

Nuno Fernando Aroso Costa Lages

**Avaliação dos Efeitos Toxicológicos Decorrentes do
Consumo Humano de Lagostim Vermelho da Louisiana
(*Procambarus clarkii*)**

**Universidade Fernando Pessoa
Faculdade de Ciências da Saúde**

Porto, 2008

Nuno Fernando Aroso Costa Lages

**Avaliação dos Efeitos Toxicológicos Decorrentes do
Consumo Humano de Lagostim Vermelho da Louisiana
(*Procambarus clarkii*)**

**Monografia apresentada à Universidade Fernando Pessoa
por Nuno Lages, como parte dos requisitos para obtenção
do grau de licenciado em Ciências Farmacêuticas.**



(Nuno Fernando Aroso Costa Lages)

SUMÁRIO:

O presente trabalho trata o consumo humano de crustáceos, e as consequências toxicológicas que decorrem da utilização destes recursos alimentares quando contaminados. Deu-se particular importância à análise do consumo do designado lagostim vermelho da Louisiana (*Procambarus clarkii*), uma espécie invasora não indígena que nos últimos anos assumiu um inusitado destaque no âmbito ambiental e gastronómico no nosso País. Realizou-se uma revisão relativa aos dados disponíveis na bibliografia sobre a sua distribuição, a sua biologia, as características intrínsecas que o tornam numa praga ambiental, os seus hábitos alimentares e comportamentos. Paralelamente, fez-se um estudo aprofundado dos padrões documentados da sua captura, processamento e transformação em alimento para consumo humano. Atenção especial foi dedicada à contaminação da qual o *P. clarkii* é alvo, nomeadamente em resultado dos seus hábitos de vida, e que resulta directamente de actividades antropogénicas. Foi realizado um levantamento dos dados existentes sobre perfis de contaminantes nos locais habitados pelo lagostim, os seus efeitos biológicos a vários níveis, e o seu potencial para serem ingeridos conjuntamente com o lagostim vermelho. Seguidamente, fez-se uma análise dos dados toxicológicos publicados sobre os resíduos passíveis de serem encontrados nos tecidos edíveis do lagostim vermelho da Louisiana, e que poderão constituir uma perturbação da saúde dos consumidores. Procurou-se assim estabelecer uma relação de causalidade entre a presença de resíduos de substâncias tóxicas no alimento e o surgimento de efeitos adversos ao nível dos consumidores humanos. Em seguida, fez-se uma revisão da metodologia laboratorial que pode ser utilizada como medida de monitorização da contaminação do crustáceo, e como factor de prevenção do consumo de organismos contaminados por humanos. Foram abordadas metodologias analíticas clássicas e novas abordagens de análise ambiental, que visam garantir o acesso a um grande número de dados toxicológicos, sempre na tentativa de as recomendar em planos de salvaguarda da saúde pública. Pretendeu-se compilar alternativas válidas de análise e controlo de qualidade de um alimento, para que o consumo de organismos aquáticos não esteja revestida de qualquer grau de perigosidade considerável para a espécie humana. Estas mesmas medidas aqui preconizadas foram também incluídas no presente trabalho como medidas de avaliação do dano ecológico colocado pela presença de resíduos químicos de origem humana nos tecidos do crustáceo, no sentido de avaliar o estado geral do ecossistema onde este é capturado.

AGRADECIMENTOS:

Após o término desta licenciatura em Ciências Farmacêuticas, gostaria de agradecer a todas as pessoas que me ajudaram das mais variadas formas a concluí-la assim, gostaria de agradecer:

À minha família que sempre me apoiou, incentivou em todos os momentos do meu percurso acadêmico. Sem eles não teria conseguido.

A todos os meus amigos, pela sua amizade, companheirismo, boa disposição e apoio que sempre demonstraram. Estiveram sempre comigo quando necessitei.

A todos os professores, pelos conhecimentos que me foram transmitidos.

