



# Herramientas y metodologías ecotoxicológicas para la evaluación del impacto de contaminantes emergentes

**Teresa Neuparth, Susana Barros e Miguel Santos**

tneuparth@ciimar.up.pt



Grupo de Investigação  
Disruptores Endócrinos e  
Contaminantes Emergentes

Vigo, 29 de outubro de 2025

**Interreg**

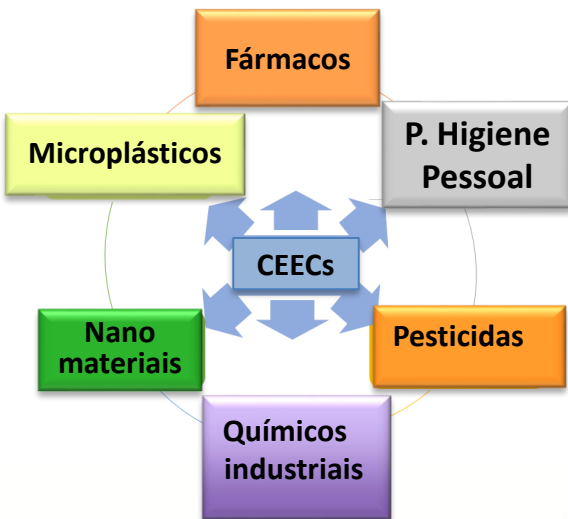


Cofinanciado por  
la Unión Europea  
Cofinanciado pela  
União Europeia

España – Portugal



# Contaminantes de Preocupação Emergentes (CECs)



- Recentes ou de preocupação recente – detetados nos ecossistemas aquáticos em concentrações baixas (ng/L - µg/L)
- Não incluídos na maioria dos programas de monitorização ou na regulamentação ambiental
- Efeitos adversos em organismos não-alvo
- Conhecimento sobre a persistência e o risco dos CECs ainda limitado

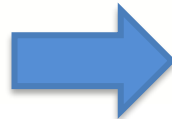


**Que ferramentas/metodologias  
são usadas na avaliação do  
impacto dos CECs?**

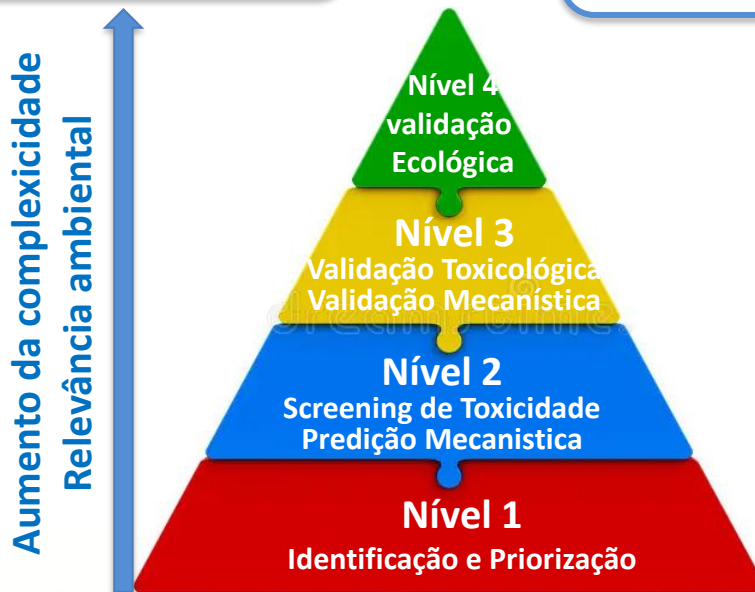
# Avaliação faseada do impacto dos CECs no meio aquático



Avaliação gradual dos potenciais  
riscos ambiental dos CECs



- Otimização de recursos
- Redução de bioensaios com animais
- Foco CECs com relevância ecológica



Cofinanciado por  
la Unión Europea  
Cofinanciado pela  
União Europeia



# Exemplo: Nível 1 - Identificação e Prioritização

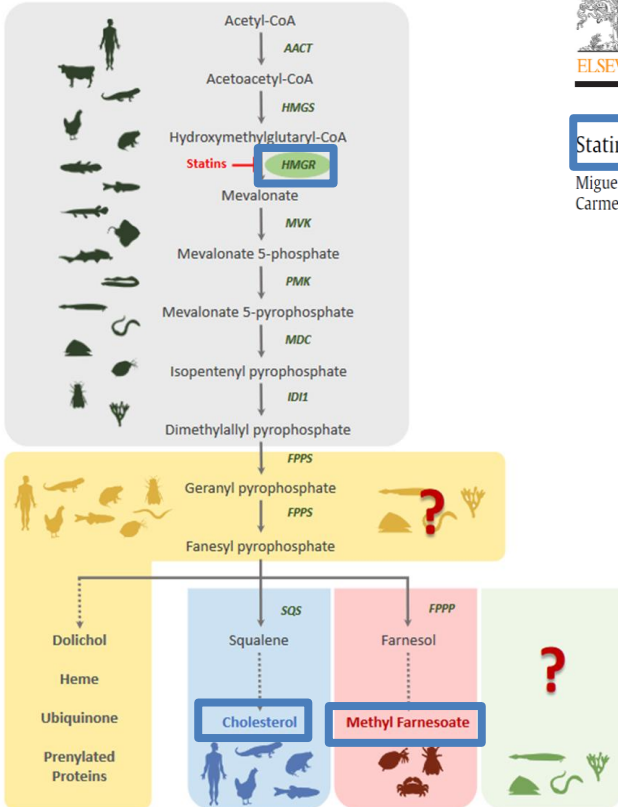


- Revisão da literatura
- Predição *in silico* (QSARs)
- Análise filogenética
- Docking molecular

# Exemplo: Nível 1 - Identificação e Prioritização



## Via do Mevalonato



### Statins An undesirable class of aquatic contaminants?

Miguel M. Santos<sup>a,b,\*</sup>, Raquel Ruivo<sup>a</sup>, Mónica Lopes-Marques<sup>a,c</sup>, Tiago Torres<sup>a</sup>,  
Carmen B. de los Santos<sup>a</sup>, L. Filipe C. Castro<sup>a,b</sup>, Teresa Neuparth<sup>a</sup>



Será que a HMGR é inibida nos metazoários expostos a estatinas?

