compostos em espécies não-alvo é necessário e essencial. Assim, o objectivo do presente estudo foi investigar os efeitos da carbamazepina, diazepam e fenitoína, três drogas anticonvulsivantes encontradas em concentrações relativamente elevadas no ambiente, em parâmetros de stress oxidativo no peixe de água doce *Lepomis gibbosus*. Para o efeito, foram quantificados biomarcadores enzimáticos de stress oxidativo – nomeadamente, a catalase (CAT), a glutathione reductase (GR) e as glutathione S-transferases (GST) – e de dano oxidativo (peroxidação lipídica - TBARS) no tecido hepático, digestivo e branquial de animais expostos a concentrações sub-letais destes compostos. O objectivo central foi o de investigar os padrões de resposta nesses tecidos e quantificar a extensão das alterações causadas pelos xenobióticos mencionados.

As actividades das enzimas dos peixes expostos ao diazepam revelaram diferenças significativas pontuais em determinados órgãos, nomeadamente um aumento da actividade das GSTs das brânquias e uma inibição da glutathione reductase no tubo digestivo, relativamente ao controlo. Na exposição de *Lepomis gibbosus* a carbamazepina, observou-se também diferenças significativas pontuais nas respostas dos biomarcadores avaliados, nomeadamente o aumento da actividade das GSTs e GRed no tubo digestivo relativamente ao controlo. Por último, a exposição de fenitoína foi responsável por respostas adaptativas nas actividades da CAT e GST ao nível do fígado, nomeadamente um aumento significativo da sua actividade.

As respostas dos biomarcadores aos três compostos não permitiram sustentar um cenário de dano oxidativo, mas verificou-se que o sistema antioxidante desenvolve respostas adaptativas à sua presença, algumas das quais em concordância com estudos anteriores.

keywords

pharmaceuticals, diazepam, carbamazepine, phenytoin, biomarkers, stress oxidative, *Lepomis gibbosus*.

The presence of pharmaceutical residues in the aquatic environment has recently received a considerable amount of attention ever since elevated ambient concentrations of these xenobiotics were found, not only in wastewater, but also in superficial waters. Pharmaceutical compounds are continuously dispersed onto the environment, as a result of human and veterinary use, and they constitute a relevant environmental concern. Despite environmental concentrations of pharmaceutical compounds are in the range of ng L^{-1} to $\mu\text{g L}^{-1}$, they can still elicit toxic effects in organisms. In this way, the study of toxic effects of these xenobiotics in non-target organisms is vital.

Thus, the goal of the present study was to investigate the effects of carbamazepine, diazepam, and fenitoin – three anticonvulsivant drugs found in relatively high ambient concentrations – in the freshwater fish, *Lepomis gibbosus*. To do so, a biomarker approach was used, by quantifying oxidative stress enzymes (namely catalase – CAT, glutathione reductase – GR, and glutathione S-transferase – GST) and oxidative damage biomarkers (lipid peroxidation – TBARS) in the hepatic, digestive, and gill tissues of animals exposed to sub-lethal concentrations of the above substances. The main objective was to investigate the response patterns in these tissues and to quantify the extension of the alterations caused by the xenobiotics.

The activities of enzymes of fish exposed to diazepam revealed occasional significant differences in some of the biomarkers in certain organs, namely an increase in GST activities in the gills and an inhibition of GR in the digestive tube, relatively to the control. In the exposure to carbamazepine, we also observed inconsistent effects in the biomarkers tested, namely an increase in GST and GRed activity in the digestive tube, relatively to the control. Finally, exposure of phenytoin was responsible for adaptive responses in the activities of CAT and GST in the liver, including a significant increase in its activity.

The responses of biomarkers to three compounds failed to support a scenario of oxidative damage, but it was found that the antioxidant system develops adaptive responses to their presence, some of which are in agreement with previous studies.

Índice

| | |
|---|----|
| 1. Introdução geral..... | 3 |
| 1.1. Contaminação do meio aquático por xenobióticos | 3 |
| 1.1.1. Compostos farmacêuticos - fonte de contaminação do ambiente | 3 |
| 1.2. Ecotoxicologia e bioensaios..... | 5 |
| 1.2.1. Biomarcadores | 7 |
| 1.2.1.1. Biotransformação de xenobióticos - Enzimas de biotransformação..... | 9 |
| 1.2.1.2. Biomarcadores de stress oxidativo | 10 |
| 1.3. Peixes como modelos ecotoxicológicos - <i>Lepomis gibbosus</i> (perca sol) | 12 |
| 1.4. Objectivo e partes integrantes da tese..... | 14 |
| | |
| 2. Material e métodos | 17 |
| 2.1. Características dos fármacos (diazepam, carbamazepina e fenitoína)..... | 17 |
| 2.2. Produtos químicos e organismo de ensaio..... | 18 |
| 2.3. Ensaios <i>in vivo</i> | 19 |
| 2.4. Quantificação dos marcadores bioquímicos | 19 |
| 2.5. Análise estatística | 21 |
| | |
| 3. Resultados..... | 25 |
| 3.1. Diazepam..... | 25 |
| 3.2. Carbamazepina | 28 |
| 3.3 Fenitoína..... | 31 |
| | |
| 4. Discussão..... | 39 |
| 4.1. Diazepam..... | 39 |
| 4.2. Carbamazepina | 42 |
| 4.3. Fenitoína..... | 43 |
| | |
| 5. Conclusões gerais | 47 |
| | |
| 6. Referências bibliográficas | 51 |

INTRODUÇÃO GERAL

1. Introdução geral

1.1. Contaminação do meio aquático por xenobióticos

Os ecossistemas são continuamente expostos a produtos químicos estranhos aos sistemas biológicos (xenobióticos), resultantes de comunidades urbanas, indústrias e agricultura (Danzo, 1997; van der Oost et al., 2003; Fontáinhas-Fernandes, 2005). Os ecossistemas aquáticos são considerados os receptores finais dos contaminantes libertados no ambiente, tanto de origem natural quanto antropogénica. Isto torna os sistemas aquáticos susceptíveis à acção de contaminantes dispersos por via aérea, que chegam aos corpos de água por deposição atmosférica, e contaminantes terrestres que atingem os ambientes aquáticos através da lixiviação dos solos (Kime, 1999 e van der Oost et al., 2003). As descargas urbanas, agrícolas e industriais representam as principais fontes de contaminação em rios, estuários e oceanos (Kime, 1999). Poluentes como hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (PAHs), bifenilos policlorados (PCBs), compostos organoclorados (OCs) e metais pesados estão entre as principais classes de contaminantes que são frequentemente encontradas nestes ecossistemas (van der Oost et al., 2003; Domingos, 2006). Os fármacos e os produtos de cuidado pessoal também têm ganho grande importância ao nível da contaminação aquática, por se apresentarem omnipresentes no ambiente aquático (Sanderson et al., 2004). Por este motivo, têm recebido cada vez mais atenção dos órgãos ambientais e de saúde em toda a União Europeia (UE) e América do Norte (Daughton e Ternes, 1999).

A presença pontual de xenobióticos num ecossistema aquático não é, por si só, indicadora de efeitos prejudiciais. Desta forma, devem ser estabelecidas ligações entre os níveis de exposição externa, os níveis de contaminação interna dos tecidos e o início de efeitos adversos (van der Oost et al., 2003). Muitos dos compostos orgânicos hidrofóbicos e seus metabolitos que contaminam os ecossistemas aquáticos ainda precisam ser identificados, e o seu impacto na vida aquática ainda não foi determinado. Assim, a exposição, destino e os efeitos de contaminantes químicos ou poluentes no ecossistema aquático têm sido extensivamente estudados por toxicologistas ambientais.

1.1.1. Compostos farmacêuticos - fonte de contaminação do ambiente

Uma das classes de xenobióticos que nos últimos anos se encontra em foco ao nível da toxicologia ambiental corresponde aos compostos farmacêuticos utilizados na medicina humana e veterinária, agricultura e aquacultura (Laville et al., 2004; Oggier et al., 2010). Muitos dos fármacos aplicados em cuidados médicos humanos não são totalmente eliminados pelo organismo (Heberer, 2002), e são frequentemente excretados apenas ligeiramente transformados ou mesmo inalterados através das fezes e da urina (De Lange et al., 2006; Li e Randak, 2009; Nunes, 2010). Uma vez eliminados, a maioria deles passa por uma estação de tratamento de águas residuais

(ETAR), sendo posteriormente introduzidos nas águas de superfície com o efluente tratado (McQuillan et al., 2002). Como os tratamentos de águas residuais convencionais geralmente não são eficazes na remoção de muitos fármacos e seus metabolitos, este efluente é considerado uma fonte importante e contínua de entrada de drogas no ambiente aquático (Brun et al., 2006; De Lange et al., 2006; Li e Randak, 2009; Li et al., 2009). A eficiência de remoção das ETARs varia tanto de um grupo de substâncias para o outro, como de um ingrediente activo para outro dentro do mesmo grupo farmaco-terapêutico (Schrapp et al., 2003). As taxas de remoção avaliadas em ETARs holandesas são, em média, inferiores a 25% para os antibióticos, entre 10 e 80% para os anti-epilépticos, betabloqueadores e agentes de redução lipídica, e superiores a 95% para os analgésicos (Schrapp et al., 2003; De Lange et al., 2006). As substâncias farmacêuticas que não são degradadas durante os tratamentos de águas residuais, segundo alguns estudos já realizados, mostram indícios de também não serem degradadas no ambiente (Ternes, 1998; Daughton e Ternes, 1999).

Vários estudos (Ternes, 1998; Jones et al, 2002; Miao et al., 2002; Ferrari et al., 2003; Metcalfe et al., 2003a; Koutsouba et al., 2003; Tixier et al., 2003; Roberts e Thomas, 2006; Lishman et al, 2006, Benotti et al., 2009) realizados durante as últimas décadas permitiram detectar muitos resíduos farmacêuticos no ambiente aquático, especialmente em efluentes de águas residuais, águas superficiais e subterrâneas, águas residuais não tratadas, na proximidade de estações de tratamento de águas residuais (ETARs), e mesmo em água potável da rede de distribuição. Os compostos farmacêuticos e seus metabolitos normalmente encontrados em ambientes aquáticos incluem antibióticos (sulfametoxazol, oxitetraciclina), anticonvulsivos (carbamazepina), anti-inflamatórios (ibuprofeno, naproxeno), antidiabéticos (bezafibrato, gemfibrozil) (Fent et al., 2006), antipiréticos, citostáticos, e hormonas (Yang et al., 2008 e Ganiyat, 2008). Estes compostos chegam às massas de água através de várias fontes, tais como a eliminação directa de medicamentos excedentes em domicílios, a excreção nas fezes e na urina por seres humanos e animais após o uso terapêutico, e tratamento inadequado de efluentes de fabricação (Yang et al., 2008; Ganiyat, 2008; Li e Randak, 2009). Para além das fontes já referidas, os tratamentos e profilaxia através da água em pisciculturas constituem uma fonte adicional (Brillas et al., 2005 e Thomas et al. 2007), bem como o tratamento e cuidados de animais de estimação e ao nível da pecuária (Thomas et al., 2007). Nos casos em que as lamas dos sistemas de tratamento de águas residuais são utilizadas em campos agrícolas, estas podem contaminar os solos destes campos (Fent et al., 2006), podendo estes por sua vez, contaminar as águas subterrâneas através da lixiviação. Para além desta contaminação, as águas subterrâneas podem também receber compostos farmacêuticos através de lixiviados de aterros sanitários, ou de resíduos de produção (Li e Randak, 2009).

Os produtos farmacêuticos e os produtos de higiene de pessoal utilizados pelos humanos numa base diária são de certa maneira particulares quando se considera o vasto número de substâncias químicas, de origem antropogénica, que são encontradas no compartimento aquático. Os agentes terapêuticos e produtos para cuidados pessoais têm uma ampla distribuição no ambiente, como consequência do seu uso contínuo por populações humanas (Daughton e Ternes, 1999). Estes produtos químicos são utilizados devido à sua actividade biológica, que é o parâmetro mais importante a ser considerado quando se avalia o seu impacto toxicológico no ecossistema aquático (Halling-Sørensen et al., 1998; Daughton e Ternes, 1999; Jones et al., 2002; Miao et al., 2002). Além da actividade biológica, estes compostos também são desenhados para afectar especificamente os órgãos-alvo, sendo desta forma desenhados para serem resistentes à degradação metabólica (Li et al., 2010a), de modo a manterem a sua estrutura química o tempo suficiente para desempenharem o seu papel terapêutico (Ternes e Hirsch, 2000; Quinn et al., 2008). Mais, estes compostos são normalmente lipofílicos, e a sua lipofilicidade é um requisito básico para serem bem absorvidos pelo organismo. A soma destes factores contribui para a importância global da sua persistência no ambiente. Outro aspecto a ter em conta quando se estuda o destino ambiental e os efeitos de compostos farmacêuticos e produtos de uso pessoal está relacionado com a variedade de metabolitos formados e as possíveis interacções toxicológicas entre os resíduos farmacêuticos (por exemplo, sinérgicas, aditivas, antagónicas) em organismos não alvo no estado selvagem (Clevers, 2003). Em suma, uma parte considerável dos compostos farmacêuticos e produtos para cuidados pessoais pode ser considerada como uma classe de contaminantes ambientais activos, eficazes e persistentes.

Os compostos farmacêuticos são geralmente detectados no meio ambiente numa gama que varia de ng L^{-1} a $\mu\text{g L}^{-1}$ (Heberer, 2002), mas que pode ser suficiente para induzir efeitos tóxicos (Hernando et al., 2006). Os fármacos antiepilépticos são dos compostos farmacêuticos encontrados no ambiente em concentrações mais elevadas (reflectindo o seu uso geral ao nível da população) (Schrap et al., 2003), sendo alguns desses fármacos o diazepam, a carbamazepina e a fenitoína. Desta forma, o estudo dos efeitos tóxicos destes compostos em espécies não-alvo é necessário e essencial.

1.2. Ecotoxicologia e bioensaios

O termo Ecotoxicologia foi introduzido pelo professor e pesquisador francês René Truhaut, em 1969 (Azevedo e Chasin, 2004; Walker et al., 2001), reunindo a designação eco- (do grego *oïkos*, elemento de composição com o significado casa, domicílio, habitat, meio ambiente) e a palavra *toxicologia* (ciência dos agentes tóxicos, dos venenos e intoxicação) (Azevedo e Chasin, 2004). A ecotoxicologia é assim definida como o estudo dos efeitos de substâncias tóxicas

(compostos químicos) sobre a ecologia das populações, comunidades e ecossistemas, de maneira integrada com os estudos toxicológicos. Interessa-se também pela análise do destino (transporte, transformação e extinção) destas substâncias tóxicas no ambiente e baseia-se em estudos científicos utilizando tanto métodos de campo como de laboratório (Klaassen, 2001; Walker et al., 2001).

Uma das primeiras grandes preocupações dos ecotoxicologistas foi a padronização das ferramentas a usar, nomeadamente os bioensaios de toxicidade e de se estabelecer parâmetros de comparação entre estes (Cairns e Pratt, 1989). Em termos ecotoxicológicos, os bioensaios usam-se para prever os níveis de substâncias químicas que não produzem nenhum efeito adverso sobre as populações, comunidades e ecossistemas e identificar recursos biológicos em risco (Cairns e Pratt, 1989). Diferentemente dos testes toxicológicos padrão, que buscam definir a relação de causa-efeito com determinadas concentrações de exposição a substâncias tóxicas num local receptor sensível, as tentativas de ensaios ecotoxicológicos visam avaliar as causas e efeitos em níveis mais elevados de organização, mas principalmente sobre as populações (Klaassen, 2001).

Entidades como a “American Society for Testing and Materials” (ASTM) ou a “American Public Health Association” (APHA) foram pioneiras no estabelecimento de protocolos padronizados para a realização de testes de toxicidade (Castro, 2001). Inicialmente, foi dado grande destaque à toxicidade aguda, mas rapidamente se reconheceu que o cenário de exposição dos seres vivos a contaminantes era do tipo crónico, ou seja, os organismos estão continuamente expostos a níveis subletais de contaminantes. Os testes de toxicidade crónica são estudos em que os organismos são expostos a diferentes concentrações de uma substância química e são observados por um período longo de tempo, ou uma parte substancial do seu ciclo de vida (Crane et al., 2006). Em contraste com os testes de toxicidade aguda, que muitas vezes usam a mortalidade como a única medida de efeito, os testes crónicos são usados para estimar a concentração que não provoca efeitos no crescimento ou reprodução, valor esse que é usado no estabelecimento de critérios de qualidade da água, por exemplo (Cairns e Pratt, 1989; Crane et al., 2006)

Relativamente aos efeitos dos compostos farmacêuticos sobre espécies não-alvo no ambiente, existe ainda pouca informação. A avaliação da toxicidade aguda dos compostos farmacêuticos tem sido feita através dos tradicionais testes padronizados de acordo com as directrizes estabelecidas (ex. Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Económico (OCDE), Agência de Protecção Ambiental dos Estados Unidos (USEPA), Organização Internacional de Normalização (ISO)) e estudos como os de Nunes et al. (2004, 2006, 2008) utilizando organismos de laboratório já estabelecidos, como o zooplâncton, as algas, e outros invertebrados e os peixes (Fent et al., 2006). A presença dos compostos farmacêuticos é mais ou menos contínua em baixas concentrações no ambiente aquático, pelo que será mais relevante e provável os produtos farmacêuticos apresentarem efeitos tóxicos crónicos em vez de efeitos tóxicos

agudos (Crane et al., 2006 e Li e Randak, 2009). Por exemplo, os fármacos podem induzir uma mudança comportamental que reduza a aptidão individual do organismo (Jones et al., 2002). Portanto, os testes padronizados agudos podem não ser a base mais adequada para a avaliação de risco ecotoxicológico dos produtos farmacêuticos (Quinn et al., 2008), mas actualmente os estudos sobre os efeitos crónicos estão em falta para a maioria dos fármacos (Fent et al., 2006; Quinn et al., 2008; Li e Randak, 2009), sendo insuficientes para decidir se tais produtos químicos representam uma ameaça significativa para o ambiente (Crane et al., 2006).