Ao Professor Bruno Nunes e ao Professor Victor Balcão, um muito obrigado pelo tempo dispendido, paciência e dedicação, tornando possível a elaboração desta monografia.

ÍNDICE GERAL

I. Introdução	1
II. Distribuição do <i>P. clarkii</i> no Mundo e no território nacional	4
III. Hábitos de consumo do lagostim vermelho da Louisiana no estrangeiro: cenários norte-americano, europeu, asiático e africano.	5
IV. Pateira de Fermentelos	7
V. O uso de pesticidas e o seu potencial de contaminação	10
5.1. Cimoxanil	11
5.1.1. Metabolismo e toxicidade	11
5.1.2. Efeitos a nível ecológico	14
5.1.3. Processo de degradação do cimoxanil.....	15
5.1.4 Principais preocupações relacionadas com o impacto sobre a saúde humana de resíduos de cimoxanil.....	15
5.2. Propinebe.....	16
5.2.1. Metabolismo e toxicidade	17
5.2.2. Efeitos a nível ecológico	20
5.2.3. Processos de degradação do propinebe	20
5.2.4 Principais preocupações relacionadas com o impacto sobre a saúde humana de resíduos de Propinebe.....	21
5.3. Glifosato	21
5.3.1. Metabolismo e toxicidade	22
5.3.2. Efeitos a nível ecológico	25
5.3.3. Processos de degradação do glifosato	25
5.3.4. Principais preocupações relacionadas com o impacto sobre a saúde humana de resíduos de Glifosato	26
VI. Uso de metais pesados e o seu potencial de contaminação.....	27
6.1 Chumbo	27
6.1.1. Metabolismo e toxicidade	28
6.1.2. Toxicidade do chumbo	29
6.1.3. Efeitos a nível ecotoxicológico	32
6.1.4. Principais preocupações relacionadas com o impacto sobre a saúde humana de resíduos de chumbo.....	32
6.2. Cádmio	33
6.2.1. Metabolismo e toxicidade	34

6.2.2. Toxicidade do Cádmiu	35
6.2.3. Efeitos a nível ecotoxicológico	37
6.2.4. Principais preocupações relacionadas com o impacto sobre a saúde humana de resíduos de cádmio.	37
VII. Acumulação de compostos tóxicos no crustáceo em estudo (<i>Procambarus clarkii</i>).	38
VIII. Biomarcadores possíveis de ser utilizados na monitorização ambiental da presença de contaminação e efeitos sobre o <i>P. clarkii</i> .	41
8.1. Possíveis biomarcadores para o estudo da toxicidade exercida pelo composto tóxico cimoxanil no organismo <i>Procambarus clarkii</i> .	41
8.2. Possíveis biomarcadores para o estudo da toxicidade exercida pelo composto tóxico propinebe no organismo <i>Procambarus clarkii</i> .	43
8.3. Possíveis biomarcadores para o estudo da toxicidade exercida pelo composto tóxico glifosato no organismo <i>Procambarus clarkii</i> .	44
8.4. Possíveis biomarcadores para o estudo da toxicidade exercida pelo chumbo no organismo <i>Procambarus clarkii</i> .	45
8.5. Possíveis biomarcadores para o estudo da toxicidade exercida pelo cádmio no organismo <i>Procambarus clarkii</i> .	47
IX. Depuração	49
X. Metodologias usadas actualmente para a detecção dos diversos contaminantes	52
10.1. Possíveis metodologias a serem usadas na determinação do cimoxanil em amostras do crustáceo <i>Procambarus clarkii</i> .	53
10.2. Possíveis metodologias a serem usadas na determinação do propinebe em amostras do crustáceo <i>Procambarus clarkii</i> .	54
10.3. Possíveis metodologias a serem usadas na determinação do glifosato em amostras do crustáceo <i>Procambarus clarkii</i> .	55
10.4. Possíveis metodologias a serem usadas na determinação do chumbo em amostras do crustáceo <i>Procambarus clarkii</i> .	56
10.5. Possíveis metodologias a serem usadas na determinação do cádmio em amostras do crustáceo <i>Procambarus clarkii</i> .	57
XI. Conclusão	59
Bibliografia	61