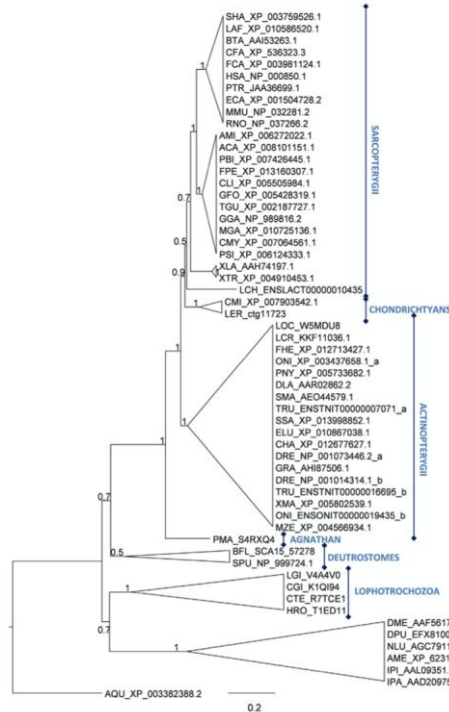


Múltiplos grupos de metazoários  
Análise filogenética  
Modelação por homologia  
Docking molecular

# Exemplos: Nível 1 - Identificação e priorização

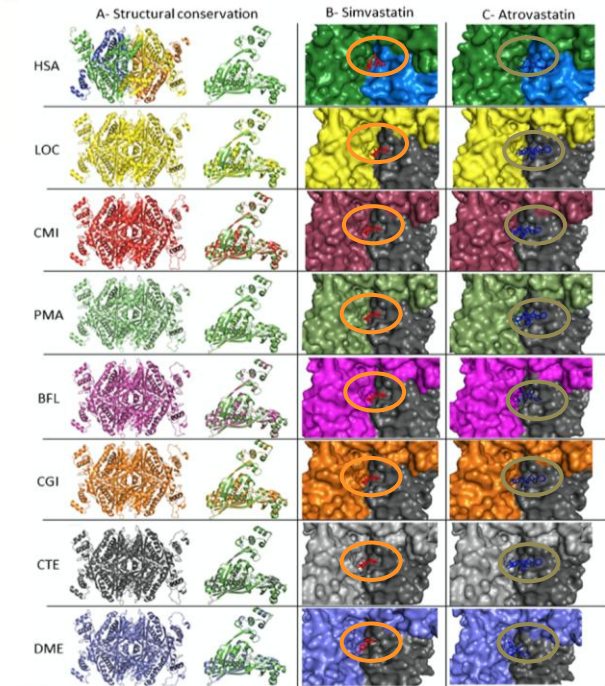


M.M. Santos et al. / Aquatic Toxicology 174 (2016) 1–9



undesirable class of aquatic contaminants?

antos<sup>a,b,\*</sup>, Raquel Ruivo<sup>a</sup>, Mónica Lopes-Marques<sup>a,c</sup>, Tiago Torres<sup>a</sup>,  
e los Santos<sup>a</sup>, L. Filipe C. Castro<sup>a,b</sup>, Teresa Neuparth<sup>a</sup>



A **árvore filogenética** mostra a presença de ortólogos da HMGR em várias espécies representativas dos Metazóários

**Modelação por homologia** : Prever a estrutura quaternária  
**Docking molecular** : Prever a afinidade de ligação de estatinas à HMGR de diferentes linhagens animais



# Exemplos: Nível 1 - Identificação e priorização



Statins: An undesirable class of aquatic contaminants?

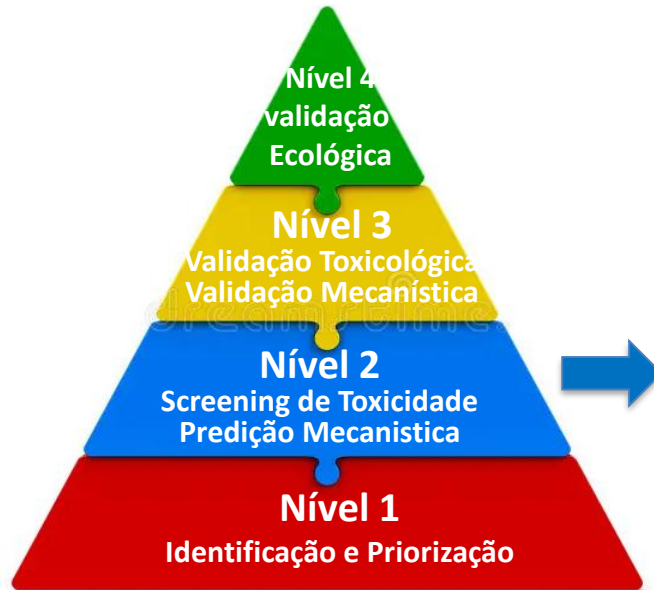


Miguel M. Santos<sup>a,b,\*</sup>, Raquel Ruivo<sup>a</sup>, Mónica Lopes-Marques<sup>a,c</sup>, Tiago Torres<sup>a</sup>,  
Carmen B. de los Santos<sup>a</sup>, L. Filipe C. Castro<sup>a,b</sup>, Teresa Neuparth<sup>a</sup>