1.2.1. Biomarcadores

A entrada cada vez maior de contaminantes para os ecossistemas aquáticos tem originado a necessidade de compreender e avaliar os efeitos biológicos dos poluentes sobre o biota aquático. Nesse sentido, um grande número de estudos tem utilizado biomarcadores como ferramentas funcionais para avaliar a toxicidade de tais compostos para as populações naturais (van der Oost et al., 2003; Rodrigues et al., 2011). Os biomarcadores são interpretados, em termos ecotoxicológicos, como uma alteração numa resposta biológica (desde mudanças moleculares por meio de respostas celulares e fisiológicas a mudanças comportamentais) que reflecte a exposição e os efeitos tóxicos de substâncias químicas dispersas no ambiente (Peakall, 1994). Desta forma, ao nível da Ecotoxicologia, os biomarcadores poderão funcionar como sinais de alerta da exposição ou efeito de um composto químico sobre os sistemas biológicos. Segundo a WHO (Organização Mundial de Saúde) (1993) e a NRC (Comissão dos Marcadores Biológicos do Conselho Nacional de Pesquisa) (1987), os biomarcadores podem ser sub-divididos em três classes, nomeadamente biomarcadores de exposição, efeito e de susceptibilidade. Os biomarcadores de exposição englobam a detecção e a medição de uma substância exógena, ou dos seus metabolitos, ou o produto de uma interacção entre um agente xenobiótico e as moléculas-alvo ou células, num compartimento de um organismo (van der Oost., 2003), os quais indicam a exposição do organismo a determinada classe de xenobióticos, mas não fornecem informação do grau do efeito adverso que esta causa (Walker et al., 2001). Por sua vez, os biomarcadores de efeito incluem alterações bioquímicas, fisiológicas ou outras alterações mensuráveis nos tecidos ou fluidos corporais de um organismo que podem ser reconhecidas como associadas com um estabelecido ou possível problema de saúde ou doença (van der Oost., 2003), e demonstram os efeitos adversos dos contaminantes no organismo (Walker et al., 2001; Handy et al., 2003). Deste modo, os biomarcadores de efeitos adversos podem ser processos biológicos que são essenciais para a normal função da célula, tecido ou organismo (Handy et al., 2003). Por fim, os biomarcadores de susceptibilidade indicam a capacidade inerente ou adquirida de um organismo para responder ao desafio de exposição a uma substância (xenobiótico)

específica, e incluem factores genéticos e mudanças nos receptores que alteram a sensibilidade do organismo à exposição (van der Oost et al., 2003).

A associação entre os biomarcadores de exposição e efeito contribuiu para a definição da relação dose-resposta (Azevedo e Chasin, 2004). Os biomarcadores de susceptibilidade por sua vez, ajudam a elucidar o grau de resposta da exposição apresentada entre diferentes indivíduos (van der Oost et al., 2003).

Em geral, os fenómenos biológicos são mais universais (evolutivamente conservados) ao nível celular do que em níveis superiores de organização biológica, por conseguinte os marcadores bioquímicos podem ser similares (e partilhar a mesma raiz evolutiva) numa grande variedade de organismos. Os biomarcadores podem ser utilizados após a exposição a poluentes, de forma a esclarecer as relações de causa-efeito e dose-efeito na avaliação de risco para a saúde, no diagnóstico clínico e para fins de monitorização (van der Oost et al., 2003). Uma das razões mais fortes para a utilização de biomarcadores é o facto de que a informação obtida a partir deles refere-se aos efeitos biológicos de poluentes, ao invés de uma mera quantificação dos seus níveis ambientais (Peakall, 1994). A análise de múltiplas respostas de biomarcadores, permitirão em teoria obter informações relativamente aos mecanismos de toxicidade dos produtos químicos (van der Oost et al., 2003) e às suas consequências, locais alvo preferenciais e mecanismos de destoxificação e adaptativos.

Os efeitos tóxicos são melhor compreendidos ao nível celular, no entanto as extrapolações quanto à influência de alterações bioquímicas sobre as populações e ecossistemas são ainda incertas e difíceis de serem analisadas (Cairns e Pratt, 1989). A inadequada aplicação ou interpretação das respostas dos biomarcadores pode levar a falsas conclusões quanto ao efeito de stress de poluentes ou da qualidade ambiental. Apesar disto, os biomarcadores podem ser usados para avaliar o estado de saúde dos organismos e obter sinais de alerta precoce dos riscos ambientais. Uma vez que muitos dos biomarcadores são indicadores de curto prazo para efeitos adversos a longo prazo (Handy et al., 2003; van der Oost et al, 2003), estes podem permitir intervenção antes de efeitos prejudiciais irreversíveis tornarem-se inevitáveis (van der Oost et al, 2003).

Por tudo o que já foi referido, a utilização de biomarcadores em estudos de Ecotoxicologia apresenta várias vantagens, pois permitem: (1) detectar precocemente a existência de contaminação por substâncias tóxicas biologicamente significativas, (2) identificar espécies ou populações em risco de contaminação, (3) avaliar a magnitude da contaminação, e (4) prever o grau de severidade dos efeitos causados pelos contaminantes.

1.2.1.1 Biotransformação de xenobióticos - Enzimas de biotransformação

A biotransformação de xenobióticos é o principal mecanismo para manter a homeostase durante a exposição de organismos a moléculas estranhas, tais como as drogas. Em geral, a biotransformação de xenobióticos é realizada por um número limitado de enzimas com ampla especificidade para substratos. Uma consequência importante da biotransformação é a alteração das propriedades físicas de um xenobiótico que favorecem a sua absorção (lipofília), de modo a passarem a possuir características que favoreçam a sua excreção, nomeadamente por aumento da hidrossolubilidade (Klaassen, 2001; Newman, 2001).

As reacções catalisadas por enzimas de biotransformação de xenobióticos são geralmente divididas em três classes, denominados de fase I, fase II e Fase III. As reacções de Fase I envolvem a hidrólise, redução e oxidação do composto estranho. Estas reacções expõem ou introduzem um grupo funcional (-OH,-NH₂,-SH ou -COOH) e, geralmente, resultam em apenas um pequeno aumento na hidrossolubilidade (Klaassen, 2001; Walker et al., 2001; Newman, 2001; Fontáinhas-Fernandes, 2005). Por sua vez, as reacções de biotransformação de fase II incluem a glucuronidação, a sulfatação, a acetilação, a metilação, a conjugação com glutathione (síntese de ácido mercaptúrico), e a conjugação com aminoácidos (como a glicina, taurina e ácido glutâmico) (Klaassen, 2001; Newman, 2001). Os co-factores para estas reacções reagem com grupos funcionais que estão presentes nos xenobióticos ou que são introduzidos / expostos durante a fase I da biotransformação. A maioria das reacções da fase II de biotransformação resulta num grande aumento na hidrossolubilidade dos xenobióticos e, conseqüentemente, promovem bastante a excreção de substâncias químicas externas (Klaassen, 2001; Walker et al., 2001). Por último, as enzimas de Fase III (por exemplo, peptidases, hidrolases e biliases) catalisam o catabolismo dos metabolitos conjugados, com o objectivo de formar produtos excretáveis (van der Oost et al., 2003; Fontáinhas-Fernandes, 2005).

As enzimas da fase I responsáveis pela maioria das reacções são as monooxigenases microsossomais (MO), também conhecidas como o sistema de oxidases de função mista (MFO) (Newman, 2001; van der Oost et al., 2003; Fontáinhas-Fernandes, 2005), do qual faz parte por exemplo, o citocromo P450 (cyt P450), o citocromo *b5* (cyt *b5*) e a NADPH reductase do citocromo P450. A maioria destas enzimas encontra-se localizada no retículo endoplasmático, nomeadamente no do fígado (vertebrados), hepatopâncreas, gordura corporal e intestino (invertebrados). As enzimas da Fase II, nomeadamente as enzimas de conjugação, tais como sulfotranferases e glutathione S-transferases, por sua vez, localizam-se ao nível do citosol, onde se podem conjugar com os metabolitos (van der Oost et al., 2003; Fontáinhas-Fernandes, 2005), sendo

as UDP-glucuronosil-transferases uma excepção, dado que correspondem a enzimas microssomais (Fontaínhas-Fernandes, 2005).

De um modo geral, as diferentes substâncias estranhas aos organismos seguem o processo de biotransformação de acordo com o modo sequencial referido, embora possam existir excepções. Com efeito, algumas moléculas são excretadas na forma de metabolitos de Fase I, enquanto outras o são apenas após as reacções de Fase II. Em contraste, a Fase II do processo de biotransformação pode ou não ser precedida pelas reacções de Fase I (Klaassen, 2001; Fontaínhas-Fernandes, 2005).

As isoenzimas glutathione S-transferases (GSTs) são uma das principais enzimas de destoxificação de xenobióticos da Fase II, pertencendo a uma família de enzimas multifuncionais envolvidas na catálise do ataque nucleofílico do átomo de enxofre da glutathione (g-glutamyl-cisteinilglicina) para um grupo eletrofílico em produtos metabólicos ou compostos xenobióticos (Blanchette et al., 2007), podendo desta forma minimizar a toxicidade destes últimos. Esta enzima de biotransformação é aplicada como biomarcador ao nível de estudos com peixes para a avaliação de efeitos de substâncias químicas. Alguns exemplos incluem estudos da avaliação dos efeitos de fármacos amplamente usados (diazepam, clofibrato e ácido clorifibrato) e um detergente (SDS) em *Gambusia holbrooki* (Nunes et al., 2008), a avaliação das respostas bioquímicas no músculo de *Salmo salar* após a exposição a etinilestradiol e tribultilestanho (Greco et al., 2007), e a avaliação dos efeitos subcrónicos de dipirona em *Rhamdia quelen* (Pamplona et al., 2011).

1.2.1.2. Biomarcadores de stress oxidativo

Muitos contaminantes ambientais (ou seus metabolitos) têm demonstrado exercer efeitos tóxicos relacionados com o stress oxidativo (van der Oost et al., 2003). O stress oxidativo tem sido definido como o desequilíbrio entre a produção de espécies reactivas de oxigénio (reactive oxygen species, ROS) e as defesas antioxidantes do organismo, em favor dos oxidantes (Limón-Pacheco e Gonsebatt, 2009; Li et al., 2010 c; Li et al., 2011; Lushchak, 2011), levando potencialmente à lesão celular (Li et al., 2010 c; Limón-Pacheco e Gonsebatt, 2009). O stress oxidativo é causado pela formação de ROS, como por exemplo, o peróxido de hidrogénio (H_2O_2), o radical hidroxil ($HO\cdot$) e o radical anião superóxido ($O_2^{\cdot-}$), principalmente como subprodutos do metabolismo oxidativo (Zhang et al., 2003; Bagnyukova et al., 2005; Lushchak, 2011). As espécies reactivas de oxigénio (ROS) podem atacar vários constituintes celulares, incluindo proteínas, ácidos nucleicos e lípidos, levando à interrupção da função e integridade celular (Limón-Pacheco e Gonsebatt, 2009; Li et al., 2010a). A fim de lidar com o dano oxidativo, os organismos evoluíram de forma a estabelecer múltiplos sistemas de defesa antioxidantes. Os antioxidantes endógenos enzimáticos e não enzimáticos são essenciais para a conversão de ROS em substâncias inofensivas e para a manutenção do metabolismo e função celular (Li et al., 2010 c; Li et al., 2011; Lushchak, 2011).

Como já foi referido, o metabolismo dos compostos tóxicos pode resultar na geração de metabolitos que têm elevada toxicidade, os quais podem levar à depleção dos antioxidantes celulares. Deste modo, os tóxicos ambientais são uma potencial fonte de ROS (Limón-Pacheco e Gonsebatt, 2009).

Algumas enzimas antioxidantes importantes na fisiologia da maioria dos organismos são a superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutationa peroxidase (GPx), glutationa redutase (GRed) e glutationa S-transferases (GST), enquanto as defesas não enzimáticas incluem as vitaminas E, C, A e a glutationa (Li et al., 2011). Relativamente às enzimas antioxidantes, a catalase é uma enzima contendo o grupo heme que decompõe peróxido de hidrogénio em água e oxigénio molecular, e está localizada principalmente nos peroxissomas (Limón-Pacheco e Gonsebatt, 2009), mas actividades mínimas também podem estar presentes no citoplasma e mitocôndrias. A formação de peróxido de hidrogénio é uma característica comum em cenários de stress oxidativo, devido à actividade de degradação de uma enzima a montante, a superóxido dismutase (SOD), na cascata de defesa oxidativa (Halliwell, 2006; Venediktova et al., 2006). A SOD é responsável pela degradação do radical superóxido, que é uma das formas mais instáveis e reactivas de oxigénio que podem resultar da agressão oxidativa (Halliwell, 2006; Kurutas et al., 2009; Filippon, 2011). Assim, um aumento da actividade da catalase pode ser uma resposta a níveis maiores de oxidantes derivados do peróxido de hidrogénio. O tripeptídeo glutationa (GSH) participa em muitos processos importantes, incluindo a destoxificação do peróxido de hidrogénio, manutenção de proteínas, síntese de precursores de DNA e destoxificação de metais e de xenobióticos orgânicos (Connors, 2004). Numerosas reacções envolvem a GSH como agente redutor, e na maioria dos casos a GSH é convertida na sua forma oxidada dissulfureto (GSSH). A enzima responsável pela conversão de glutationa oxidada (GSSH) de volta para a forma reduzida (GSH) é a glutationa redutase (GRed), com a oxidação simultânea de NADPH para NADP⁺. Portanto, a GR mantém a homeostase GSH / GSSH sob condições de stress oxidativo (Winston e Di Giulio, 1991). Finalmente, as glutationa S-transferases (GST) são enzimas que podem desempenhar um papel duplo de protecção associado à sua actividade na conjugação de compostos eletrofílicos (ou metabolitos de fase I – ver acima) com a GSH (Van der Oost et al., 2003), mas também pode utilizar a GSH na redução de uma ampla gama de hidroperóxidos orgânicos, mas não pode reduzir H₂O₂. Esta actividade peroxidativa realizada pelas GST leva a que seja muitas vezes referida como "peroxidase selénio-independente", apesar de estas não serem uma verdadeira peroxidase (Wang e Ballatori, 1998; Kowalski, 2009).

Apesar da existência dos mecanismos fisiológicos de controlo de espécies reactivas de oxigénio (acima mencionados), é provável às vezes ocorrerem danos oxidativos, devido à produção extensiva ou reduzida capacidade de protecção do organismo. No caso dos radicais livres atacarem

as estruturas biológicas, alguns compostos, como o malondialdeído (MDA), podem ser formados, como consequência do ataque dos ROS sobre os lípidos das membranas celulares. A extensão da peroxidação lipídica pode ser medida através da avaliação dos níveis de substâncias reactivas do ácido tiobarbitúrico (TBARS), que são na sua maioria compostas pelo MDA (Nunes et al., 2006).

Em resposta ao stress oxidativo, como já referido anteriormente, pode haver respostas adaptativas dos sistemas de defesa (antioxidantes), modificação de macromoléculas celulares e, finalmente, dano tecidular. As alterações nos sistemas oxidativos e as macromoléculas modificadas podem servir como bioindicadores para uma variedade de exposições a produtos químicos, incluindo as substâncias químicas presentes no ambiente aquático. Como tal, as medidas de stress oxidativo têm sido utilizadas como indicadores sensíveis de alerta precoce de efeitos adversos em habitats aquáticos contaminados (Livingstone, 2001). Livingstone (2001) reportou o uso de parâmetros de stress oxidativo num vasto número de situações e organismos. Nunes et al. (2006 e 2008) avaliaram os efeitos de compostos farmacêuticos amplamente utilizados e um detergente ao nível de biomarcadores de stress oxidativo no crustáceo *Artemia parthenogenetica* e no peixe *Gambusia holbrooki*, após a exposição aguda a estes compostos. Pandey et al. (2003) e Oakes e Van Der Kraak (2003) utilizaram estes biomarcadores para avaliar os efeitos de misturas complexas nos tecidos dos peixes *Wallaga attu* e *Catostomus commersoni*. Ainda a título de exemplo, Almeida et al. (2002) utilizou-os para avaliar os efeitos do cádmio em tecidos de tilápia do Nilo, ao passo que Berntssen et al. (2003) recorreram a estes parâmetros para avaliar os efeitos do mercúrio em *Salmo salar*.

Na generalidade, os resíduos de compostos farmacêuticos que são persistentes no ambiente aquático podem estimular a produção de ROS e resultar em dano oxidativo em organismos como os peixes, tal como foi verificado em alguns estudos efectuados com diazepam (Nunes et al., 2008), e carbamazepina (Li et al., 2010 a, b, c; Li et al., 2011). Estes fármacos, tal como muitos outros, são compostos persistentes e classificados como potencialmente perigosos para os organismos, porque a maioria dos efeitos resultantes de exposições agudas reportados para eles é inferior a 100 mg L⁻¹ (Fent et al., 2006).