Lista de Figuras

Figura 1 – Fases da vida do organismo <i>Procambarus clarkii</i>	1
Figura 2 – Estados do ciclo reprodutivo do animal <i>P. clarkii</i>	2
Figura 3 – Distribuição de <i>Procambarus clarkii</i> na Europa.....	4
Figura 4 – Principais vias de comércio deste animal na Península Ibérica.....	6
Figura 5 – Valores de venda (USD) das principais espécies de Lagostim de rio.....	7
Figura 6 – Localização da Pateira de Fermentelos.....	8
Figura 7 – Pateira de Fermentelos.....	8
Figura 8 – Valores das concentrações de cádmio em tecidos do organismo <i>Procambraus clarkii</i>	39
Figura 9 – Exposição e depuração de cádmio por parte do animal <i>Metridia gerlachei</i>	50
Figura 10 – Exposição e depuração de chumbo por parte do animal <i>Metridia gerlachei</i>	51

Lista de Tabelas

Tabela 1 – Países nos quais foi introduzido <i>Procambarus clarkii</i>	5
Tabela 2 – Concentrações de diferentes metais nos tecidos musculares de diferentes espécies de peixe da região da ria de Aveiro.....	10
Tabela 3 - Concentrações de metais na superfície dos sedimentos.....	39
Tabela 4 – Concentrações de metais nos tecidos de <i>Procambarus clarkii</i>	39
Tabela 5 - Concentrações de diversos pesticidas no organismo <i>Procambarus acutis</i>	40
Tabela 6 – Concentração de metais nos tecidos de <i>Uca pugnax</i>	50
Tabela 7 – Concentração de organoclorados nos músculos e fígado de um grupo de tainhas durante 270 dias.....	51

Abreviaturas

	PTU – Propileno tioureia	Pche – Plasma colinesterase
ICN – Instituto de Conservação da Natureza	PDA – Propilenodiamina	GGT - γ -glutamyltransferase
DGF – Direcção Geral das Florestas	Grupos SH – Grupos sulfidril	SGOT – Transaminase oxaloacética glutâmica
EPA – Environmental Protection Agency (EUA)	MAFF Japão – Ministério da Agricultura, Florestas e Pescas do Japão.	SGPT – Transaminase pirúvica-glutâmica
IUPAC – União Internacional para a Química Pura e Aplicada	MDA – Malonildialdeído	TBARS – Substâncias reactivas do ácido tiobarbitúrico
NOEL – “No Observed Effect Level” (Dose para a qual não se verificam efeitos observáveis)	ROS – Espécies reactivas de oxigénio	GPx – Glutathione peroxidase
LD50 – Dose Letal a 50%	AMPA – Ácido aminometilfenóico	CAT – Catalase
NOAEL – “No Observed adverse Effect level” Dose para a qual não se verificam efeitos adversos observáveis	O/A – Coeficiente de partilha óleo/água	AST – Aspartato aminotransferase
NOEC – “No Observed Effect Concentration” Concentração para a qual se verificam efeitos adversos observáveis.	A/O – Coeficiente de partilha água/óleo	LDH – Lactato desidrogenase
LOEC – “Lowest Observed Effect Concentration”, concentração mais baixa para a qual se observa efeito.	ALAS – 5- Aminolevulinato sintetase	ACHE – Acetilcolinesterase
Rfd – Dose de referência estabelecida	ALA - Ácido gama-aminilevulínico	EP – Protoporfirina
OCDE – Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Económico	ALAD - Dehidratase Aminolevulínica.	ALT – Alanina aminotransferase
SfG – Taxa de crescimento potencial	AVC – Acidente vascular cerebral	SOD – Superóxido dismutase
DTCs – Ditiocarbamatos	GSH – Glutathione reduzida	PAHs – Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos
GC – Cromatografia gasosa	LC – Cromatografia líquida	ECD – Detecção por captura de electrões.