- A inibição da HMGR pelas estatinas ocorre transversalmente nos Metazoa, afetando espécies não-alvo
- Este tipo de ferramentas devem ser usadas para outros CECs ajudando no desenho das ferramentas a usar nos níveis superiores da avaliação do impacto dos CECs

# Exemplos: Nível 2 – Bioensaios de toxicidade aguda



- *Ensaaios in vitro*
- *Ensaaios de toxicidade aguda*



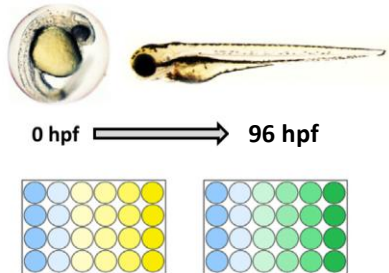
# Exemplos: Nível 2 – Bioensaios de toxicidade aguda



A Novel ceramic tubular membrane coated with a continuous graphene-TiO<sub>2</sub> nanocomposite thin-film for CECs mitigation

Pedro H. Presumido<sup>a</sup>, Lucrécio F. dos Santos<sup>b</sup>, Teresa Neuparth<sup>c</sup>, Miguel M. Santos<sup>c,d</sup>, Manuel Feliciano<sup>a</sup>, Ana Primo<sup>e</sup>, Hermenegildo Garcia<sup>f</sup>, Maja B- Đolić<sup>g</sup>, Vítor J.P. Vilar<sup>a,\*</sup>

## ZEBRAFISH EMBRYO BIOASSAY



## OECD FET 236 GUIDELINES

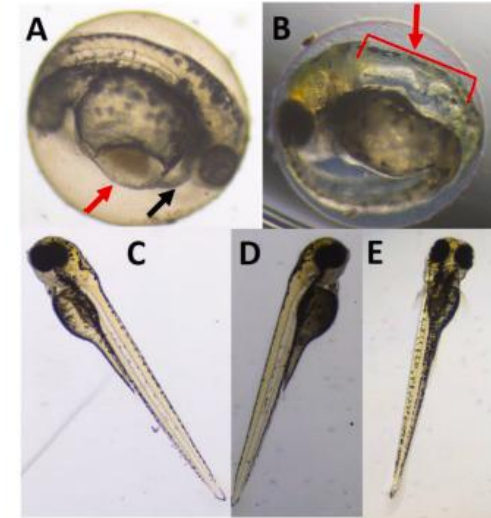


Fig. 7. Abnormalities observed in the zebrafish embryo bioassay: Pericardial oedema – black arrow; yolk sac oedema – red arrow at 48 hpf exposition to CECs + real matrix (A); Abnormal notochord formation at 96 hpf exposition to CECs + synthetic matrix (B); normal development at 96 hpf recorded in CECs + real matrix + MA-3 (C), CECs + real matrix + MB-2 (D) and control – synthetic water (E).

# Exemplos: Nível 2 – Bioensaios de toxicidade aguda



Chemical Engineering Journal 430 (2022) 132639



Contents lists available at ScienceDirect

Chemical Engineering Journal

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/cej](http://www.elsevier.com/locate/cej)



A Novel ceramic tubular membrane coated with a continuous graphene-TiO<sub>2</sub> nanocomposite thin-film for CECs mitigation

Pedro H. Presumido<sup>a</sup>, Lucrécio F. dos Santos<sup>b</sup>, Teresa Neuparth<sup>c</sup>, Miguel M. Santos<sup>c,d</sup>,  
Manuel Feliciano<sup>a</sup>, Ana Primo<sup>e</sup>, Hermenegildo Garcia<sup>f</sup>, Maja B- Đolić<sup>g</sup>, Vítor J.P. Vilar<sup>a,\*</sup>



Os processos de tratamento avançados com membranas tubulares cerâmicas diminuíram significativamente a toxicidade presente no efluente de ETAR testado

Interreg

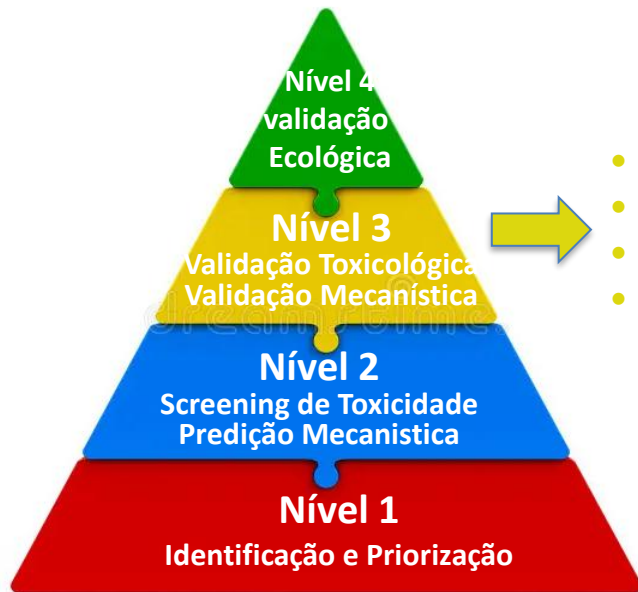


Cofinanciado por  
la Unión Europea  
Cofinanciado pela  
União Europeia

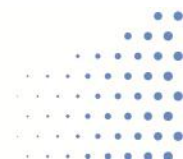
Espana – Portugal



# Exemplos: Nível 3 – Bioensaios de toxicidade de longo prazo e avaliação dos efeitos em diferentes níveis de organização biológica