1.3. Peixes como modelos ecotoxicológicos - *Lepomis gibbosus* (perca sol)

Os peixes são organismos sentinelas úteis para detectar contaminantes ambientais (van der Oost et al., 2003), e como são sistemas modelo eficientes e de baixo custo, foram seleccionados para estudos de toxicologia e avaliação de risco por muitas décadas (Barillet et al, 2005). Várias espécies de peixes satisfazem determinados critérios, que tornam adequada a sua aplicação ao nível da avaliação da qualidade dos ecossistemas aquáticos. Os peixes podem ser encontrados praticamente em todos os habitats do ambiente aquático e desempenham um importante papel

ecológico nas teias alimentares aquáticas por causa da sua função como transportadores de energia a partir de níveis tróficos inferiores para superiores (van der Oost et al., 2003).

A compreensão e integração da absorção de uma substância tóxica, comportamento e resposta nos peixes pode, portanto, ter uma elevada importância ecológica. Os peixes têm a capacidade de desencadear mecanismos adaptativos que se baseiam na manutenção do equilíbrio do meio interno – dependentes de um controlo homeostático manifestamente coordenado – que lhes permite sobreviver, crescer e reproduzir (Pacheco, 1999). Pacheco (1999) refere também que esta adaptabilidade assenta numa complexa rede de respostas, como as alterações hormonais, fisiológicas ou metabólicas, que podem constituir excelentes indicadores da interacção dos organismos com o(s) agente(s) químico(s) que, directa ou indirectamente, afectam a qualidade ambiental. Apesar das suas limitações, como uma mobilidade relativamente alta, os peixes são geralmente considerados os organismos viáveis para a monitorização da poluição em sistemas aquáticos (van der Oost et al., 2003).

A perca sol (*Lepomis gibbosus*) é uma espécie invasora na Europa e actualmente está a assumir-se um dos mais relevantes planctívoro/omnívoro em muitos lagos e reservatórios do sul da Europa (Castro et al., 2007; Pereira et al., 2010; Castro et al., in press), deslocando os ciprinídeos indígenas (Castro et al., 2007; Castro e Gonçalves, in press). Em termos de avaliação ecotoxicológica, esta espécie cumpre uma série de critérios exigidos para um organismo de ensaio apropriado, nomeadamente: (1) é fácil de identificar no campo, (2) é fácil de capturar e é abundante o suficiente, (3) não se encontra ameaçada; (4) e apresenta requisitos de manutenção simples em condições laboratoriais (Rodrigues et al., 2011). Corresponde também a uma espécie bem-sucedida, provavelmente devido à sua ampla tolerância às condições ambientais, e tem sido registada a sua presença num grande número de ambientes poluídos, tais como lagos hipertróficos (ex: Lagoa da Vela) (Abrantes et al., 2006; Pereira et al., 2010). Desta maneira, num cenário de monitorização ambiental, a comparação da saúde dos peixes entre habitats poluídos e não poluídos é, portanto, possível. Além disso, a sua presença disseminada na Europa e América do Norte aumenta o seu potencial uso como um organismo modelo, tanto em abordagens de monitorização e laboratoriais. Para além disso, a sua utilização como organismo teste ao nível de ensaios ecotoxicológicos permite evitar o sacrifício de espécies nativas para estudos científicos (pelo menos no contexto Europeu). Adicionalmente, o facto de ser uma espécie de clima temperado apresenta vantagens do ponto de vista da representatividade relativamente aos peixes modelo comuns, que são principalmente tropicais (*Poecilia reticulata*, *Oryzias latipes*, *Brachydanio rerio*, *Oreochromis spp.*) (Rodrigues et al., 2011).

1.4. Objectivo e partes integrantes da tese

A presença de resíduos farmacêuticos no ambiente aquático tem recentemente recebido grande atenção desde que níveis elevados de contaminação foram encontrados, não só nos efluentes de estações de tratamento de águas residuais, mas também em águas de superfície ou subterrâneas. Apesar das concentrações dos compostos farmacêuticos encontradas no meio ambiente se situarem numa gama que varia de ng L^{-1} a μgL^{-1} , estas podem ser suficientes para induzir efeitos tóxicos ao nível dos organismos. Desta forma, o estudo dos efeitos tóxicos destes compostos em espécies não-alvo é necessário e essencial. Tendo isto em consideração, o objectivo do presente estudo foi o de investigar os efeitos da carbamazepina, diazepam e fenitoína, três drogas antiepiléticas encontradas em concentrações relativamente elevadas no ambiente, em parâmetros de stress oxidativo do peixe de água doce *Lepomis gibbosus* (perca-sol). Para o efeito, biomarcadores enzimáticos de stress oxidativo (nomeadamente a catalase, a glutathione reductase e as glutathione S-transferases) e de dano oxidativo (peroxidação lipídica, TBARS) foram medidos no tecido hepático, digestivo e branquial, a fim de investigar os padrões de resposta nesses tecidos e quantificar a extensão das alterações causadas pelos compostos mencionados. A escolha do fígado para realizar estes procedimentos analíticos justifica-se pelo facto de o fígado ser o principal órgão envolvido na destoxificação nos vertebrados (van der Oost e tal., 2003; Nunes et al., 2008). Os efeitos nas brânquias e tubo digestivo também foram investigados; as brânquias foram analisadas devido ao seu papel como principal barreira contra a entrada de xenobióticos no organismo e, provavelmente, também como uma primeira linha de destoxificação e eliminação de agentes nocivos (Nunes e tal., 2008); o tubo digestivo, tal como as brânquias e o fígado, é dos locais onde ocorre maior número de mitocôndrias, as quais são as principais responsáveis pela produção de espécies reactivas de oxigénio (ROS) (Li e tal., 2011).

A presente dissertação é apresentada na forma clássica, sendo por isso constituída por uma introdução mais alargada, que faz descrição da problemática associada à contaminação do ambiente aquático por xenobióticos, e principalmente a contaminação por compostos farmacêuticos. Nesta secção, é ainda abordada também utilização de bioensaios e biomarcadores de stress oxidativo como ferramentas de avaliação ecotoxicológica e a utilização de peixes (nomeadamente a perca-sol) como modelo ecotoxicológico. Os objectivos do presente trabalho são igualmente traçados na introdução. Esta secção é seguida pela descrição dos materiais e métodos utilizados, incluindo os compostos avaliados, o desenho experimental aplicado, e os parâmetros bioquímicos quantificados e respectivos procedimentos. Os resultados obtidos são apresentados em secção própria, seguindo-se a sua discussão, à luz do conhecimento científico disponível à data.

MATERIAL E MÉTODOS

2. Material e métodos

2.1. Características dos fármacos (diazepam, carbamazepina e fenitoína)

O diazepam é uma benzodiazepina, actualmente utilizada na terapêutica humana e veterinária, devido aos seus efeitos ansiolíticos, sedativos e de relaxante muscular (Oggier et al., 2010, Nunes et al., 2006; De Lange et al., 2006; Infarmed, 2010). O seu efeito ansiolítico é útil no tratamento de doentes epiléticos, sendo das benzodiazepinas a que cumpre o requisito de ter uma acção anti-epilética específica (Informed, 2010). Estas actividades farmacológicas são resultado do aumento da transmissão GABAérgica nos receptores GABAA benzodiazepínicos sensíveis (Nunes et al., 2008). Ao nível nacional, segundo o relatório estatístico do medicamento do Informed (2009), o diazepam ocupa a vigésima primeira posição no *ranking* das substâncias activas com maior número de embalagens no SNS (Sistema Nacional de Saúde). Esta substância activa encontra-se presente em 1 130 220 embalagens diferentes de medicamentos. A presença de diazepam foi descrita em concentrações relativamente baixas (até $0,04 \mu\text{g L}^{-1}$) em efluentes de tratamento de águas residuais, conforme reportado para efluentes de um grande número de estações de tratamento de águas residuais alemãs (Ternes, 1998); contudo, na Bélgica foram encontradas concentrações até $0,66 \mu\text{g L}^{-1}$ (Fent et al., 2006). Ao nível de águas de superfície, nos rios Lambro e Po no norte de Itália verificou-se a sua presença em concentrações que variam de $0,7$ a $1,2 \text{ ng L}^{-1}$ no primeiro caso, e de $0,5$ a $0,7 \text{ ng L}^{-1}$ no segundo caso (Zuccato et al., 2000).

A carbamazepina é uma droga antiepilética (anticolulsionante), sendo também indicada como estabilizador do humor na doença bipolar, e apresenta eficácia no tratamento da dor neuropática (Informed, 2010). As drogas anticonvulsivantes (utilizadas como antiepiléticas) actuam ao nível do sistema nervoso central diminuindo a actividade neuronal global. No caso da carbamazepina, este efeito é conseguido através do bloqueio dos canais de sódio dependentes de voltagem dos neurónios excitatórios (Fent et al., 2006). Segundo o relatório do medicamento do Informed (2009), este fármaco ocupa a octogésima segunda posição no ranking das substâncias activas com maior número de embalagens no SNS (Sistema Nacional de Saúde), encontrando-se presente em 323 872 embalagens diferentes de medicamentos. Este fármaco encontra-se presente de forma comum no ambiente aquático (Li et al., 2010a; Li et al., 2011), tendo sido encontrado em águas de superfície perto de efluentes de sistemas de tratamento de águas residuais no Canadá num intervalo de concentrações que varia entre 0 ng L^{-1} e $0,65 \mu\text{g L}^{-1}$ (Metcalf et al., 2003b; Gross et al., 2004), e corresponde a um dos fármacos mais frequentemente detectado em águas de consumo (Benotti et al., 2009; van den Brandhof and Montforts, 2010). A presença de carbamazepina no ambiente aquático em parte deve-se ao facto da sua taxa de remoção ao nível das ETARs ser na

maioria dos casos inferior a 50% (Ternes, 1998; Metcalfe et al., 2003 a), apresentando desta forma uma grande resistência à eliminação ao nível de ETARs (Metcalfe et al., 2003 a, Kim et al., 2007), sendo desta forma libertada inalterada ao nível dos corpos de água.

A carbamazepina, comparativamente à maioria dos fármacos, apresenta um tempo semi-vida no ambiente mais longo, possuindo um tempo médio de dissipação de 50% de 82 (± 11) dias, em condições de campo, sendo considerado como um dos fármacos mais persistentes no ambiente (Sanderson et al., 2004). Por esta razão, foi considerado como um marcador para as influências antropogénicas no ambiente aquático (Clara et al., 2004). No entanto, o seu potencial de efeitos ecológicos adversos nos organismos aquáticos é ainda desconhecido (Li et al., 2010b). O menor nível de efeito verificado para os organismos aquáticos foi de 100 $\mu\text{g L}^{-1}$, e foram observadas alterações na reprodução do crustáceo *C. dubia* após 7 dias (Ferrari et al., 2003). Esta concentração é várias ordens de grandeza superior às concentrações observadas em águas de superfície.

A fenitoína é um anticonvulsivante, utilizado principalmente no tratamento da epilepsia, que foi detectado por Yu et al. (2006) numa estação de tratamento de águas residuais em Baltimore em concentrações que variam entre 140 e 500 ng L^{-1} . É um dos fármacos mais frequentemente detectado ao nível da água para consumo humano (concentração média de 6,2 ng L^{-1} e máxima 19 ng L^{-1}) (Benotti et al., 2009). A fenitoína apresenta uma taxa de remoção ao nível dos sistemas de tratamento de águas residuais inferior a 50%, sugerindo uma explicação para a sua persistência ao longo dos processos de tratamento dessas águas (Yu et al., 2006). Ao nível do tratamento de águas para consumo humano, a fenitoína apresenta resistência à oxidação com cloro ou ozono (Benotti et al., 2009).

2.2. Produtos químicos e organismo de ensaio

A carbamazepina (CAS no. 298-46-4), o diazepam (CAS no. 439-14-5), com grau de pureza > 98%) e a fenitoína (CAS no. 200-328-6) com grau de pureza $\geq 99\%$) foram adquiridos à firma Sigma-Aldrich (Alemanha). O etanol puro (CAS no. 64-17-5), utilizado para dissolver a carbamazepina e a fenitoína, foi adquirido na Merck KGaA (Alemanha).

Os peixes foram capturados na Lagoa da Vela, localizada no litoral centro português, e que corresponde a um lago temperado pouco profundo exibindo um estado de eutrofização avançado (Abrantes et al., 2006; Castro e Gonçalves, 2007). Os peixes foram capturados com rede de arrasto (malha variável, 1-2 cm), que foi colocada num semi-círculo e, em seguida, foi puxada para a margem. Após a captura, os peixes foram mantidos em condições laboratoriais controladas (água da torneira sem cloro, a temperatura de $20 \pm 1^\circ\text{C}$, fotoperíodo de 16 h luz: 8 h escuro e arejamento contínuo) durante um período de quarentena de três semanas antes das exposições. Durante este

período, os peixes foram alimentados com larvas vermelhas de mosquito, mais concretamente Chironomidae, adquiridas em embalagem comercial (Frozen Fish Food, Netherlands).

2.3. Ensaio *in vivo*

Os ensaios *in vivo* foram realizados através da exposição de peixes (de 1-2 g e 4-5 cm) a concentrações subletais de diazepam, carbamazepina e fenitoína, por um período de 96 h. Os intervalos de concentração dos compostos farmacêuticos utilizados neste estudo foram escolhidos, no caso dos compostos diazepam e carbamazepina, de acordo com estudos anteriores. No primeiro caso, recorreu-se ao estudo conduzido por Nunes et al. (2008); no segundo caso, utilizou-se os resultados publicados por Li et al., (2010 b, c). Já o intervalo de concentrações utilizadas para os ensaios com fenitoína foi baseado em concentrações encontradas deste composto no ambiente, mais precisamente em estações de tratamento de águas residuais (Yu et al., 2006). As concentrações de diazepam definidas para a exposição de 96 horas de *Lepomis gibbosus* foram: 0,26625; 0,5325; 1,065; 2,13 e 4,26 mg L⁻¹, as da carbamazepina foram: 62,5; 125; 250; 500 e 1000 µg L⁻¹, as da fenitoína foram: 6,25; 12,5; 25; 50 e 100 µg L⁻¹. O diazepam foi dissolvido em água da torneira desclorinada, e tanto a carbamazepina como a fenitoína foram dissolvidos em etanol (co-solvente). Cada ensaio teve um controlo negativo e, no caso de carbamazepina e fenitoína, foi necessário introduzir no desenho experimental um controlo adicional com o co-solvente (grupo de peixes expostos ao volume de etanol utilizado para a maior concentração de carbamazepina e fenitoína). Os peixes foram expostos individualmente a 300 mL da solução de ensaio (preparada com água da torneira desclorinada), num total de sete réplicas por tratamento. As condições abióticas foram controladas durante o período de exposição (fotoperíodo de 16 h luz: 8 h escuro, à temperatura de 20 ± 1 °C, arejamento contínuo). Durante a exposição não foi fornecido nenhum alimento aos peixes. Os peixes foram expostos em embalagens de plástico, que tinham sido previamente lavadas com água da torneira sem cloro. O meio foi renovado após 48 h do início da exposição. Parâmetros como a mortalidade, pH, temperatura e oxigénio dissolvido foram monitorizados durante a exposição, para fins de validação do teste.

2.4. Quantificação dos marcadores bioquímicos

No final do ensaio (96 h), os peixes foram sacrificados por decapitação e dissecados, tendo sido isolados o fígado, o tubo digestivo e as brânquias. Os órgãos recolhidos foram homogeneizados individualmente em 2 mL de tampão fosfato (50 mM, pH = 7,0, com 0,1% Triton X-100). Os tecidos homogeneizados foram centrifugados a 15000 g durante 10 min e os sobrenadantes foram divididos em alíquotas, a ser utilizadas para as diferentes determinações

enzimáticas (CAT, GRed, GSTs) e peroxidação lipídica (TBARS), dependendo do órgão e determinações associadas: a) no fígado, foram determinadas as actividades enzimáticas da CAT, GSTs e os níveis de TBARS; b) no tubo digestivo, foram determinadas as actividades enzimáticas da GRed e das GSTs; por fim, c) nas brânquias foram determinadas as actividades enzimáticas da glutathione reductase e das GSTs e a peroxidação lipídica (TBARS). Os tecidos homogeneizados foram armazenados a -20°C por um curto período de tempo até à realização das determinações enzimáticas.

A actividade da catalase (CAT) foi medida por meio da decomposição de H_2O_2 , como descrito por Aebi (1984). As mudanças na absorvância da amostra foram espectrofotometricamente monitorizadas a 240 nm ($\epsilon_{240} = 0,00394 \pm 0,0002 \text{ mM}^{-1} \text{ mm}^{-1}$) durante 30 segundos, e as actividades foram expressas em μmoles de H_2O_2 consumido por minuto, por miligrama de proteína. Para cada amostra, foram feitas leituras em triplicado.

A actividade da glutathione reductase (GRed) foi determinada por espectrofotometria, de acordo com o protocolo de Carlberg e Mannervik (1985), adaptado a leitor de microplacas. Neste ensaio, a oxidação de NADPH mediada pela GRed foi monitorizada a 340 nm ($\epsilon_{340} = 0,622 \text{ mM}^{-1} \text{ mm}^{-1}$). A actividade enzimática foi expressa como μmoles de NADPH oxidado por minuto, por miligrama de proteína. Para cada amostra, foram feitas leituras em triplicado.