GPC – Cromatografia de permeação em gel	SPE – Extracção em fase sólida.	NPD – Detector fósforo/azoto
MC-HPLC – Cromatografia líquida de alta performance com multicolumna multidireccional	ELISA – Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay	CE – Electroforese capilar
IC-ICP-MS – Cromatografia iónica acoplada a espectrometria de massas com uma fonte de plasma acoplado.	NMR – Espectroscopia de ressonância magnética nuclear	CI – Cromatografia iónica.
ICP-MS – Espectroscopia de massas com plasma acoplado indutivamente	ICP-OES – Espectroscopia de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado	FAAS – Espectroscopia de absorção atómica por chama
ETAAS – Espectroscopia de absorção atómica em câmara de grafite	NAA – Método de activação de iões	

I. Introdução

O lagostim vermelho da Louisiana, com o nome científico *Procambarus clarkii*, é uma espécie proveniente da Louisiana e norte do México (Barbaresi e Gherardi, 2000) que facilmente se expandiu para outras partes do planeta. A Europa não foi exceção, com particular destaque para a região da Península Ibérica onde chegou em 1973 (Anastácio, 1993). Do ponto de vista taxonómico, este animal pertence ao filo dos Artrópodes, classe dos Malacostraca, ordem Decapoda, sub-ordem dos Pleocyemata, família dos Cambaridae, género dos *Procambarus* e espécie *clarkii* (Fishar, 2006). Morfologicamente, este organismo caracteriza-se por possuir um tamanho entre os 5.5 e os 12 cm de comprimento, podendo em alguns casos atingir os 15 cm (Correia, 2002), pesando entre 35 e 56 g (Florent, 2006) quando na fase adulta. O seu corpo é segmentado e a cabeça encontra-se indiferenciada do tórax, designando-se esta estrutura por cefalotórax, e terminando numa estrutura chamada rostro (Anastácio, 1993). A sua cor varia ao longo do ciclo de vida, sendo que nos juvenis é normalmente castanho-esverdeada enquanto nos adultos é vermelho escuro (Fishar, 2006). Possui na cabeça um par de antenas e um par de antênulas (Anastácio, 1993). Ao longo do cefalotórax existem cinco pares de estruturas locomotoras, sendo que o primeiro par destas recebe a designação de quelíceras, que para além da função de locomoção servem também para a captura de alimentos; na região do abdómen existem outros tipos de patas, que não possuem função de locomoção, denominadas de pleópodes (Anastácio, 1993). O corpo termina numa região que tem como função propulsioná-lo para trás, denominado urosoma (Anastácio, 1993).

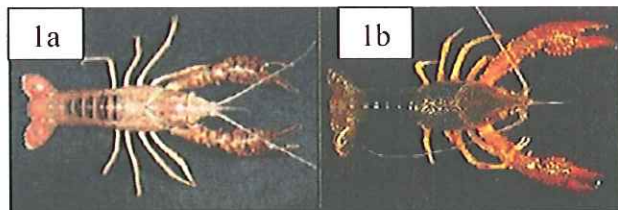


Figura 1 – Fases da vida do organismo *Procambarus clarkii* : 1a - *Procambarus clarkii* na fase juvenil; 1b *Procambarus clarkii* na fase adulto (Fonte : Fishar, 2006)

O comportamento reprodutivo do *P. clarkii* caracteriza-se pelo facto de o seu acasalamento se dar em diferentes meses do ano, dependendo da localização geográfica onde se encontra. Na região do estado norte-americano da Louisiana, por exemplo, a reprodução dá-se