- Ensaaios crónicos/Longo-termo
- Efeitos apicais
- Marcadores bioquímicos (Enzimas stress oxidativo)
- Omicas (transcritomica, metabolomica, epigenetica)



# Exemplos: Nível 3 – Bioensaios de toxicidade de longo prazo e avaliação dos efeitos em diferentes níveis de organização biológica



Metformin disrupts *Danio rerio* metabolism at environmentally relevant concentrations: A full life-cycle study



Susana Barros <sup>a,b,1</sup>, Marta Ribeiro <sup>a,1</sup>, Ana M. Coimbra <sup>b,c</sup>, Marlene Pinheiro <sup>a,e</sup>, Hugo Morais <sup>a,e</sup>, Nélson Alves <sup>a,e</sup>, Rosa Montes <sup>d</sup>, Rosario Rodil <sup>d</sup>, José Benito Quintana <sup>d</sup>, Miguel M. Santos <sup>a,c,\*</sup>, Teresa Neuparth <sup>a,\*\*</sup>

**ENVIRONMENTAL**  
Science & Technology

pubs.acs.org/est

Article

**Are Fish Populations at Risk? Metformin Disrupts Zebrafish Development and Reproductive Processes at Chronic Environmentally Relevant Concentrations**

Susana Barros, Nélson Alves, Marlene Pinheiro, Marta Ribeiro, Hugo Morais, Rosa Montes, Rosario Rodil, José Benito Quintana, Ana M. Coimbra, Miguel M. Santos,\* and Teresa Neuparth\*

**ENVIRONMENTAL**  
Science & Technology

pubs.acs.org/est

Viewpoint

**Is the Environmental Risk of Metformin Underestimated?**

Unax Lertxundi,\* Saioa Domingo-Echaburu, Susana Barros, Miguel Machado Santos, Teresa Neuparth, Jose Benito Quintana, Rosario Rodil, Rosa Montes, and Gorka Orive

## Exposição geracional ao Fármaco Metformina

- Efeitos apicais
- Marcadores bioquímicos
- Marcadores moleculares

Interreg



Cofinanciado por  
la Unión Europea  
Cofinanciado pela  
União Europeia

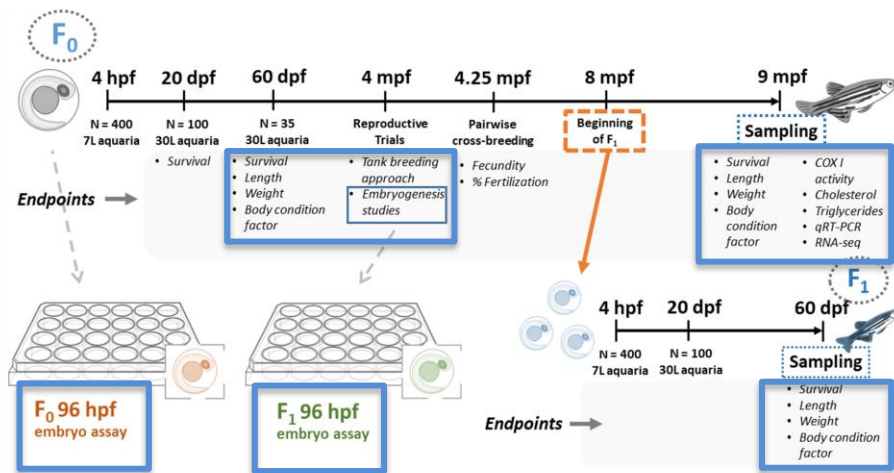
España – Portugal

**blue**  
wwater

# Exemplos: Nível 3 – Bioensaios de toxicidade de longo prazo e avaliação dos efeitos em diferentes níveis de organização biológica



## D. rerio exposure to MET



Control  
3 concentrações de **Metformina**  
**ambientalmente relevantes**

- 390 ng/L
- 2 929 ng/L
- 14 423 ng/L

**Concentrações Ambientais**

**145 - 56 600 ng/L**

# Exemplos: Nivel 3 – Bioensaios de toxicidade de longo prazo e avaliação dos efeitos em diferentes níveis de organização biológica



**Table.** MET long-term effects on sex ratio, weight, length, body condition factor, gonadosomatic and hepatosomatic index of *D. rerio*