A actividade das glutathione-S-transferases (GSTs) também foi determinada por espectrofotometria, de acordo com Habig et al. (1974), após adaptações a microplaca. As GSTs catalisam a conjugação do substrato 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) com a glutathione, formando um tioéter cuja formação pode ser seguida pelo aumento da absorvância a 340 nm ($\epsilon_{340} = 0,96 \text{ mM}^{-1} \text{ mm}^{-1}$). Os resultados foram expressos como nanomoles de tioéter produzidas por minuto, por miligrama de proteína. Para cada amostra, foram feitas leituras em triplicado.

A extensão da peroxidação lipídica foi medida pela quantificação das substâncias reactivas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), de acordo com o protocolo descrito no Buege e Aust (1978). Após homogeneização, as amostras foram diluídas 1:3 com uma solução aquosa de ácido tricloroacético a 10%. Seguiu-se um curto período (cerca de 1 minuto) de centrifugação, e os sobrenadantes foram imediatamente tratados com uma solução aquosa de 1% de ácido tiobarbitúrico, numa proporção final de 1:2. As amostras foram então colocadas em banho fervente durante um período de 10 min. Após 10 min, as amostras foram deixadas arrefecer até aos 25°C . As leituras de cada amostra foram realizadas em triplicado a 535 nm. O conteúdo em *thiobarbituric acid reactive substances* (TBARS) foi expresso como equivalentes do malondialdeído (MDA) presente na amostra, calculado usando um coeficiente de extinção de $1,56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Esta metodologia é baseada na reacção de compostos como o MDA (formado pela degradação dos

produtos iniciais da membrana lipídica pelo ataque dos radicais livres) com ácido 2-tiobarbitúrico (TBA).

O teor de proteína solúvel total nas amostras foi determinado a 595 nm de acordo com o método de Bradford (1976), adaptado para microplacas, a fim de expressar as actividades enzimáticas em função do teor de proteína das amostras analisadas.

2.5. Análise estatística

Para cada ensaio com os diferentes fármacos, os tratamentos experimentais (concentrações crescentes do xenobiótico) foram comparados por ANOVA unifactorial, seguida pelo teste de Dunnet para discriminar as diferenças significativas entre o controlo e os diferentes tratamentos e assim determinar a menor concentração com efeitos observados (LOEC). O nível de significância em todas as análises foi de 0,05.

RESULTADOS

3. Resultados

3.1. Diazepam

A exposição ao diazepam não causou diferenças significativas ao nível da actividade da CAT relativamente ao controlo ao nível dos homogeneizados do fígado ($F= 1,55$; d.f.=5, 35; $p=0,20$; fig. 1). No entanto, observou-se nos homogeneizados do fígado do último tratamento de diazepam um ligeiro aumento da actividade desta enzima, embora não significativo.

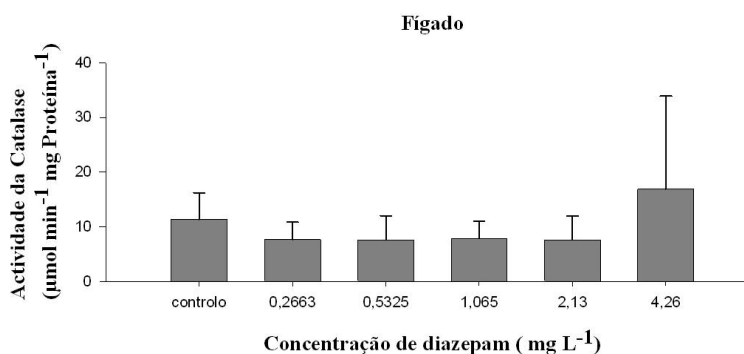


Figura 1: Efeitos do diazepam sobre a actividade da catalase no fígado de *Lepomis gibbosus*. As colunas correspondem à média das medições efectuadas em cada indivíduo (réplica) e as barras de erro ao correspondente desvio padrão (* diferenças significativas, $p \leq 0,05$).

Os efeitos da exposição de 96 h ao diazepam, na actividade das GSTs dos homogeneizados das brânquias, incluíram um aumento da sua actividade de acordo com um padrão dose-resposta claro, tendo sido significativamente diferente do controlo ao nível do tratamento de 4,26 mg L⁻¹ ($F= 4,10$; d.f.=5, 32; $p=0,005$; Fig. 2a). Ao nível dos homogeneizados do fígado, verificou-se uma flutuação nos níveis de actividade das GSTs nos diferentes tratamentos, apresentando uma actividade máxima no tratamento de 0,5325 mg L⁻¹, mas não se verificaram diferenças significativas em nenhum dos tratamentos de diazepam relativamente ao controlo ($F= 1,75$; d.f.=5, 36; $p=0,15$; fig. 2b). O nível da actividade das GSTs nos homogeneizados do tubo digestivo foi igual para todos os tratamentos ($F= 0,63$; d.f.=5, 36; $p=0,68$; fig. 2c), apesar de se ter verificado uma ligeira (não significativa) diminuição da sua actividade ao nível do tratamento de 4,26 mg L⁻¹ de diazepam.

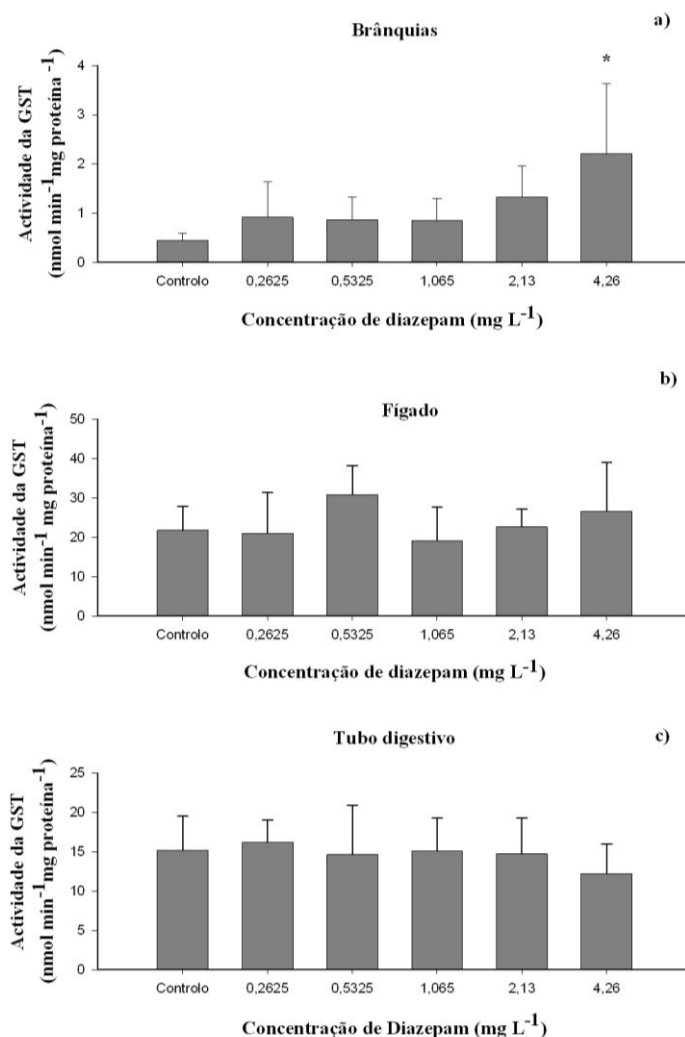


Figura 2: Efeitos do diazepam sobre a actividade da glutathione S-transferases em: a) brânquias, b) fígado e c) tubo digestivo de *Lepomis gibbosus*. As colunas correspondem à média das medições efectuadas em cada indivíduo (réplica) e as barras de erro ao correspondente desvio padrão (* diferenças significativas, $p \leq 0,05$).

Os homogeneizados das brânquias, após a exposição de 96 h ao diazepam, apresentaram um aumento significativo da actividade da GRed na concentração de diazepam 1,065 mg L⁻¹ relativamente ao controlo ($F= 4,11$; d.f.=5, 36; $p=0,005$; fig. 3a). Os efeitos da exposição ao diazepam ao nível do tubo digestivo incluíram uma redução significativa na actividade da Gred, mas essa diminuição não é dependente da dose, pois como podemos ver pela figura 3b) a menor actividade da GRed neste órgão é verificada para a menor concentração que apresenta efeitos ($LOEC=0,5325$ mg L⁻¹) ($F= 6,15$; d.f.=5, 36; $p=0,0003$; fig. 2b).

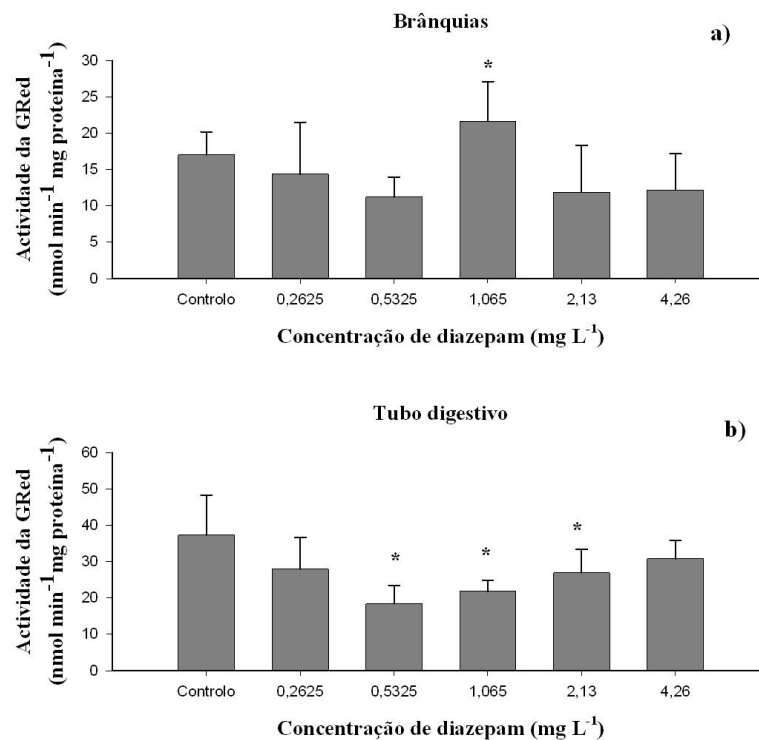


Figura 3: Efeitos do diazepam sobre a actividade da glutathione reductase de: a) brânquias e b) tubo digestivo de *Lepomis gibbosus*. As colunas correspondem à média das medições efectuadas em cada indivíduo (réplica) e as barras de erro ao correspondente desvio padrão (* diferenças significativas, $p \leq 0,05$).

A exposição ao diazepam não causou diferenças significativas ao nível da peroxidação lipídica relativamente ao controlo ao nível dos homogeneizados das brânquias ($F= 2,32$; d.f.=5, 36; $p=0,06$; fig. 4a) nem do fígado ($F= 1,87$; d.f.=5, 36; $p=0,12$; fig. 4b). No entanto, observou-se nos homogeneizados das brânquias dos últimos três tratamentos de diazepam um ligeiro aumento da peroxidação lipídica, embora não significativo. Nos homogeneizados do fígado verificou-se uma flutuação ao nível da peroxidação lipídica, apresentando os tratamentos 1,065 e 4,26 mg L⁻¹ de diazepam os valores mais elevados de peroxidação lipídica.

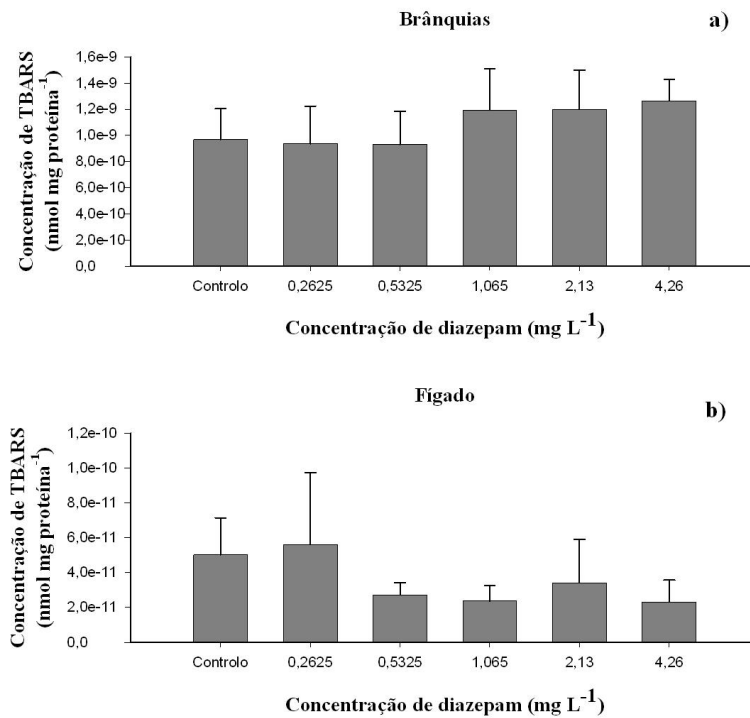


Figura 4: Efeitos do diazepam sobre a peroxidação lipídica medida através dos TBARS das a) brânquias e do b) fígado de *Lepomis gibbosus*. As colunas correspondem à média das medições efectuadas em cada indivíduo (réplica) e as barras de erro ao correspondente desvio padrão (* diferenças significativas, $p \leq 0,05$).

3.2. Carbamazepina

A exposição de 96 horas a carbamazepina não resultou em diferenças significativas entre o controlo e o tratamento de etanol; adicionalmente, não se verificaram diferenças entre o controlo e os tratamentos deste químico, tanto ao nível da actividade da GST dos homogeneizados das brânquias ($F=0,54$; d.f.=6, 42; $p=0,06$; fig. 5 a) como do fígado ($F= 2,13$; d.f.=6, 42; $p=0,78$; fig. 5 b). O efeito da exposição a carbamazepina na actividade das GSTs nos homogeneizados do tubo digestivo correspondeu a um aumento na actividade desta enzima, o qual foi significativo nas três concentrações mais elevadas (250; 500 e 1000 $\mu\text{g L}^{-1}$), apresentando um LOEC de 250 $\mu\text{g L}^{-1}$ ($F=5,11$; d.f.=6, 42; $p=0,0005$; fig. 5 c).

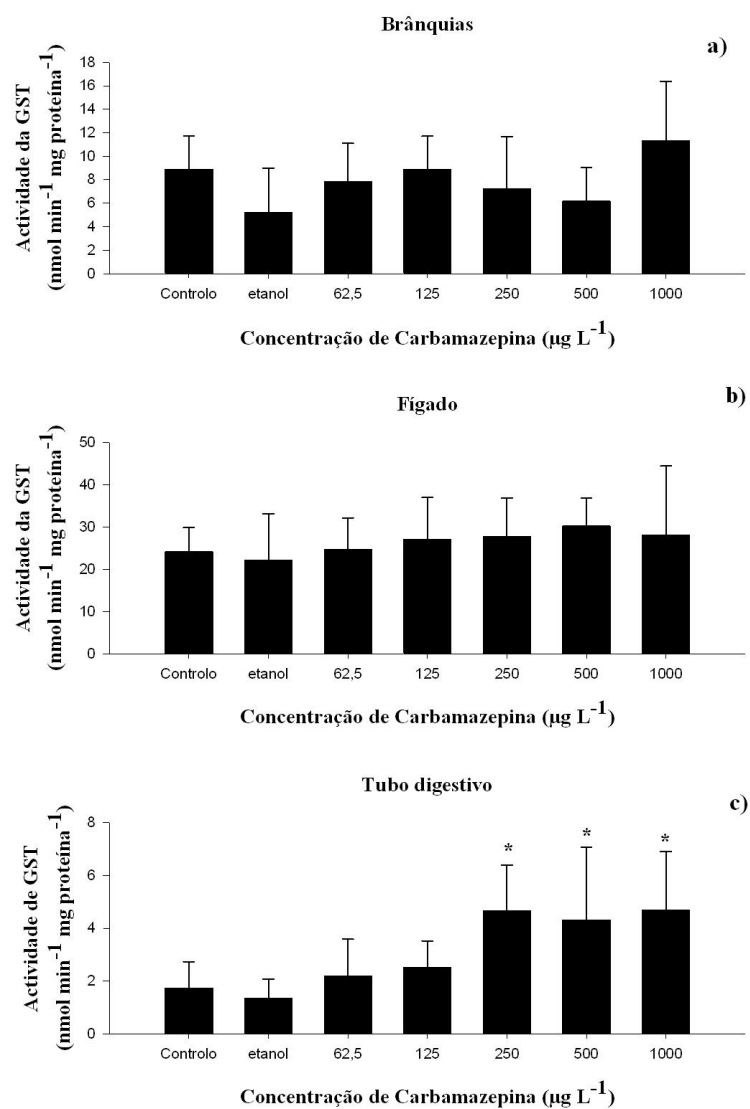


Figura 5: Efeitos da carbamazepina sobre a actividade da glutathione S-transferases das a) brânquias, do b) fígado e do c) tubo digestivo de *Lepomis gibbosus*. As colunas correspondem à média das medições efectuadas em cada indivíduo (réplica) e as barras de erro ao correspondente desvio padrão (* diferenças significativas, $p \leq 0,05$).