entre Julho e Outubro, enquanto que no Quênia ocorre durante todo o ano (Anastácio, 1993); nesta altura já o macho se encontra na sua forma reprodutora, que se caracteriza pela dureza e escurecimento do órgão copulador e pela presença de ganchos copuladores (Anastácio, 1993). Por essa altura, e através do uso de feromonas, o macho começa a cortejar a fêmea, iniciando-se um ritual de acasalamento que vai terminar apenas com a deposição do espermatóforo, na fêmea, numa estrutura denominada *annulus ventralis* (Anastácio, 1993). A produção de ovos vai durar cerca de 6 semanas (Fishar, 2006) e, consoante o seu estágio de desenvolvimento, a sua cor e tamanho vão variar (Anastácio, 1993). Os ovos vão ser protegidos no interior de tocas visto que o principal mecanismo de defesa da mãe, que é o de abanar a cauda, se encontra inibido pela presença dos ovos (Mc Clain *et al.*, 2005). A figura 2 representa os diferentes momentos do ciclo reprodutivo do *P. clarkii*.

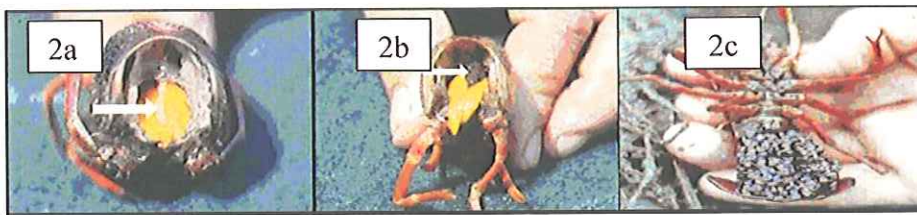


Figura 2 – Estados do ciclo reprodutivo do animal *P. clarkii*: 2a - Ovo no 1º estágio de desenvolvimento - ovo branco; 2b - Ovo no estágio de desenvolvimento final – ovo negro; 2c – Fêmea com ovos na cauda (Fonte: McClain *et al.*, 2005).

Após um período de incubação que demora cerca de 3 semanas, dependendo da temperatura (McClain *et al.*, 2005), o juvenil passa por várias fases em que se dão profundas alterações neste devido a uma metamorfose (Fishar, 2006) e a duas mudas de exoesqueleto (McClain *et al.*, 2005). Apesar de se encontrar fisicamente separado da mãe, o juvenil permanece junto desta por algumas semanas. Este período é bastante crítico devido à escassez de alimento no interior das tocas (Mc Clain *et al.*, 2005). O aumento de tamanho do animal dá-se através de mudas periódicas do exoesqueleto, formando-se um exoesqueleto debaixo do já existente (Anastácio, 1993). A frequência deste processo está dependente de diversos factores, tanto naturais como inerentes ao próprio animal; de entre os factores naturais, os mais importantes são a temperatura da água, a densidade populacional no local, os níveis de oxigénio, a qualidade e quantidade de alimento disponível (Mc Clain *et al.*, 2005), ou até mesmo a intoxicação por

compostos químicos tais como pesticidas (Anastácio, 1993); de entre os factores inerentes ao próprio animal podemos enumerar como mais importantes os factores genéticos (Anastácio, 1993), de idade ou até de perda de um membro (Mc Clain *et al.*, 2005). Devido à sua grande capacidade de reprodução (postura de cerca de 500 ovos em cada ciclo reprodutor), sendo por vezes de três ciclos em cada ano (Mc Clain *et al.*, 2005), à grande protecção dada aos ovos pela mãe, colocando-se em tocas para fugir aos predadores existentes nas águas livres (Mc Clain *et al.*, 2005), e à sua capacidade de resistência nas condições mais adversas de temperatura, em que tanto podem suportar temperaturas muito baixas no Inverno como muito altas no Verão (Mc Clain *et al.*, 2005), o *P. clarkii* é uma espécie bastante persistente. Para além de ser bastante persistente, também pode ser considerada uma praga, pois quando é introduzido em novos *habitats* causa enormes estragos em determinados animais e plantas. Entre os problemas causados por este organismo contam-se, por exemplo, a depleção de alimentos (dada a voracidade dos seus padrões de alimentação; Correia, 2002), o facto de serem vectores de determinados fungos e vírus (Fishar, 2006), a redução do valor dos *habitats* aquáticos, a redução do número de invertebrados presentes devido ao consumo de plantas aquáticas pelo *P. clarkii* (Kerby *et al.*, 2005), a degradação do rio pelas tocas feitas (Fishar, 2006). No caso particular dos arrozais, este último efeito tem particular importância pois vai provocar fugas de água e destruição de plantas, deixando a água de estar translúcida e prejudicando assim os rebentos da planta do arroz que dependem da luz para se desenvolverem (Anastácio, 1993).