Endpoints  
Apicais:  
Crescimento

| Gen | Sampling time | Treatment   | Sex ratio | Length | Weight | K    | GSI  | HSI  |
|-----|---------------|-------------|-----------|--------|--------|------|------|------|
| F0  | 96 hpf        | 390 ng/L    | ****      | ****   | ****   | **** | **** | **** |
|     |               | 2 929 ng/L  | ****      | ↓      | ****   | **** | **** | **** |
|     |               | 14 423 ng/L | ****      | ****   | ****   | **** | **** | **** |
|     | 60 dpf        | 390 ng/L    | ****      | ↑      | ↑      | ↑    | **** | **** |
|     |               | 2 929 ng/L  | ****      | ****   | ****   | **** | **** | **** |
|     |               | 14 423 ng/L | ****      | ****   | ****   | **** | **** | **** |
|     | 9 mpf         | 390 ng/L    | ****      | ****   | ****   | **** | **** | **** |
|     |               | 2 929 ng/L  | ****      | ****   | ****   | ↑    | **** | **** |
|     |               | 14 423 ng/L | ****      | ↑      | ↑      | ↑    | **** | **** |
| F1  | 96 hpf        | 390 ng/L    | ****      | ↑      | ****   | **** | **** | **** |
|     |               | 2 929 ng/L  | ****      | ↑      | ****   | **** | **** | **** |
|     |               | 14 423 ng/L | ****      | ↑      | ****   | **** | **** | **** |
|     | 60 dpf        | 390 ng/L    | ****      | ****   | ****   | **** | **** | **** |
|     |               | 2 929 ng/L  | ****      | ↑      | ****   | ↓    | **** | **** |
|     |               | 14 423 ng/L | ****      | ****   | ****   | ↓    | **** | **** |

M F M F M F M F M F



# Exemplos: Tier 3 – Bioensaios de toxicidade de longo prazo e avaliação dos efeitos em diferentes níveis de organização biológica



## Pairwise Cross-Breeding

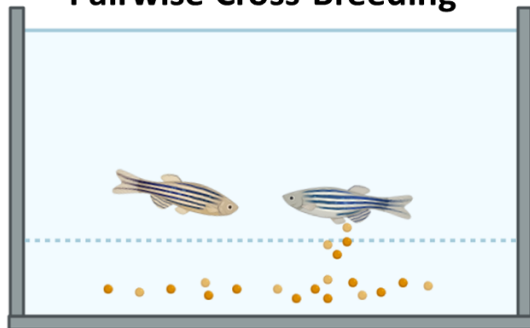
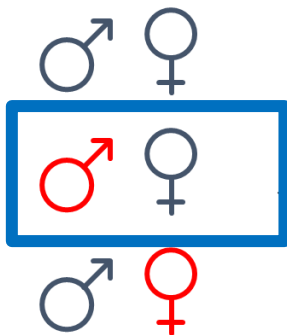


Table. Long-term effects of MET on F<sub>0</sub> zebrafish pairwise cross-breeding

|                         |                                         | Fecundity                  | % Fertilization     | % of reproductive events with un-activated eggs | % un-activated eggs/reproductive event |
|-------------------------|-----------------------------------------|----------------------------|---------------------|-------------------------------------------------|----------------------------------------|
|                         |                                         |                            |                     |                                                 |                                        |
| Pairwise cross-breeding | ♂ <sub>Ctrl</sub> X ♀ <sub>Ctrl</sub>   | 286.4 ± 22,70              | 98.1 ± 0,70         | 0.0 ± 0.00                                      | 0.0 ± 0.00                             |
|                         | ♂ <sub>14 423</sub> X ♀ <sub>Ctrl</sub> | 198.8 ± 62.90 <sup>#</sup> | <b>88.5 ± 4.10*</b> | <b>56.0 ± 5.77*</b>                             | <b>22,6 ± 5,33*</b>                    |
|                         | ♂ <sub>Ctrl</sub> X ♀ <sub>14 423</sub> | 226.9 ± 39.70              | 97.2 ± 0.80         | 0.0 ± 0.00                                      | 0.0 ± 0.00                             |

Endpoints  
Apicais:  
Reprodução



- Ovos não ativados
- Diminuição da fecundidade
- Diminuição da % de fertilização



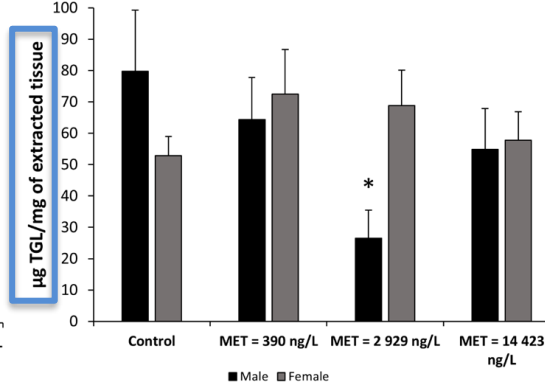
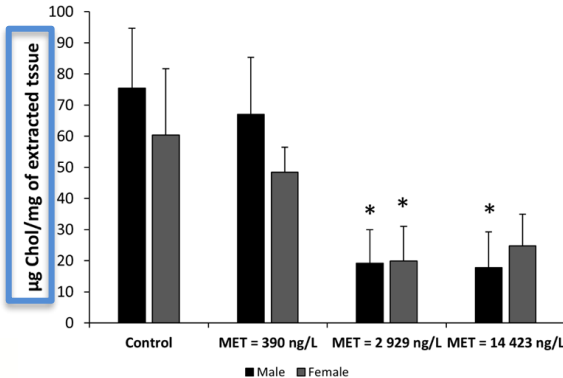
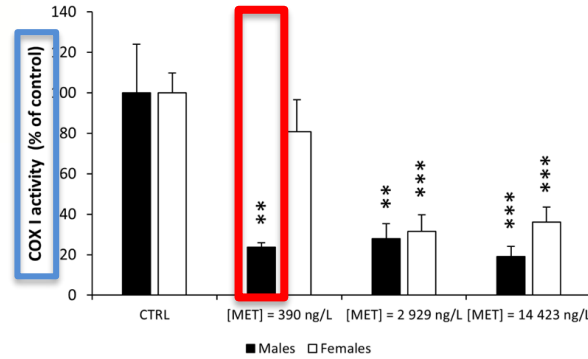
ovos não ativados