Na exposição de 96 h a carbamazepina, não se verificaram diferenças significativas na actividade da GRed entre o controlo e o tratamento de etanol, tanto ao nível dos homogeneizados das brânquias como do tubo digestivo. Ao nível das brânquias, a carbamazepina promoveu um aumento na actividade da GRed, sendo significativo para a concentração de $62,5 \mu\text{g L}^{-1}$ ($F= 2,63$; d.f.=6, 42; $p=0,03$; fig. 6 a). Nos homogeneizados do tubo digestivo, o efeito da exposição a carbamazepina também consistiu num aumento da actividade da glutathione reductase, sendo significativo para as concentrações $62,5$; 125 ; 500 e $1000 \mu\text{g L}^{-1}$ ($F= 4,36$; d.f.=6, 42; $p=0,001$; fig. 6 b)), apresentando um LOEC de $62,5 \mu\text{g L}^{-1}$.

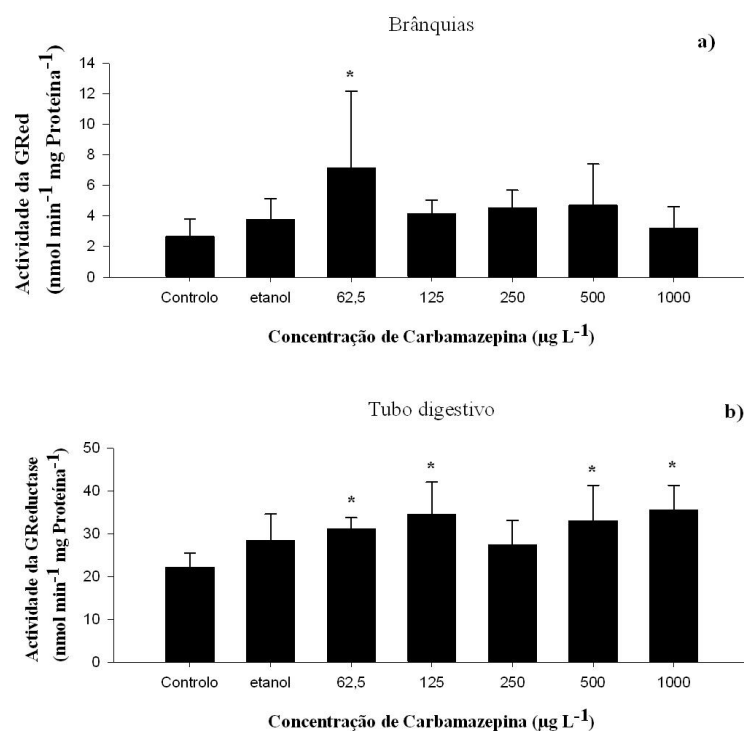


Figura 6: Efeitos da carbamazepina sobre a actividade da glutathiona reductase das: a) brânquias e do b) tubo digestivo de *Lepomis gibbosus*. As colunas correspondem à média das medições efectuadas em cada indivíduo (réplica) e as barras de erro ao correspondente desvio padrão (* diferenças significativas, $p \leq 0,05$).

A exposição a carbamazepina e ao etanol não causou nenhum efeito ao nível da peroxidação lipídica, não se tendo desta forma verificado nenhum tipo de diferenças significativas tanto nos homogeneizados das brânquias ($F= 1,93$; d.f.=6, 42; $p=0,098$; fig. 7a) como nos homogeneizados do fígado relativamente ao controlo ($F= 1,97$; d.f.=6, 42; $p=0,092$; fig. 7b).

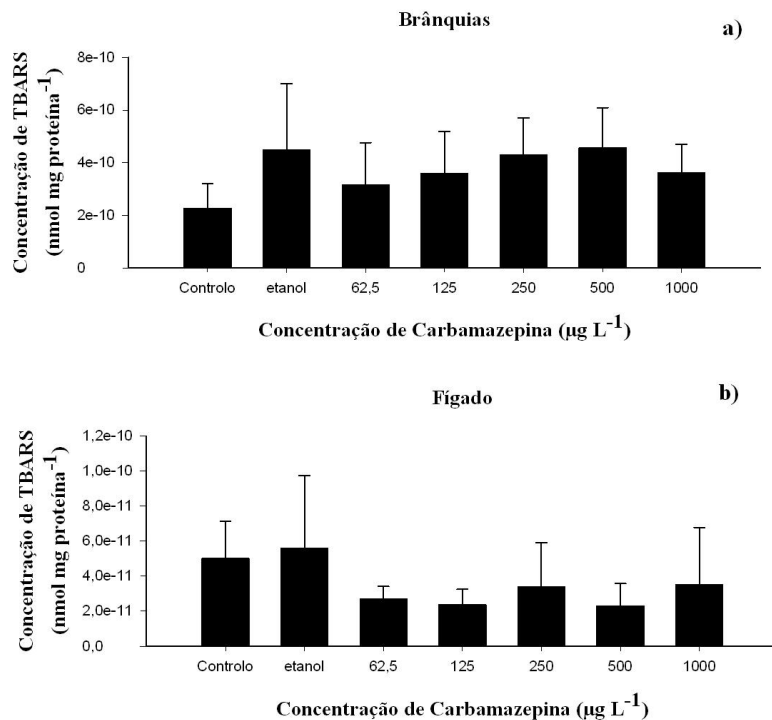


Figura 7: Efeitos da carbamazepina sobre a peroxidação lipídica medida através dos TBARS de: a) brânquias e b) fígado de *Lepomis gibbosus*. As colunas correspondem à média das medições efectuadas em cada indivíduo (réplica) e as barras de erro ao correspondente desvio padrão (* diferenças significativas, $p \leq 0,05$).

3.3 Fenitoína

Na exposição de 96 h a fenitoína, não se verificaram diferenças significativas entre o controlo e o tratamento de etanol nos homogeneizados do fígado de *Lepomis gibbosus*. Na globalidade, a exposição de 96 h a fenitoína resultou num aumento da actividade da CAT nos homogeneizados do fígado, correspondendo a um aumento significativo nas concentrações de 12,5; 25 e 50 $\mu\text{g L}^{-1}$ ($F= 3,21$; d.f.=6, 42; $p=0,01$; fig. 8) e apresentando um LOEC de 12,5 $\mu\text{g L}^{-1}$.

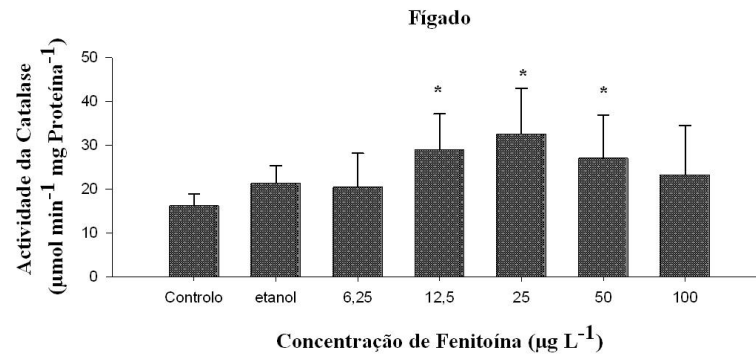


Figura 8: Efeitos da fenitoína sobre a actividade da catalase no fígado de *Lepomis gibbosus*. As colunas correspondem à média das medições efectuadas em cada indivíduo (réplica) e as barras de erro ao correspondente desvio padrão (* diferenças significativas, $p \leq 0,05$).

Na exposição de 96 h a fenitoína, não se verificaram diferenças significativas entre o controlo e o tratamento de etanol; adicionalmente, não se verificaram diferenças entre o controlo e os tratamentos deste químico, tanto ao nível da actividade da GST dos homogeneizados das brânquias ($F= 0,89$; d.f.=6, 42; $p=0,51$; fig. 9 a) como do tubo digestivo ($F= 1,26$; d.f.=6, 42; $p=0,01$; fig. 9 c). O efeito da exposição a fenitoína na actividade da GST nos homogeneizados do fígado correspondeu a um aumento na actividade desta enzima, o qual é significativo nas concentrações (25 e 100 $\mu\text{g L}^{-1}$), apresentando um LOEC de 25 $\mu\text{g L}^{-1}$ ($F= 3,07$; d.f.=6, 42; $p=0,29$; fig. 9b).

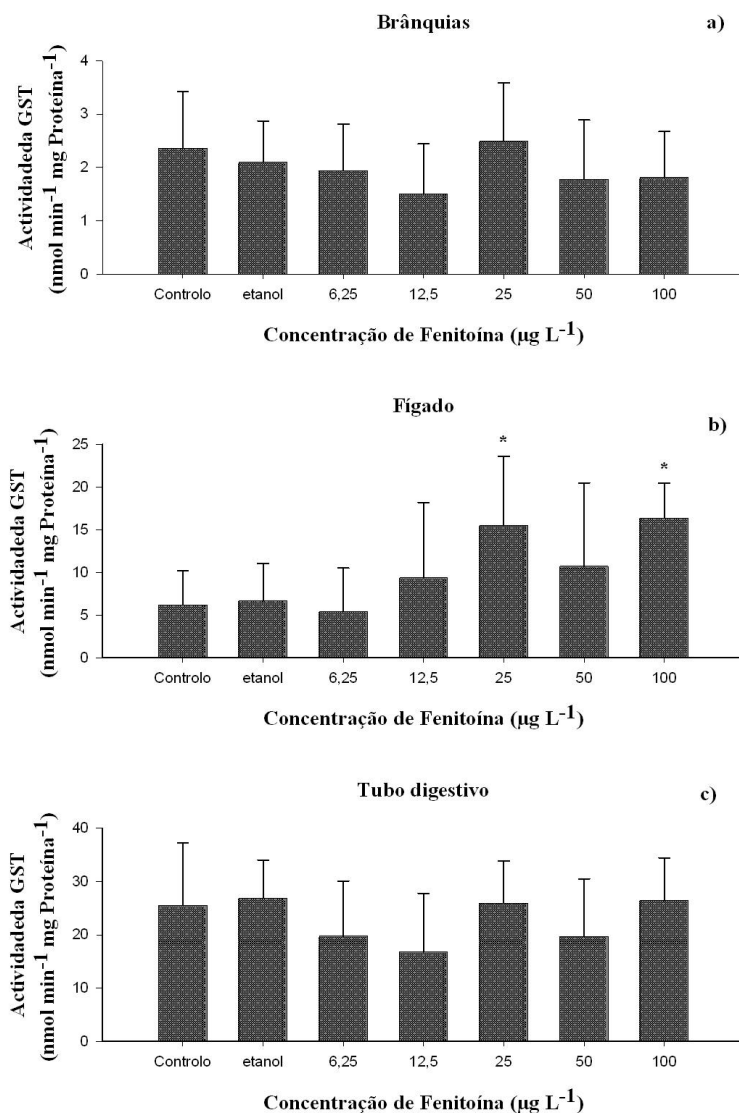


Figura 9: Efeitos da fenitoína sobre a actividade da glutiona S-transferases das a) brânquias, do b) fígado e do c) tubo digestivo de *Lepomis gibbosus*. As colunas correspondem à média das medições efectuadas em cada indivíduo (réplica) e as barras de erro ao correspondente desvio padrão (* diferenças significativas, $p \leq 0,05$).

O efeito da exposição de *Lepomis gibbosus* a fenitoína, nos homogeneizados das brânquias, consistiu numa diminuição significativa da actividade da GRed dos tratamentos de 25 e 50 $\mu\text{g L}^{-1}$ ($F= 5,1$; d.f.=6, 42; $p=0,0004$; fig. 10a), apresentando um LOEC de 25 $\mu\text{g L}^{-1}$. Nos homogeneizados do tubo digestivo a partir da ANOVA pode-se verificar que existiam diferenças entre os diferentes tratamentos ($F= 2,64$; d.f.=6, 42; $p=0,03$; fig. 10 b), mas não se verificou diferenças significativas entre os tratamentos de etanol e fenitoína e o controlo. Nos homogeneizados das brânquias tal como nos homogeneizados do tubo digestivo não se verificaram diferenças significativas entre o controlo e o tratamento do co-solvente (etanol).

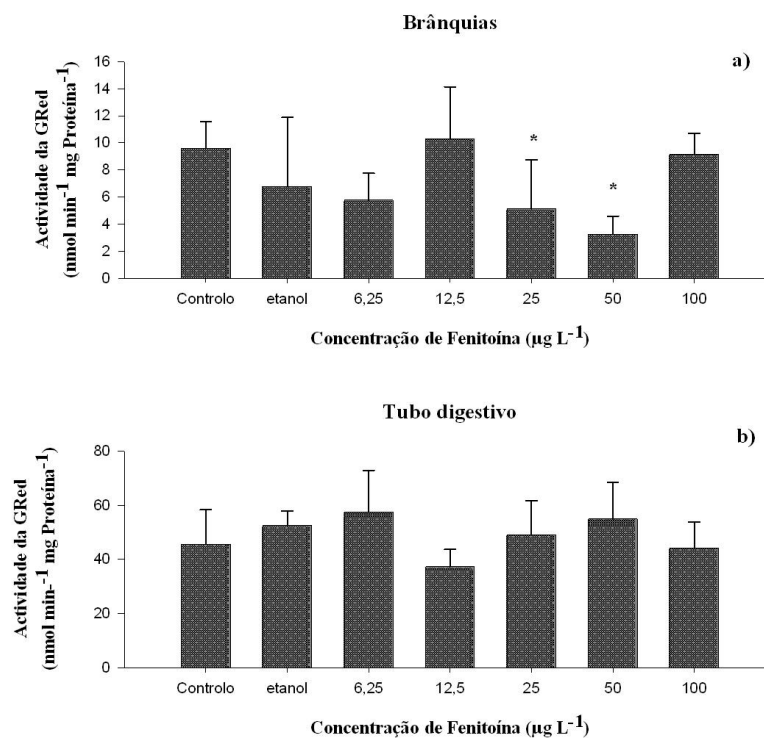


Figura 10: Efeitos da fenitoína sobre a actividade da glutathione reductase das: a) brânquias e do b) tubo digestivo de *Lepomis gibbosus*. As colunas correspondem à média das medições efectuadas em cada indivíduo (réplica) e as barras de erro ao correspondente desvio padrão (* diferenças significativas, $p \leq 0,05$).

Os efeitos da exposição a fenitoína ao nível da peroxidação lipídica dos homogeneizados das brânquias de *Lepomis gibbosus* incluíram uma diminuição significativa da peroxidação lipídica no tratamento de fenitoína de $25 \mu\text{g L}^{-1}$ ($F=3,93$; d.f.=6, 42; $p=0,003$; fig. 11 a). Por sua vez, nos homogeneizados do fígado, a exposição a fenitoína e ao etanol não resultou em diferenças significativas deste parâmetro relativamente ao controlo ($F=1,24$; d.f.=6, 42; $p=0,30$; fig. 11b).

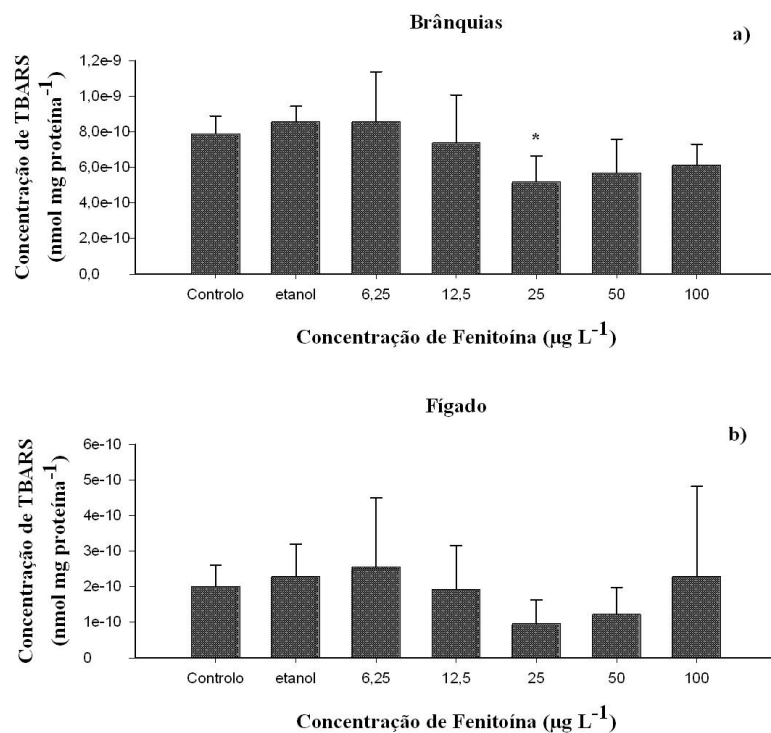


Figura 11: Efeitos da fenitoína sobre a peroxidação lipídica medida através dos TBARS de: a) brânquias e b) fígado de *Lepomis gibbosus*. As colunas correspondem à média das medições efectuadas em cada indivíduo (réplica) e as barras de erro ao correspondente desvio padrão (* diferenças significativas, $p \leq 0,05$).

Os resultados dos efeitos dos três compostos (diazepam, carbamazepina e fenitoína) para cada um dos biomarcadores analisados nas brânquias, fígado e tubo digestivo de *L.gibbosus* encontram-se compilados na Tabela 1.