Dado ser um crustáceo bastante apreciado, nomeadamente em regiões onde escasseiam recursos deste género (como é o caso da Escandinávia e Europa Central; Gherardi *et al.*, 2006), começou-se a capturar este organismo em grandes quantidades e também a produzir em cativeiro através de processos de aquacultura. Pensa-se que este crustáceo seja também bastante consumido em Portugal, tanto por via de capturas efectuadas em determinados rios nacionais, como também por via da importação de derivados, nomeadamente do sul de Espanha, onde existem bastantes indústrias de processamento e de comercialização deste animal. Devido a pensar-se que é bastante consumido em Portugal, e que bioacumula metais pesados e pesticidas (Gherardi *et al.*, 2006), torna-se bastante importante avaliar a sua toxicidade para os consumidores humanos, visto ser capturado em rios e lagos onde existem estes agentes tóxicos, provenientes particularmente de actividades agrícolas intensivas e industriais. Dependendo da sua

capacidade de eliminar estes agentes e da quantidade destes nele existentes, estes crustáceos poderão ser mais ou menos tóxicos para os seres humanos que deles se alimentam, podendo causar efeitos tanto agudos como crónicos.

II. Distribuição do *P. clarkii* no Mundo e no território nacional

O lagostim vermelho da Louisiana é um organismo invasivo originário das regiões Centro-Sul dos Estados Unidos da América (Estado da Louisiana) e Nordeste do México (Barbaresi e Gherardi, 2000). Na Europa, o primeiro caso registado de invasão por este crustáceo deu-se em 1973 na região de Badajoz (Espanha), seguido de outros casos em outras regiões deste país. Propagou-se também para Portugal, Chipre, França, Alemanha, Itália, Holanda (Anastácio, 1993), tendo sido em 1995 identificado na Suíça, o que demonstra a grande possibilidade de propagação para o Norte e Este da Europa (Florent, 2006). Para além destas regiões da Europa, encontra-se também disseminado em várias regiões da África, América do Sul, América Central, Ásia, Pacífico e Caraíbas (Anastácio, 1993), com a excepção da Austrália e da Antártida (Correia, 2003). Em Portugal, encontrou-se pela primeira vez este crustáceo em 1979 no rio Caia, um afluente do rio Guadiana (região do Alentejo), em resultado da sua expansão a partir de Espanha. Propagou-se assim rapidamente para outras regiões de Portugal (Anastácio, 1993), não somente a sul como também para o norte e centro, particularmente ao nível da região de Aveiro, e nas bacias do Douro, do Ave e do Minho, a norte (Holdich, 1993). Como se pode verificar através do mapa abaixo apresentado (figura 3), na Europa verifica-se uma maior prevalência deste animal a nível da Península Ibérica, o que sustenta a hipótese de este organismo ter começado a sua dispersão por esta zona geográfica, propagando-se gradualmente para as outras regiões Europeias. A análise da figura 3 revela a ampla dispersão deste crustáceo em Portugal, devido às excelentes características do nosso país para a sobrevivência deste organismo.



Figura nº 3 – Distribuição do *Procambarus clarkii* pela Europa (Fonte: Gheraldi *et al.*, 2006).

Tabela nº 1 – Países nos quais foi introduzido *Procambarus clarkii* (Fonte: Holdich, 1993).