# Exemplos: Nível 3 – Bioensaios de toxicidade de longo prazo e avaliação dos efeitos em diferentes níveis de organização biológica



## Endpoints Bioquímicos



Interreg



Financiado por  
la Unión Europea  
Cofinanciado pela  
União Europeia

España – Portugal

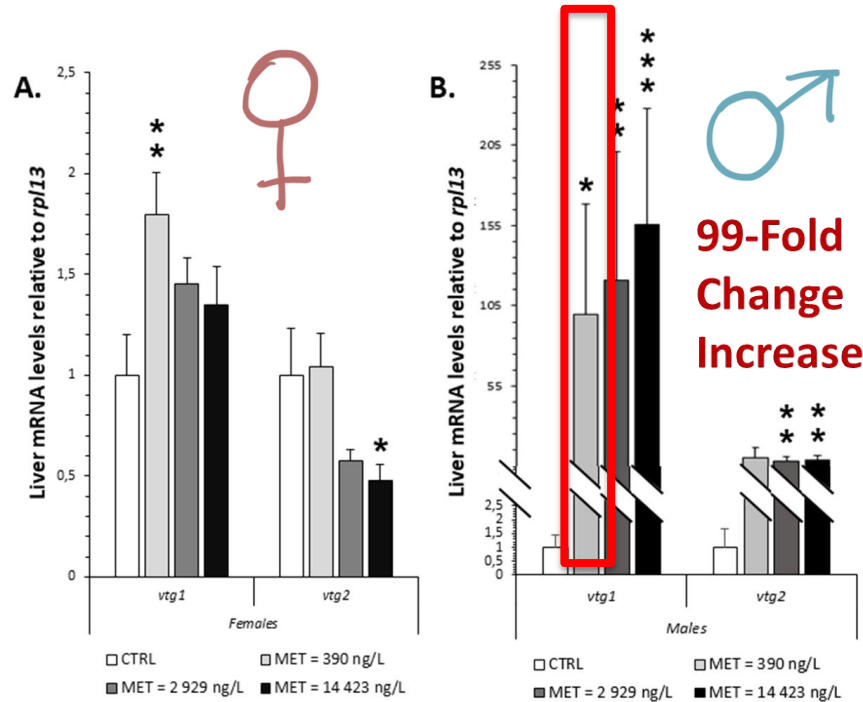


# Exemplos: Tier 3 – Bioensaios de toxicidade de longo prazo e avaliação dos efeitos em diferentes níveis de organização biológica



## Endpoints Moleculares

qRT-PCR



 **Endocrine Disruption**

**99-Fold  
Change  
Increase**

Relative mRNA levels of hepatic *vtg1* and *vtg2* in 9 month-old *F<sub>0</sub>* *D. rerio*

Interreg



Cofinanciado por  
la Unión Europea  
Cofinanciado pela  
União Europeia

España – Portugal

blue  
water

# Exemplos: Tier 3 – Bioensaios de toxicidade de longo prazo e avaliação dos efeitos em diferentes níveis de organização biológica

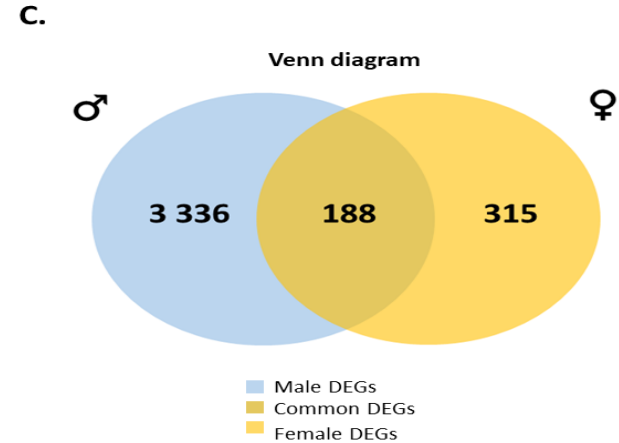
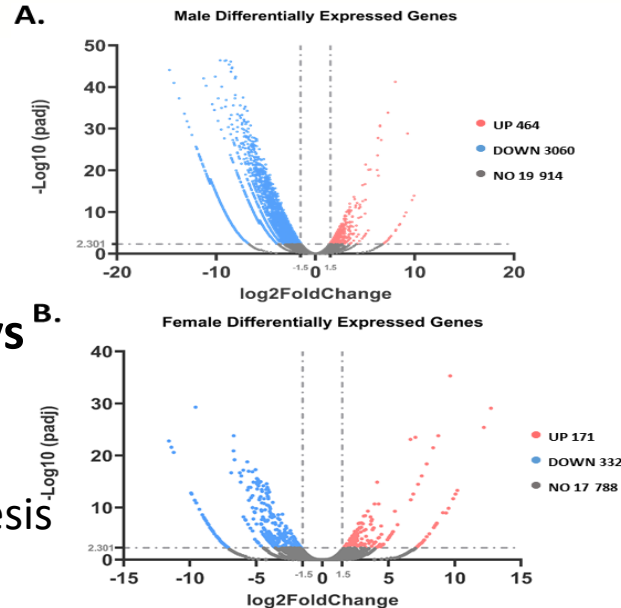


## Endpoints Moleculares

RNA seq

Most relevant pathways affected:

- Lipid/energy metabolism
- Steroid hormone biosynthesis
- Reproduction



# Exemplos: Nível 3 – Bioensaio de toxicidade de longo prazo e avaliação dos efeitos em diferentes níveis de organização biológica