Tabela 1- Respostas dos biomarcadores (CAT, GSTs, GRed e LPO) nos órgãos de *Lepomis gibbosus* (brânquias, fígado e tubo digestivo) exposta ao diazepam, carbamazepina e fenitoína, e respectivos LOECs.

| Orgãos | Biomarcadores | Diazepam | Carbamazepina | Fenitoína |
|-----------------------|----------------------|---|---|--|
| Brânquias | GSTs | Aumento significativo LOEC=4,26 mg L ⁻¹ | Não há diferenças significativas | Não há diferenças significativas |
| | GRed | Diminuição significativa LOEC=0,5325 | Não há diferenças significativas | Diminuição significativa LOEC=25 µg L ⁻¹ |
| | LPO | Não há diferenças significativas | Não há diferenças significativas | Diminuição Significativa LOEC=25 µg L ⁻¹ |
| Fígado | CAT | Não há diferenças significativas | Não foi possível a determinação da actividade | Aumento significativo LOEC= 25 µg L ⁻¹ |
| | GSTs | Não há diferenças significativas | Não há diferenças significativas | Aumento Significativo LOEC=25 µg L ⁻¹ |
| | LPO | Não há diferenças significativas | Não há diferenças significativas | Não há diferenças significativas |
| Tubo digestivo | GSTs | Não há diferenças significativas | Aumento Significativo LOEC=250 µg L ⁻¹ | Não há diferenças significativas |
| | GRed | Não há diferenças significativas | Aumento significativo LOEC=62,5 µg L ⁻¹ | Não há diferenças significativas |

DISCUSSÃO

4. Discussão

Os organismos aeróbios normalmente possuem uma variedade de formas enzimáticas que lidam com espécies reactivas de oxigénio, formadas em processos metabólicos naturais com a intervenção de oxigénio molecular. No entanto, estes mecanismos de controlo podem não ser suficientes para evitar o estabelecimento de uma condição designada por stress oxidativo: as espécies reactivas de oxigénio, devido à sua alta reactividade intrínseca, são potencialmente prejudiciais para as células. O dano oxidativo pode assim ocorrer ao nível de diferentes macromoléculas celulares, nomeadamente no DNA, proteínas celulares e lipídios (Halliwell e Gutteridge, 1999). Do ponto de vista ecotoxicológico, a avaliação dos níveis/actividades de enzimas antioxidantes pode ser uma valiosa fonte de informações, relacionadas com o estado antioxidante de organismos ambientalmente expostos a várias classes de poluentes. De entre os compostos que podem causar este tipo de efeitos, destacam-se as substâncias de utilização farmacêutica.

No presente estudo foram investigados os efeitos da carbamazepina, diazepam e fenitoína, três drogas anticonvulsivantes encontradas em concentrações relativamente elevadas no ambiente, em parâmetros de stress oxidativo do peixe de água doce *Lepomis gibbosus* (perca-sol). Para o efeito, biomarcadores enzimáticos de stress oxidativo (nomeadamente a catalase, a glutathione reductase e as glutathione S-transferases) e de dano oxidativo (peroxidação lipídica, TBARS) foram medidos no tecido hepático, digestivo e branquial, a fim de investigar os padrões de resposta nesses tecidos e quantificar a extensão das alterações causadas pelos compostos mencionados. De acordo com os resultados obtidos para os biomarcadores referidos anteriormente, não parece ser possível sustentar que um cenário de stress oxidativo se tenha instalado após a exposição de *Lepomis gibbosus* a estes compostos, no contexto das concentrações testadas.

4.1. Diazepam

A exposição de *Lepomis gibbosus* ao diazepam não causou efeitos na actividade da catalase no fígado de *L. gibbosus*, enzima principalmente localizada nos peroxissomas, e a qual é responsável pela redução do peróxido de hidrogénio a oxigénio e água. Isto sugere que a degradação catalítica de peróxido de hidrogénio, um dos passos comuns em situações de stress oxidativo, não foi acompanhada por um aumento na actividade desta enzima e/ou a formação de peróxido de hidrogénio não foi favorecida pela exposição ao diazepam. A actividade da glutathione S-transferases, após a exposição ao diazepam, não foi regra geral alterada de forma consistente, apesar do estabelecimento de diferenças significativas para concentrações mais elevadas, particularmente no caso das brânquias. As GSTs constituem uma família de enzimas que apresenta

um duplo papel de protecção associado à sua actividade na conjugação de compostos eletrofílicos (ou metabolitos de fase I) com a GSH (Van der Oost et al., 2003), mas também pode utilizar a GSH na redução de uma ampla gama de hidroperóxidos orgânicos. A exposição ao diazepam nas brânquias de *L.gibbosus* causou um aumento da actividade das GSTs, significativo unicamente na concentração de diazepam mais elevada (4,26 mg L⁻¹). Tal facto sugere uma resposta adaptativa relacionada com um eventual stress oxidativo ao qual os organismos foram sujeitos, ou que parte do metabolismo de conjugação e eliminação desta substância teve lugar neste órgão. O facto da actividade desta enzima não ter sido afectada no fígado e no tubo digestivo sugere desta forma que estes órgãos não foram alvo preferencial do diazepam. Este efeito pode ser explicado devido à exposição directa das brânquias à solução contendo diazepam, enquanto os outros órgãos são expostos apenas à quantidade de toxina que é absorvida e distribuída nos tecidos do peixe. O sistema respiratório fornece a interface mais extensa de um peixe com o ambiente aquático, e é frequentemente o primeiro sistema a ser afectado por poluentes (Brackenbury e Appleton, 1997), sendo as brânquias consideradas à primeira linha de destoxificação e eliminação de agentes nocivos (Nunes et al., 2008). Efeitos oxidativos tóxicos envolvendo a administração do diazepam e que se reflectem em níveis diminuídos de glutathione em animais de experiência foram já documentados por El-Sokkary (2008). Os dados relativos às brânquias contrariam as evidências apresentadas por Nunes et al. (2008), que também procedeu à avaliação do efeito da exposição ao diazepam nas brânquias de *G. holbrooki*; os resultados então obtidos apontaram para a ausência de diferenças na actividade das GSTs, o que não se verificou no presente estudo (ver acima). Os resultados do presente estudo também estão de acordo com os obtidos para o crustáceo *Artemia parthenogenetica* exposto a diazepam no estudo de Nunes et al. (2006), onde se observaram aumentos significativos da actividade das GSTs. A ausência de efeito do diazepam na actividade da GSTs no fígado de *L. gibbosus* encontra-se de acordo com o estudo realizado por Nunes et al. (2008), em *Gambusia holbrooki* exposta a diazepam.

Os efeitos do diazepam na actividade da enzima-chave glutathione reductase (envolvida na regeneração da glutathione reduzida a partir da glutathione oxidada) corresponderam a uma diminuição significativa na sua actividade no tecido digestivo em algumas concentrações e um aumento ao nível da sua actividade nas brânquias na concentração de 1,064 mg L⁻¹ de diazepam. Em nenhum dos casos, o padrão de indução ou inibição foi dependente da concentração, pelo que se torna difícil atribuir estes efeitos à resposta do organismo ao diazepam. Apesar disso, o estudo realizado por Nunes et al. (2008) com *G. holbrooki* exposta a diazepam manifesta o mesmo padrão de aumento da actividade da GRed nas brânquias e fígado. O padrão de resposta da GRed no tubo digestivo, por sua vez, apresentou um padrão oposto ao do estudo de Nunes et al. (2008). A inibição da GRed (ainda que ocasional) no tecido digestivo encontra-se de acordo com o estudo

conduzido por Musavi e Kakkar (1998), que avaliaram os níveis de GRed nos cérebros de ratos aos quais foi administrado diazepam e concluíram que uma diminuição significativa da actividade desta enzima ocorreu nas regiões do tronco do cérebro, córtex cerebral e cerebelo. Este resultado pode ser toxicologicamente relevante, desde que a deficiência de actividade da GRed possa desafiar o estado antioxidante dos organismos: a quantidade de GSH formada pela redução do *pool* intracelular de glutatona oxidada pode não ser suficiente para lidar com a quantidade de espécies reactivas de oxigénio formadas durante períodos de stress oxidativo, com consequências deletérias para a fisiologia do organismo. Tal possibilidade pode ser explorada se considerarmos o estudo de Seçkin et al. (2007), que constatou uma diminuição no conteúdo da glutatona (GSH) no fígado de ratos resultante da exposição por um período de 90 dias a uma dose de diazepam de 10 mg kg⁻¹ dia⁻¹.

A peroxidação lipídica, que é particularmente importante para aos animais aquáticos, uma vez que normalmente contém maior quantidade de ácidos gordos altamente insaturados (HUFA) do que outras espécies (Huang et al., 2003), não sofreu alterações após a exposição ao diazepam, tanto ao nível das brânquias como do fígado. Estes resultados encontram-se de acordo com o trabalho de Nunes et al. (2008), no qual também não se verificaram alterações nos níveis de TBARS, tanto nas brânquias como no fígado de *G. holbrooki* exposta a diazepam. Contudo, outros estudos apresentam resultados aparentemente opostos, tais como o de Nunes et al. (2006), no qual o diazepam induziu uma diminuição significativa no conteúdo de TBARS no crustáceo *A. parthenogenetica*. Estudos anteriores, como o de Musavi e Kakkar (1998) e Musavi e Kakkar (2003), demonstraram que o diazepam foi responsável por respostas distintas da peroxidação lipídica consoante a região analisada do cérebro de ratos expostos. De acordo com os autores citados, a exposição a este composto pode estar associada com a estabilização das membranas após longo período de ligação do diazepam, contribuindo assim para um efeito antioxidante global do diazepam. No entanto, casos de aumento da peroxidação lipídica também foram já descritos no seguimento da administração de diazepam a animais de experiência, como os descritos por Seçkin et al. (2007) (após exposição crónica de ratos ao diazepam) e o estudo de Abdelmajeed (2009) (em que o autor procedeu a exposição de ratos a uma única dose de diazepam).

Deste modo, e como não se verificaram efeitos do diazepam ao nível da peroxidação lipídica das brânquias e do fígado, e apesar do aumento na actividade das GSTs nas brânquias e da inibição parcial da actividade da glutatona reductase no tubo digestivo, não podemos sustentar que um cenário de stress oxidativo se tenha instalado após a exposição de *Lepomis gibbosus* ao diazepam. Ainda assim, o diazepam parece ser responsável por algumas alterações bioquímicas ou fisiológicas em órgãos-chave que se devem aprofundar em estudos futuros.

4.2. Carbamazepina

A exposição a carbamazepina efectuada no presente estudo foi responsável por um aumento significativo da actividade das glutathione S-transferases no tubo digestivo, e da glutathione reductase no tubo digestivo. Os aumentos significativos verificados para o tubo digestivo, tanto na actividade das GSTs como da Gred, seguindo um padrão dependente da dose, sugerem uma resposta adaptativa relacionada com stress oxidativo, e que serve para neutralizar o impacto do aumento da produção de ROS (John et al., 2001). Estes resultados estão de acordo com os resultados obtidos por Li et al. (2011) com a truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) exposta durante 96 h a carbamazepina, com um consequente aumento significativo da actividade da GRed do intestino e os obtidos por Martin-Diaz et al. (2009), em que a actividade das GSTs foi significativamente reforçada em glândulas digestivas e no manto e gónadas do mexilhão *Mytilus galloprovincialis* após uma exposição de 7 dias a concentrações ambientalmente relevantes da carbamazepina. Um aumento marcado da actividade das GSTs foi igualmente observado após exposição do crustáceo *Thamnocephalus platyurus* a carbamazepina, tal como descrito por Vernouillet et al. (2010). Este mesmo estudo, no entanto, refere que a exposição a carbamazepina pode ter resultados opostos devido a diferenças específicas; esta conclusão deriva da significativa inibição da actividade das GSTs do cnidário *Hydra attenuata*. Estudos com peixes (Li et al., 2010a, b, c; truta arco-íris e carpa comum) também referem que exposições de curta duração a carbamazepina são responsáveis por respostas adaptativas dos parâmetros de stress oxidativo. Nesta dissertação o biomarcador GRed no tubo digestivo correspondeu a este padrão adaptativo, contudo os resultados obtidos para a sua actividade são contrários aos observados nestes estudos. No estudo *in vitro* realizado por Li et al. (2010 a), verificou-se que os homogeneizados do cérebro de *O. mykiss* expostos a carbamazepina apresentavam uma inibição significativa da actividade da Gred. O mesmo estudo que refere que o homogeneizado do mesmo tecido, exposto a concentrações ambientalmente relevantes desta mesma droga, evidenciou uma ligeira diminuição da actividade desta enzima, embora não fosse significativa. O estudo de Li et al. (2010 b), por sua vez, avaliou os efeitos da carbamazepina ao nível dos espermatozóides da carpa comum (*Cyprinus carpio L.*), tendo verificado que a GRed em concentrações elevadas de carbamazepina sofre uma inibição significativa da sua actividade. Finalmente o estudo *in vivo* de Li et al. (2010 c) permitiu verificar que com o aumento do tempo de exposição de *O. mykiss* a carbamazepina a actividade da GRed no cérebro vai diminuindo gradualmente até ser significativamente inibida após 42 dias.

A GRed também sofreu um aumento significativo na sua actividade nas brânquias, mas esse aumento só se verificou na concentração mais baixa da exposição (62,5 $\mu\text{g L}^{-1}$), não se

estabelecendo um padrão dependente da dose. Portanto, não podemos referir este efeito como uma resposta do organismo a carbamazepina.

A peroxidação lipídica é particularmente importante para os animais aquáticos, e foi relatada como sendo um dos principais contribuintes para a perda da função das células sob stress oxidativo (Storey, 1996). Os resultados no presente trabalho mostraram que a exposição à carbamazepina durante 96 h não induziu alterações nos níveis de TBARS das brânquias e fígado de *L. gibbosus* nos tratamentos de carbamazepina relativamente ao grupo controlo. Li et al. (2011) também não verificaram diferenças significativas nos níveis de peroxidação lipídica no fígado de *O. mykiss*, pelo que desta forma os resultados são concordantes com os do presente trabalho. Resultados similares foram publicados por Vernouillet et al. (2010), quando avaliaram os efeitos peroxidativos da carbamazepina em *T. platyurus* e *H. attenuata*. Por sua vez, Arora et al. (2009) também não reportaram alterações nos níveis de MDA do cérebro de ratos após a exposição a carbamazepina e Martin-Diaz et al. (2009) não verificou nenhum efeito no conteúdo de MDA em glândulas digestivas de *Mytilus galloprovincialis*, estando de acordo com os resultados referidos anteriormente. Contrariamente, Li et al. (2011) observaram um aumento significativo da peroxidação lipídica nas brânquias e no cérebro de *O. mykiss*, após a exposição de 96 h a carbamazepina. Outros estudos (Li et al., 2010a, b e c) também contrariam os resultados obtidos no presente estudo, na medida em que a carbamazepina causou peroxidação lipídica, *in vitro* e *in vivo*, no cérebro de *O. mykiss* e nos espermatozóides de *C. carpio* L. Também o estudo de Martin-Diaz et al. (2009) com o mexilhão *Mytilus galloprovincialis*, demonstrou que a exposição a carbamazepina foi responsável pelo aumento significativo do conteúdo de MDA nas brânquias e no manto/gónadas. Uma possível explicação para no presente estudo não se ter verificado peroxidação lipídica nas brânquias contrariamente ao verificado nos estudos *in vivo* anteriormente citados, pode corresponder no estudo de Martin-Diaz et al. (2009) com o mexilhão *Mytilus galloprovincialis*, ao facto deste organismo ser um invertebrado e existem diferenças nas defesas antioxidantes dos invertebrados e vertebrados. No estudo de Li et al. (2011) com *O. mykiss* as concentrações (5, 10, 15, 20, 25 e 30 mg L⁻¹), por sua vez pode dever-se as concentrações a que os peixes foram expostos serem muito superiores as do presente estudo.

4.3. Fenitoína

A exposição de 96 h à droga fenitoína causou um aumento significativo tanto ao nível da actividade da catalase (CAT) como das glutathione S-transferases (GSTs) no fígado de *L. gibbosus*. Estas alterações sugerem alterações adaptativas ao stress oxidativo, e o facto de ter sido o único órgão avaliado a sofrer alterações ao nível das enzimas antioxidantes poderá dever-se à sua importância como órgão-alvo para a biotransformação da fenitoína, e consequente toxicidade

(Gallagher e Sheehy, 2001). Gallagher e Sheehy (2001) também reportaram que a exposição do fígado humano a fenitoína é responsável pelo aumento da expressão da isoenzima da GST hGSTA1-1.

A fenitoína também foi responsável por uma redução significativa nos níveis de TBARS das brânquias dos peixes expostos a concentração de fenitoína de 25 $\mu\text{g L}^{-1}$, mas sem estabelecimento de um padrão dependente da concentração. Logo, não parece ter sido causado um quadro de stress oxidativo. Hilscherova et al. (2003) obtiveram resultados contrários a estes, tendo verificado que a fenitoína - que é conhecida por ser um indutor de stress oxidativo quando injectada em ovos de galinha - foi responsável por um aumento da susceptibilidade para a peroxidação lipídica ao nível do fígado e do cérebro do embrião em desenvolvimento. De modo similar, os resultados obtidos por Reeta et al. (2009) evidenciaram o aumento da formação de MDA em roedores, após exposição crónica a fenitoína.

A fenitoína é conhecida pela produção de ROS e os seus efeitos citotóxicos e teratogénicos podem ser bloqueados pela acção de enzimas como a superóxido dismutase, a catalase, ou antioxidantes como a glutathione na sua forma reduzida (Gallagher e Sheehy, 2001; Abramov e Wells, 2011). O metabolismo humano também é impactado pela administração de fenitoína, com aumento da peroxidação lipídica e da actividade da enzima antioxidante superóxido dismutase, concomitantemente com uma diminuição da concentração da glutathione reduzida (Liu et al., 1998). A depleção de GSH intracelular é um resultado comum da exposição a fenitoína, como demonstrado por Raya et al. (1995), contribuindo decisivamente para o cenário de stress oxidativo. Os ROS associados à bioactivação da fenitoína podem danificar macromoléculas essenciais, tais como proteínas, DNA, lípidos entre outras (Mahle na Dasgupta, 1997; Kasapinovic et al., 2004). Alguns estudos abordam os efeitos tóxicos desses danos, nomeadamente a oxidação do DNA e recombinação homóloga (Winn et al., 2003) e a teratogénese (Wells et al., 2009). As alterações ao nível de biomarcadores de stress oxidativo e níveis de GSH são utilizados em estudos dos efeitos da fenitoína (Gallagher e Sheehy, 2001; Hilscherova et al., 2003; Reeta et al., 2009), mas dos estudos encontrados até data não existiam dados no âmbito ecotoxicológico com organismos aquáticos. Desta forma o presente estudo traz nova informação acerca dos efeitos do stress oxidativo induzidos pela fenitoína, que ficaram demonstrados pela conjugação dos efeitos observados, ainda que pouco pronunciados (para as concentrações estudadas). É de destacar que a relevância do presente estudo, particularmente no que diz respeito aos efeitos decorrentes da exposição à droga fenitoína, assume uma importância elevada. Se considerarmos que as concentrações aqui utilizadas foram já reportadas em efluentes de estações de tratamento de águas residuais, tal foi referido anteriormente, estão próximas da ordem de grandeza em que esta substância se encontra nos meios aquáticos receptores.

CONCLUSÕES GERAIS

5. Conclusões gerais

A avaliação dos potenciais efeitos de compostos farmacêuticos em organismos não-alvo em ambientes contaminados é algo que merece atenção, pois apesar da gama a que eles se encontram no ambiente ser baixa, variando de ng L^{-1} a μgL^{-1} , é suficiente para induzir efeitos tóxicos ao nível dos organismos. Desta forma, o presente trabalho teve como principal objectivo a avaliação dos efeitos da carbamazepina, diazepam e fenitoína, três drogas antiepiléticas encontradas em concentrações relativamente elevadas no ambiente, em parâmetros de stress oxidativo do peixe de água doce *Lepomis gibbosus* (perca-sol).

Neste trabalho, os biomarcadores de stress oxidativo escolhidos para avaliar os efeitos destes três fármacos em *L. gibbosus* apresentaram grande variabilidade de resposta nos diferentes órgãos de *L. gibbosus* e nos diferentes biomarcadores dentro do mesmo órgão. Apesar disso verificou-se que o tubo digestivo e o fígado foram os órgãos mais responsivos em relação à actividade das enzimas de stress oxidativo.

A nível individual, os efeitos de cada fármaco foram característicos. O diazepam foi principalmente responsável por alterações ao nível do tubo digestivo, tendo causado um aumento significativo ao nível da actividade das GSTs e uma diminuição significativa da actividade da GRed, dependentes da concentração do fármaco. No entanto, não se obteve indicações de que *L. gibbosus* se encontrava sob um cenário de stress oxidativo, pois não se verificaram alterações nos níveis de TBARS nas brânquias e fígado. A carbamazepina foi responsável, principalmente, por alterações adaptativas ao nível do tubo digestivo, nomeadamente o aumento da actividade das GSTs e GRed. Contudo, em relação aos níveis de TBARS, só avaliados ao nível das brânquias e do fígado, não se verificou o estabelecimento de um cenário de stress. Por último, a fenitoína, contrariamente aos resultados observados para os últimos dois compostos, foi principalmente responsável por alterações ao nível da actividade das enzimas de stress oxidativo do fígado (CAT e GSTs). Apesar das alterações adaptativas ao stress oxidativo consistentes no fígado, não se observou, ao nível deste órgão, alterações nos níveis de TBARS, não podendo desta forma sustentar o estabelecimento de um cenário de stress oxidativo na exposição de *L. gibbosus* a este xenobiótico.

Apesar das respostas dos biomarcadores aos três compostos não poderem sustentar um cenário de stress oxidativo, verificou-se que o sistema antioxidante, independentemente do órgão onde é mais responsivo em cada um dos fármacos, desenvolve respostas adaptativas à sua presença, algumas das quais em concordância com estudos anteriores que reportam efeitos destes fármacos (Musavi e Kakkar, 1998; Gallagher e Sheehy, 2001; Nunes et al., 2006; Nunes et al., 2008; Arora et al., 2009; Martin-Diaz et al., 2009; Li et al., 2011). Para além disso, a avaliação dos efeitos da fenitoína ao nível do peixe de água doce *L. gibbosus* representou informação nova sobre os efeitos

do stress oxidativo induzidos pela fenitoína, pois até à data não existem estudos no âmbito ecotoxicológico com organismos aquáticos. Destaca-se assim novamente a importância ecotoxicológica destes dados, pois os efeitos oxidativos foram observados e determinados em concentrações muito próximas das que foram já documentadas em cenários reais. No caso dos outros dois fármacos, não será possível concluir o mesmo. Embora se considere que foram testados em concentrações relativamente elevadas, estas foram já determinadas em casos esporádicos e pontuais de elevada contaminação antropogénica. Podemos assim assumir que é improvável que surjam efeitos oxidativos decorrentes da exposição de *Lepomis gibbosus* a estes compostos, diazepam e carbamazepina.

A utilização de *L. gibbosus* como modelo ecotoxicológico para avaliação dos efeitos destas três drogas anticonvulsivantes, pese embora não se ter verificado um cenário de stress oxidativo, demonstra ser adequada e promissora, na medida em que evidencia sensibilidade a estes fármacos, com o desenvolvimento de respostas adaptativas das enzimas antioxidantes na sua presença. Algumas das respostas adaptativas verificadas em *L. gibbosus* encontram-se de acordo com estudos em outras espécies de peixes de água doce ou eurihalinas, nomeadamente os estudos de Li et al. (2010 a,c) e Li et al. (2011) com *Oncorhynchus mykiss* e o de Li et al. (2010b) com *Cyprinus carpio* L. Este achado é de grande importância, pois em conjunto com os resultados obtidos por Rodrigues et al. (2011) também com *L. gibbosus* para o detergente aniónico SDS e o pesticida clorfenvinfos, permite-nos propor o uso de *L. gibbosus* como potencial espécie modelo na monitorização de ambientes contaminados.

As alterações produzidas por estas três drogas nas respostas de *L. gibbosus*, apesar de não indicarem um cenário de elevada toxicidade, são importantes, pois os intervalos de concentrações testados podem ser considerados ecologicamente relevantes, atendendo às concentrações que podem ser encontradas a nível ambiental. Reconhecidamente, o tempo de exposição no presente trabalho foi reduzido, e seria importante desenvolver estudos mais prolongados (que incluíssem uma parte significativo do ciclo de vida do organismo) para poder concluir-se acerca das alterações fisiológicas e bioquímicas provocadas pela exposição a estas drogas. A presença dos compostos farmacêuticos é mais ou menos contínua em baixas concentrações no ambiente aquático, pelo que será mais relevante e provável que apresentem efeitos tóxicos crónicos (Crane et al., 2006 e Li e Randak, 2009). Assim, alguns critérios possíveis a adoptar em avaliações futuras do potencial efeito destes fármacos são o aumento de tempo de exposição (ex: teste de 28 dias), de modo aumentar a relevância ecológica, para além da avaliação de outros biomarcadores envolvidos no processo de stress oxidativo, e a avaliação de alterações em outros órgãos (ex: cérebro, músculo dorsal).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

6. Referências bibliográficas

- Abdelmajeed, N. A. (2009) Diazepam-induced Oxidative Stress Inrat Different Organs, *Research Journal of Medicine and Medical Sciences* 4, 295–302.
- Abramov, J. P., e Wells, P. G. (2011) Embryoprotective Role of Endogenous Catalase in Acatalasemic and Human Catalase-Expressing Mouse Embryos Exposed in Culture to Developmental and Phenytoin-Enhanced Oxidative Stress, *Toxicological Sciences* 120, 428-438.
- Abrantes, N., Pereira, R., e Gonçalves, F. (2006) First Step for an Ecological Risk Assessment to Evaluate the Impact of Diffuse Pollution in Lake Vela (Portugal), *Environmental monitoring and assessment*, 411-431.
- Aebi, H. (1984) Catalase in vitro. *Methods in enzymology* 6, 105–121.
- Almeida, J. A., Diniz, Y. S., Marques, S. F. G., Faine, L. A., Ribas, B. O., Burneiko, R. C., e Novelli, E. L. B., (2002) The use of the oxidative stress responses as biomarkers in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) exposed to in vivo cadmium contamination, *Environment International* 27, 673–679.
- Arora, T., Mehta, A. K., Sharma, K. K., Mediratta, P. K., Banerjee, B. D., Garg, G. R., e Sharma, A. K. (2010) Effect of Carbamazepine and Lamotrigine on Cognitive Function and Oxidative Stress in Brain during Chemical Epileptogenesis in Rats, *Basic & clinical pharmacology & toxicology* 106, 372–377.
- Azevedo, F.A., e Chasin A.A.M. (2004) As Bases Toxicológicas da Ecotoxicologia. InterTox. São Paulo, 1-25 e 245-322pp
- Bagnyukova, T.V., Vasylykiv, O.Y., Storey, e K.B., Lushchak, V.I. (2005) Catalase inhibition by amino triazole induces oxidative stress in goldfish brain, *Brain Res* 1052, 180–186.
- Barillet, S., Buet A., Adam C., e Devaux A. (2005) Does uranium exposure induce genotoxicity in the teleostean *Danio rerio*? First experimental results. *Radioprotection* 40, 175-181.
- Benotti, M. J., Trenholm, R. A., Vanderford, B. J., Holady, J. C., Stanford, B. D., e Snyder, S. A. (2009) Pharmaceuticals and Endocrine Disrupting Compounds in U.S. Drinking Water, *Environmental Science & Technology* 43, 597-603.
- Berntssen, M. H. G., Aatland, A., e Handy, R. D. (2003). Chronic dietary mercury exposure causes oxidative stress, brain lesions, and altered behaviour in Atlantic salmon (*Salmo salar*) parr, *Aquatic Toxicology* 65 (1), 55–72.

- Blanchette, B., Feng, X., e Singh, B. R. (2007) Marine Glutathione S –Transferases, *Marine biotechnology* 9, 513–542.
- Brackenbury, T. D., e Appleton, C. C. (1997) Acute toxicity evaluation of the plant molluscicide, *Apodytes dimidiata* (Icacinaceae), to *Eisenia fetida* (Oligochaeta) and *Oreochromis mossambicus* (Cichlidae) in South Africa, *Acta Trop* 63, 1-14.
- 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, 248–254.
- Brillas, E., Sirés, I., Aria, C., Cabot, P. L., Centellas, F., Rodríguez, R. M., e Garrido, J. A. (2005) Mineralization of paracetamol in aqueous medium by anodic oxidation with a boron-doped diamond electrode, *Chemosphere* 58, 399-406.
- Brun, G. L., Bernier, M., Losier, R., Doe, K., Jackman, P., e Lee, H. (2006) Pharmaceutically active compounds in Atlantic Canadian sewage treatment plant effluents and receiving waters, and potential for environmental effects as measured by acute and chronic Aquatic Toxicity, *Environmental Toxicology and Chemistry* 25, 2163-2176.
- Buege, J. A., Aust, S. D. (1978) Microsomal lipid peroxidation, *Methods in enzymology* 52, 302-310.
- Cairns, J., e Pratt, J. R. (1989) The scientific basis of bioassays, *Hydrobiologia* 188-189, 5-20.
- Carlberg, I., e Mannervik, B. (1985) Glutathione reductase, *Methods in enzymology* 113, 484–490.
- Castro B.B. (2001) Sensibilidade e relevância ecológica de ensaios ecotoxicológicos para avaliação de risco em locais contaminados, Dissertação de Mestrado, Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra, Coimbra, 2-15.
- Castro, B. B., Consciência, S., e Gonçalves, F. (2007) Life history responses of *Daphnia longispina* to mosquitofish (*Gambusia holbrooki*) and pumpkinseed (*Lepomis gibbosus*) kairomones, *Hydrobiologia* 594, 165-174.
- Castro, B. B., e Gonçalves, F. (in press). Planktivory in non-indigenous fish and implications for trophic interactions in a Mediterranean shallow lake. *Annales de Limnologie*.
- Castro, B. B., Gonçalves F. (2007) Seasonal dynamics of the crustacean zooplankton of a shallow eutrophic lake from the Mediterranean region, *Fundam., Appl. Limnol.* 169, 189–202.
- Clara, M., Strenn, B., e Kreuzinger, N. (2004) Carbamazepine as a possible anthropogenic marker in the aquatic environment: investigations on the behaviour of Carbamazepine in wastewater treatment and during groundwater infiltration, *Water Research* 38, 947–954.
- Cleuvers, M. (2003) Aquatic ecotoxicity of pharmaceuticals including the assessment of combination effects, *Toxicology letters* 142, 185–194.
- Connors, D. E. Biomarkers of oxidative stress in freshwater clams (*Corbicula fluminea*) as mechanistic tools to evaluate the impairment of stream ecosystem health by lawn care

- pesticides. University of Georgia [Internet]. 2004 [cited 2011 March 18]. Available from: http://getd.galib.uga.edu/public/conners_deanna_e_200405_phd/conners_deanna_e_200405_phd.pdf
- Crane, M., Watts, C., e Boucard, T. (2006) Chronic aquatic environmental risks from exposure to human pharmaceuticals, *Science of the Total Environment* 367, 23-41.
- Danzo, B. J. (1997) Environmental xenobiotics may disrupt normal endocrine function by interfering with the binding of physiological ligands to steroid receptors and binding proteins., *Environmental Health Perspectives* 105, 294.
- Daughton, C. G., e Ternes, T. A. (1999) Pharmaceuticals and personal care products in the environment: Agents of subtle change?, *Environmental Health Perspectives* 907-938.
- De Lange, H. J., Noordoven, W., Murk, A. J., Lüring, M., e Peeters, E. T. H. M. (2006) Behavioural responses of *Gammarus pulex* (Crustacea, Amphipoda) to low concentrations of pharmaceuticals, *Aquatic Toxicology* 78, 209-216.
- Domingos, F. X. V. (2006) Biomarcadores de contaminação ambiental em peixes e ostras de três estuários brasileiros e cinética de derivados solúveis de petróleo em peixes, Dissertação de Doutorado, Universidade Federal do Paraná, Paraná, 1-10.
- El-Sokkary, G.H. (2008). Melatonin and vitamin C administration ameliorate diazepam-induced oxidative stress and cell proliferation in the liver of rats, *Cell Proliferation* 41(1): 168-76.
- Fent, K., Weston, A. A., e Caminada, D. (2006) Ecotoxicology of human pharmaceuticals, *Aquatic toxicology* 76, 122-159.
- Ferrari, B., Paxéus, N., Giudice, R. L., Pollio, A., e Garric, J. (2003) Ecotoxicological impact of pharmaceuticals found in treated wastewaters: study of carbamazepine, clofibrac acid, and diclofenac, *Ecotoxicology and Environmental Safety* 55, 359-370.
- Filippon, L. (2011) Investigação de Parâmetros de Extresse Oxidativo em Pacientes com Mucopolossacaridose tipo II: Efeito da Terapia de Reposição Enzimática, Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rio Grande do Sul, 17-19.
- Fontáinhas-Fernandes, A. (2005) The use of biomarkers in aquatic toxicology studies, *Revista Portuguesa de Zootecnia* 1, 67-86.
- Gallagher, E. P., e Sheehy, K. M. (2001) Effects of phenytoin on glutathione status and oxidative stress biomarker gene mRNA levels in cultured precision human liver slices, *Toxicological Sciences* 59, 118.
- Ganiyat, A. M. (2008) The Toxicological Evaluation of Sewage Effluents and Pharmaceuticals with the use of Zebrafish as a Model Organism, *Faculty of Veterinary Medicine and Animal Science and Swedish University of Agricultural Sciences* 7, 1403-2201.