## [METEFORMINA] – 390 ng/L:

- Interfere com processos bioquímicos e moleculares relacionados funções **metabólicas nos machos de peixe-zebra** → **Efeitos no crescimento**
- Afeta a **biossíntese de hormonas esteroides** e a expressão de **vtg1** e **vtg2** → **Diminuição da taxa de fertilização e aumenta a presença de ovos não ativados**

Implicações para a ↓ Avaliação de Risco Ambiental

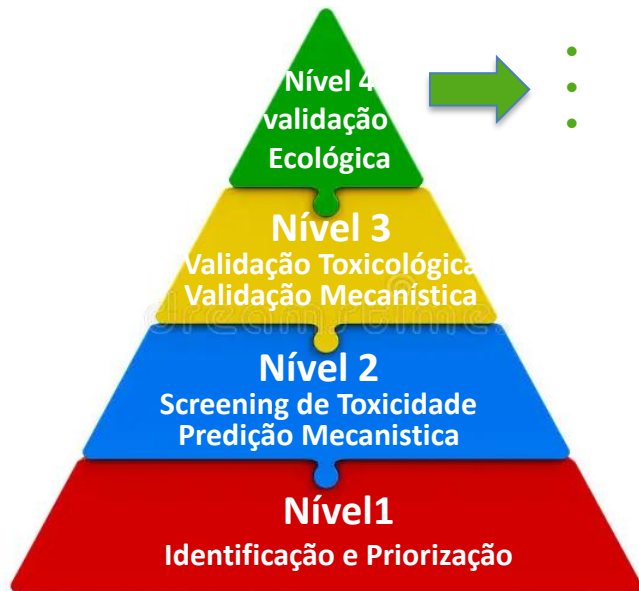


### Metformina esta na 4 *Watch List*

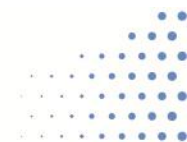
- Concentração Prevista Sem Efeito (PNEC) → **1 030 µg/L**
- Standard de qualidade ambiental (EQS) → **160 µg/L**

**Valores de PNEC e EQS propostos para MET → Urgentemente Revistos**

# Exemplo: Nível 4 – Modelação Ecológica



- **Modelação Ecológica**
- **Estudos com mesocosmos or microcosmos**
- **Bioacumulação na cadeia alimentar; transferência trófica**



# Exemplo: Nível 4 – Modelação Ecológica



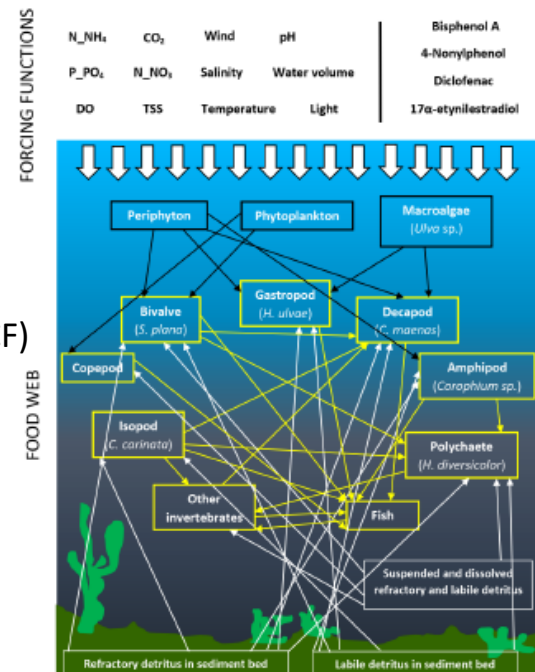
Article

## Prioritizing the Effects of Emerging Contaminants on Estuarine Production under Global Warming Scenarios

Irene Martins <sup>1,\*</sup>, Joana Soares <sup>1,†</sup>, Teresa Neuparth <sup>1</sup>, Aldo F. Barreiro <sup>1</sup>, Cândido Xavier <sup>2</sup>, Carlos Antunes <sup>1,3</sup> and Miguel M. Santos <sup>1,2,\*</sup>

### Modelo desenvolvido no AQUATOX:

- Bisfenol A (BPA), 4-Nonylphenol (4-NP), 17 $\alpha$ -etinil-estradiol (EE2) e Diclofenac (DCF) na concentração dos EQS propostos
- 2 aumentos de temperatura de acordo com as previsões do IPCC (RCP 4.5 +1.8°C/RCP 8.5 + 3.7°C)
- Relações tróficas das comunidades estuarinas