- Greco, L., Capri, E., e Rustad, T. (2007) Biochemical responses in *Salmo salar* muscle following exposure to ethynylestradiol and tributyltin, *Chemosphere* 68, 564–571.
- Gross, B., Montgomery-Brown, J., Naumann, A., e Reinhard, M. (2004) Occurrence and fate of pharmaceuticals and alkylphenol ethoxylate metabolites in an effluent-dominated river and wetland, *Environmental toxicology and chemistry* 23, 2074-2083.
- Habig, W. H., Pabst, M. J., e Jakoby, W. B. (1974). Glutathione- S-transferases—the first enzymatic step in mercapturic acid formation, *J Biol Chem* 249, 7130–7139.
- Halling-Sørensen, B., Nors Nielsen, S., Lanzky, P. F., Ingerslev, F., Holten Lützhøft, H. C., e Jørgensen, S. E. (1998) Occurrence, fate and effects of pharmaceutical substances in the environment-a review, *Chemosphere* 36, 357–393.
- Halliwell, B. (2006) Reactive Species and Antioxidants. Redox Biology Is a Fundamental Theme of Aerobic Life, *Plant Physiology* 141, 312–322.
- Halliwell, B., Gutteridge, J. M. C. (Eds.).(1999). Free Radicals in Biology and Medicine. *Oxford Univ. Press*, Oxford.
- Handy, R. D., Galloway, T. S., e Depledge, M. H. (2003) A proposal for the use of biomarkers for the assessment of chronic pollution and in regulatory toxicology, *Ecotoxicology* 12, 331–343.
- Heberer, T. (2002) Occurrence, fate, and removal of pharmaceutical residues in the aquatic environment: a review of recent research data, *Toxicology Letters* 131, 5-17.
- Hernando, M. D., Mezcuca, M., Fernandez-Alba, A. R., e Barcelo, D. (2006) Environmental risk assessment of pharmaceutical residues in wastewater effluents, surface waters and sediments, *Talanta* 69, 334–342.
- Hilscherova, K., Blankenship, A. L., Nie, M., Coady, K. K., Upham, B. L., Trosko, J. E., e Giesy, J. P. (2003) Oxidative stress in liver and brain of the hatchling chicken (*Gallus domesticus*) following in ovo injection with TCDD, *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 136, 29–45.
- Huang, C.-H., Chang, R.-J., Huang, S.-L., e Chen, W. (2003) Dietary vitamin E supplementation affects tissue lipid peroxidation of hybrid tilapia, *Oreochromis niloticus* x *O. aureus*, *Comp. Biochem. Physiol. B, Biochem. Mol. Biol* 134, 265-270.
- Infarmed. 2009. Estatística do Medicamento, 0-94
- Infarmed. 2010. Prontuário Terapêutico. Ministério da Saúde, 101-102 e 83-97
- John, S., Kale, M., Rathore, N., e Bhatnagar, D. (2001) Protective effect of vitamin E in dimethoate and malathion induced oxidative stress in rat erythrocytes, *J. Nutr. Biochem* 12, 500-504.
- Jones, O. A. H., Voulvoulis, N., e Lester, J. N. (2002) Aquatic environmental assessment of the top 25 English prescription pharmaceuticals, *Water research* 36, 5013–5022.

- Kasapinovic, S., McCallum, G. P., Wiley, M. J., e Wells, P. G. (2004) The peroxyxynitrite pathway in development: phenytoin and benzo [a] pyrene embryopathies in inducible nitric oxide synthase knockout mice, *Free Radical Biology and Medicine* 37, 1703–1711.
- Kim, S. D., Cho, J., Kim, I. S., Vanderford, B. J., e Snyder, S. A. (2007) Occurrence and removal of pharmaceuticals and endocrine disruptors in South Korean surface, drinking, and waste waters, *Water research* 41, 1013–1021.
- Kime, D. E. (1999) A strategy for assessing the effects of xenobiotics on fish reproduction, *The Science of the total environment* 225, 3–11.
- Klaassen C.D. 2001. Casarett & Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons. 6th Edition. *McGraw-Hill*, 133-224.
- Koutsouba, V., Heberer, T., Fuhrmann, B., Schmidt-Baumler, K., Tsipi, D., e Hiskia, A. (2003) Determination of polar pharmaceuticals in sewage water of Greece by gas chromatography-mass spectrometry* 1, *Chemosphere* 51, 69–75.
- Kowalski, P.A.O.P. (2009) Uso combinado de dados químicos e biomarcadores em espécies-chave aquáticas - Estudo ecotoxicológico na Lagoa de Óbidos), Dissertação de Doutorado, Universidade de Aveiro, Aveiro 42-52.
- Kurutas, E. B., Şahan, A., e Altun, T. (2009) Oxidative stress biomarkers in liver and gill tissues of spotted barb (*Capoeta barroisi* Lortet, 1894) living in the river Ceyhan, Adana, Turkey, *Turk J Biol* 33, 275–282.
- Laville, N., Ait-Aissa, S., Gomez, E., Casellas, C., e Porcher, J. M. (2004) Effects of human pharmaceuticals on cytotoxicity, EROD activity and ROS production in fish hepatocytes, *Toxicology* 196, 41–55.
- Li, Z. H., e Randak, T. (2009) residual pharmaceutically active compounds (PhAcS) in aquatic environment—status, toxicity and kinetics: a review, *Veterinarni Medicina* 54, 295–314.
- Li, Z. H., Li, P., e Randak, T. (2010a) Effect of human pharmaceutical carbamazepine on antioxidant responses in brain of a model teleost *in vitro*: an efficient approach to biomonitoring, *Journal of Applied Toxicology* 30, 644-648.
- Li, Z. H., Li, P., Rodina, M., e Randak, T. (2010b) Effect of human pharmaceutical Carbamazepine on the quality parameters and oxidative stress in common carp (*Cyprinus carpio* L.) spermatozoa, *Chemosphere* 80, 530–534.
- Li, Z. H., Zlabek, V., Velisek, J., Grabic, R., Machova, J., e Randak, T. (2010c) Modulation of antioxidant defence system in brain of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) after chronic carbamazepine treatment, *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 151, 137–141.
- Li, Z. H., Zlabek, V., Velisek, J., Grabic, R., Machova, J., Kolarova, J., Li, P., e Randak, T. (2011)

- Acute toxicity of carbamazepine to juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): Effects on antioxidant responses, hematological parameters and hepatic EROD, *Ecotoxicology and Environmental Safety* 74, 319-327
- Limón-Pacheco, J., e Gonsebatt, M. E. (2009) The role of antioxidants and antioxidant-related enzymes in protective responses to environmentally induced oxidative stress, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 674, 137–147.
- Lishman, L., Smyth, S. A., Sarafin, K., Kleywegt, S., Toito, J., Peart, T., Lee, B., Servos, M., Beland, M., e Seto, P. (2006) Occurrence and reductions of pharmaceuticals and personal care products and estrogens by municipal wastewater treatment plants in Ontario, Canada, *Science of The Total Environment* 367, 544-558.
- Liu, C. S., Wu, H. M., Kao, S. H., e Wei, Y. H. (1998) Serum trace elements, glutathione, copper/zinc superoxide dismutase, and lipid peroxidation in epileptic patients with phenytoin or carbamazepine monotherapy, *Clin Neuropharmacol* 21, 62-64.
- Livingstone, D. R. (2001) Contaminant-stimulated Reactive Oxygen Species Production and Oxidative Damage in aquatic Organisms, *Marine pollution bulletin* 42(8), 656-666.
- Lushchak, V. I. (2011) Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals, *Aquatic Toxicology* 101, 13–30
- Mahle, C., e Dasgupta, A. (1997) Decreased total antioxidant capacity and elevated lipid hydroperoxide concentrations in sera of epileptic patients receiving phenytoin, *Life sciences* 61, 437–443.
- Martin-Diaz, L., Franzellitti, S., Buratti, S., Valbonesi, P., Capuzzo, A., e Fabbri, E. (2009) Effects of environmental concentrations of the antiepileptic drug carbamazepine on biomarkers and cAMP-mediated cell signaling in the mussel *Mytilus galloprovincialis*, *Aquatic Toxicology* 94, 177–185.
- McQuillan, D., Parker, J., Chapman, T. H., Sherrell, K., e Mills, D. (2000) Drug residues in ambient water: Initial surveillance in New Mexico, USA. Em *Proceedings of the 3rd International Conference on Pharmaceuticals and Endocrine Disrupting Chemicals in Water*. Westerville, Ohio: National Ground Water Association.
- Metcalfe, C. D., Koenig, B. G., Bennie, D. T., Servos, M., Ternes, T. A., e Hirsch, R. (2003a) Occurrence of neutral and acidic drugs in the effluents of Canadian sewage treatment plants, *Environmental toxicology and chemistry* 22, 2872–2880.
- Metcalfe, C. D., Miao X. S., Koenig, B.G., Struger J. (2003b) Distribution of acidic and neutral drugs in surface waters near sewage treatment plants in the lower Great Lakes, Canada, *Environmental Toxicology and Chemistry* 22(12), 2881–2889.
- Miao, X. S., Koenig, B. G., e Metcalfe, C. D. (2002) Analysis of acidic drugs in the effluents of

- sewage treatment plants using liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry, *Journal of chromatography A* 952, 139–147.
- Musavi, S., e Kakkar, P. (1998) Diazepam induced early oxidative changes at the subcellular level in rat brain, *Molecular and cellular biochemistry* 178, 41–46.
- Musavi, S., e Kakkar, P. (2003) Effect of diazepam treatment and its withdrawal on pro/antioxidative processes in rat brain, *Molecular and cellular biochemistry* 245, 51–56.
- Newman, N.C. (2001) Fundamentals of Ecotoxicology, *Lewis Publishers*.
- NRC: Committee on Biological Markers of the National Research Council. (1987) Biological markers in environmental health research. *Environ. Health Perspect.* 74, 3-9.
- Nunes, B. (2010) Fármacos no ambiente: implicações ecotoxicológicas, *Captar* 2(1), 9-20.
- Nunes, B., Carvalho, F., e Guilhermino L. (2004) Acute and chronic effects of clofibrate and clofibric acid on the enzymes acetylcholinesterase, lactate dehydrogenase and catalase of the mosquitofish, *Gambusia holbrooki*, *Chemosphere* 57, 1581–1589.
- Nunes, B., Carvalho, F., e Guilhermino, L. (2006) Effects of widely used pharmaceuticals and a detergent on oxidative stress biomarkers of the crustacean *Artemia parthenogenetica*, *Chemosphere* 62, 581–594.
- Nunes, B., Gaio, A. R., Carvalho, F., e 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, 341–354.
- Oakes, K. D., e Van Der Kraak, G. J. (2003) Utility of the TBARS assay in detecting oxidative stress in white sucker (*Catostomus commersoni*) populations exposed to pulp mill effluent. *Aquatic Toxicology* 63, 447–463.
- Oggier, D. M., Weisbrod, C. J., Stoller, A. M., Zenker, A. K., e Fent, K. (2010) Effects of Diazepam on Gene Expression and Link to Physiological Effects in Different Life Stages in Zebrafish *Danio rerio*, *Environmental science & technology*.
- Pacheco, M., (1999) Estudo *in vivo* e *in vitro* de efeitos bioquímicos, fisiológicos e citogenéticos provocados por modificações do ambiente, em *Anguilla anguilla*, Dissertação de Doutoramento, Universidade de Aveiro.
- Pamplona, J. H., Oba, E. T., da Silva, T. A., Ramos, L. P., Ramsdorf W. A., Cestari, M. M., Oliveira Ribeiro, C. A., Zampronio, A. R., e Silva de Assis, H. C. (2011) Subchronic effects of dipyrone on the fish species *Rhamdia quelen*, *Ecotoxicology and Environmental Safety* 74, 342–349.
- Pandey, S., Parvez, S., Sayeed, I., Haque, R., Bin-Hafeez, B., e Raisuddin, S. (2003) Biomarkers of oxidative stress: a comparative study of river Yamuna fish *Wallago attu* (Bl.&Schn.), *The Science of the Total Environment* 309, 105–115.

- Peakall, D. B. (1994) The role of biomarkers in environmental assessment (1). Introduction. *Ecotoxicology* 3, 157-160.
- Pereira, P., Castro, B. B., Vingada, J.V., Gonçalves, F., Pereira R. (2010) Manipulação experimental da densidade piscícola na lagoa da Vela: uma perspectiva aplicada, *Captar* 2(1),45-56.
- Quinn, B., Gagné, F., e Blaise, C. (2008) An investigation into the acute and chronic toxicity of eleven pharmaceuticals (and their solvents) found in wastewater effluent on the cnidarian, *Hydra attenuata*, *Science of the Total Environment* 389, 306–314.
- Raya, A., Gallego, J., Bosch-Morell, F., Romá, J., e Romero, F. J. (1995) Phenytoin-induced glutathione depletion in rat peripheral nerve, *Free Radic. Biol. Med* 19, 665-667.
- Reeta, K. H., Mehla, J., e Gupta, Y. K. (2009) Curcumin is protective against phenytoin-induced cognitive impairment and oxidative stress in rats, *Brain Res* 1301, 52-60.
- Roberts, P. H., e 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, 143–153.
- Rodrigues, S. R., Caldeira, C., Castro, B. B., Gonçalves, F., Nunes, B., e Antunes, S. C. (2011) Cholinesterase (ChE) inhibition in pumpkinseed (*Lepomis gibbosus*) as environmental biomarker: ChE characterization and potential neurotoxic effects of xenobiotics, *Pesticide Biochemistry and Physiology* 99, 181-188.
- Sanderson, H., Johnson, D. J., Reitsma, T., Brain, R. A., Wilson, C. J., e Solomon, K. R. (2004) Ranking and prioritization of environmental risks of pharmaceuticals in surface waters, *Regulatory toxicology and pharmacology* 39, 158–183.
- Schrap, S. M., Rijs, G. B. J., Beek, M. A., Maaskant, J. F. N., Staeb, J., Stroomberg, G., e Tiesnitsch, J. (2003) Humane en veterinaire geneesmiddelen in Nederlands oppervlaktewater en afvalwater, *Lelystad: RIZA*.
- Seçkin, Ş., Alsancak, Ş., Başaran-Küçükgergin, C., e Uysal, M. (2007) The effect of chronic diazepam administration on lipid peroxidation and Ca²⁺-ATPase activity in rat liver, *Acta Biologica Hungarica* 58, 441-443.
- Storey, K. B. (1996) Oxidative stress: animal adaptations in nature, *Braz. J. Med. Biol. Res* 29, 1715-1733.
- Ternes, T. A. (1998) Occurrence of drugs in German sewage treatment plants and rivers, *Water research* 32, 3245–3260.
- Ternes, T. A., e Hirsch, R. (2000) Occurrence and Behavior of X-ray Contrast Media in Sewage Facilities and the Aquatic Environment, *Environmental science & technology*.34, 2741-2748.

- Thomas, K. V., Dye, C., Schlabach, M., e Langford, K. H. (2007) Source to sink tracking of selected human pharmaceuticals from two Oslo city hospitals and a wastewater treatment works, *Journal of environmental monitoring*. 9,1410.
- Tixier, C., Singer, H. P., Oellers, S., e Müller, S. R. (2003) Occurrence and Fate of Carbamazepine, Clofibrac Acid, Diclofenac, Ibuprofen, Ketoprofen, and Naproxen in Surface Waters, *Environmental science & technology*. 37, 1061-1068.
- van den Brandhof, E. J., e Montforts, M. (2010) Fish embryo toxicity of carbamazepine, diclofenac and metoprolol, *Ecotoxicology and Environmental Safety* 73, 1862–1866.
- van der Oost, R. V. D., Beyer, J., e Vermeulen, N. P. E. (2003) Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review, *Environmental Toxicology and Pharmacology* 13, 57–149.
- Venediktova, N. I., Kosenko, E. A., e Kaminsky Y. G. (2006) Antioxidant Enzymes, Hydrogen Peroxide Metabolism, and Respiration in Rat Heart during Experimental Hyperammonemia, *Biology Bulletin* 33(3), 281-286
- Vernouillet, G., Eullaffroy, P., Lajeunesse, A., Blaise, C., François Gagné, F., e Juneau, P. (2010). Toxic effects and bioaccumulation of carbamazepine evaluated by biomarkers measured in organisms of different trophic levels, *Chemosphere* 80(9): 1062-1068.
- Walker C.H., Hopkin, S.P., Sibly, R.M., Peakall, D.B. (2001) Principles of Ecotoxicology. Second Edition. Library of Congress Cataloging in Publication Data, 59-89 e163-178.
- Wang, W., e Ballatori., N. (1998) Endogenous Glutathione Conjugates: Occurrence and Biological Functions, *Pharmacological. Review*. 50 (3), 335-355.
- Wells, P. G., McCallum, G. P., Chen, C. S., Henderson, J. T., Lee, C. J. J., Perstin, J., Preston, T. J., Wiley, M. J., e Wong, A. W. (2009) Oxidative stress in developmental origins of disease: teratogenesis, neurodevelopmental deficits, and cancer, *Toxicological sciences* 108, 4.
- WHO, International Programme on Chemical Safety (IPCS). (1993) Biomarkers and risk assessment: concepts and principles. *Environmental Health Criteria* 155, World Health Organization, Geneva.
- Winn, L. M., Kim, P. M., e Nickoloff, J. A. (2003) Oxidative stress-induced homologous recombination as a novel mechanism for phenytoin-initiated toxicity, *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 306, 523.
- Winston, G.W., Di Giulio, R.T. (1991) Prooxidant and antioxidant mechanisms in aquatic organisms. *Aquatic toxicology* 19, 137-161.
- Yang, L., Yu, L. E., e Ray, M. B. (2008) Degradation of paracetamol in aqueous solutions by TiO₂ photocatalysis, *Water research* 42, 3480–3488.

- Yu, J. T., Bouwer, E. J., e Coelhan, M. (2006) Occurrence and biodegradability studies of selected pharmaceuticals and personal care products in sewage effluent, *Agricultural water management* 86, 72–80.
- Zhang, X. C., Shan, P.Y., Sasidhar, M., Chupp, G. L., Flavell, R. A., Choi, A. M. K., Lee, P. J. (2003) Reactive oxygen species and extracellular signal-regulated kinase 1/2 mitogenactivated protein kinase mediate hyperoxia-induced cell death in lung epithelium. *American journal of respiratory cell and molecular biology* 28, 305–315.
- Zuccato, E., Calamari, D., Natangelo, M., e Fanelli, R. (2000) Presence of therapeutic drugs in the environment, *The Lancet* 355, 1789-1790.