Interreg



Cofinanciado por  
la Unión Europea  
Cofinanciado pela  
União Europeia

Espana – Portugal

blue  
water



# Exemplo: Nível 4 – Modelação Ecológica



Article

## Prioritizing the Effects of Emerging Contaminants on Estuarine Production under Global Warming Scenarios

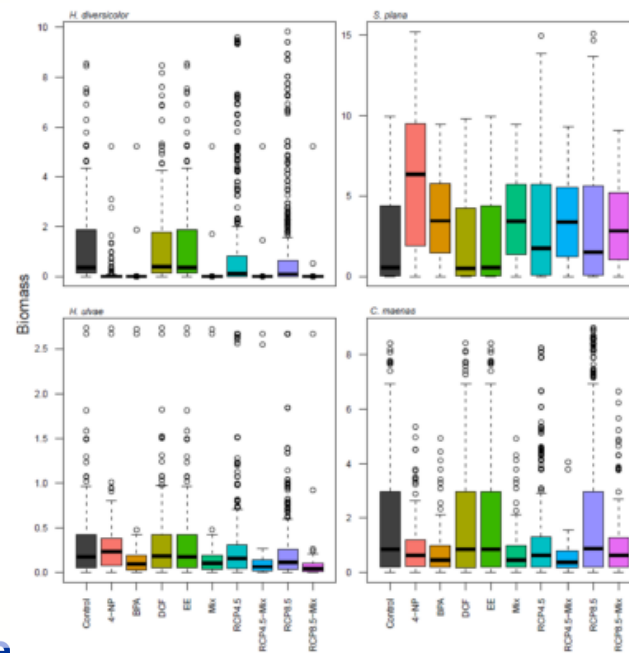
Irene Martins <sup>1,\*</sup>, Joana Soares <sup>1,†</sup>, Teresa Neuparth <sup>1</sup>, Aldo F. Barreiro <sup>1</sup>, Cândido Xavier <sup>2</sup>, Carlos Antunes <sup>1,3</sup> and Miguel M. Santos <sup>1,2,\*</sup>

- BPA e 4-NP induzem efeitos adversos a médio prazo (10 anos)
- Efeito sinérgico adverso dos 4 CECs no ecossistema
- Aumentos de temperatura testados têm um impacto inferior ao da mistura dos 4CECs.



### modelação ecológica:

Apoiar o desenvolvimento de estratégias ambientais para reduzir os impactos ecológicos de stressores ambientais

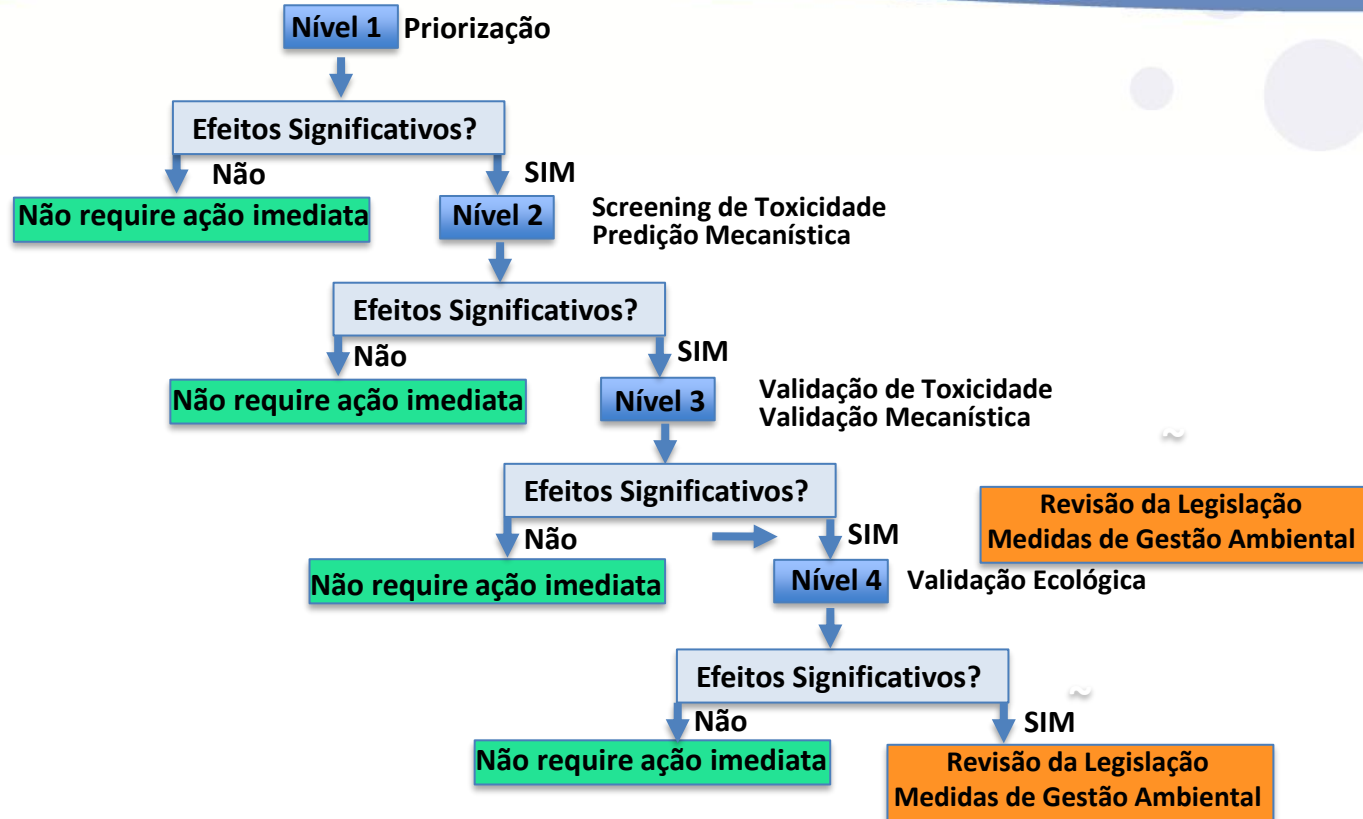


Inte

España – Portugal

wwater

# Considerações Finais



# Obrigado! Gracias!



Teresa Neuparth



Susana Barros



Miguel Santos



**Grupo Disruptores Endócrinos  
e Contaminantes Emergentes**

[tneuparth@ciimar.up.pt](mailto:tneuparth@ciimar.up.pt)

**Interreg**

España – Portugal



Cofinanciado por  
la Unión Europea  
Cofinanciado pela  
União Europeia