Continentes	Países onde ocorreu a introdução
África	África Sul, Quênia, Zimbábwe, Uganda, Sudão, Zâmbia, Egipto.
América Central	México, Belize, Costa Rica, Republica Dominicana, Nicarágua, Guatemala, Guiana.
América do Norte	Hawai.
América do Sul	Brasil, Venezuela, Colômbia, Equador.
Ásia	Taiwan, China, Japão, Hong-Kong, Singapura, Tailândia, Filipinas.
Europa	Espanha, Inglaterra, Portugal, França, Holanda, Alemanha, Suécia.

III. Hábitos de consumo do lagostim vermelho da Louisiana no estrangeiro: cenários norte-americano, europeu, asiático e africano.

O lagostim vermelho da Louisiana é um recurso alimentar apreciado, mas o seu consumo assume assimetrias interessantes entre os diferentes países. Este organismo é um dos crustáceos mais apreciados na região da Baía do Delta no Mississipi, no estado norte-americano da Louisiana, de onde é endémico. Assume-se como um elemento imprescindível da gastronomia da tradição cultural Cajun, que deriva dos descendentes dos colonizadores franceses da área referida. Assim, é natural que na América do Norte a produção deste animal se centre essencialmente na região Sul dos Estados Unidos da América, particularmente nas regiões da Louisiana e Texas. Dados de 1990 mostram que cerca de 1600 fábricas existentes na Louisiana processaram cerca de 26700 toneladas deste animal, gerando uma receita de cerca de 34 milhões de dólares. Em todo o país, em 1989, foram processados cerca de 80000 toneladas, sendo destas cerca de 60000 provenientes de aquacultura e o restante da apanha a nível selvagem (Holdich, 1993). No Estado da Louisiana, a produção actual é de cerca de 29750 toneladas (valores de 1999), correspondendo a cerca de 85% da produção de lagostim de água doce desta região (Harlioglu, 2006). Pode dizer-se que o lagostim vermelho da Louisiana domina o mercado do lagostim de rio em todo o mundo, sendo que na China e nos Estados Unidos da América se encontra a maior fatia da produção com cerca de 70000 e 50000 toneladas, respectivamente, em 1999 (Gherardi e Acquistapace, 2004). Este crustáceo foi introduzido na China através do Japão em 1930, tendo-se propagado rapidamente; tornou-se facilmente uma boa fonte de negócio aumentando de 40000 toneladas em

1990 para 70000 toneladas em 1999 (Harlioglu, 2006). Na Ásia, a produção deste animal deve-se quase na totalidade à China, que em 1991 exportou cerca de 21 toneladas deste animal para a Europa, essencialmente para a França e Turquia (Holdich, 1993). O mercado Europeu é responsável pelo consumo de cerca de 10000 toneladas de lagostim de rio por ano, sendo os maiores consumidores os Escandinavos, os Alemães e Franceses (Gherardi *et al.*, 2006). O *Procambarus clarkii* representa cerca de 40% da cultura de crustáceos neste continente (cerca de 64 toneladas em 1994), sendo os maiores produtores deste crustáceo na Europa a Espanha, Suécia, Rússia, Alemanha, Reino Unido, Dinamarca e Finlândia (Harlioglu, 2006). A Espanha, maior exportador de *Procambarus clarkii* na Europa, exportou em 1999 cerca de 235 toneladas para a Suécia, 41 toneladas para a França, 23 toneladas para a Bélgica e 2 toneladas para a Dinamarca (Gherardi *et al.*, 2006). Devido ao aumento do consumo do *Procambarus clarkii* na Europa, a tendência é para o aumento da produção deste crustáceo em regime de aquacultura, pois no seu ambiente natural o crescimento demora bastante tempo, não suprimindo assim as exigências do mercado. Esta realidade não é exclusiva no cenário da produção de *Procambarus clarkii* mas de todos os lagostins de rio comercializados na Europa (Harlioglu, 2006). Em África, particularmente no Quênia após a sua introdução em 1970, verificou-se um rápido crescimento na quantidade deste crustáceo. Parte da sua produção é exportada para a Europa e o restante (cerca de 100 toneladas, em 1990) é consumido localmente, principalmente por turistas (Holdich, 1993). A tendência a nível global no que diz respeito à produção de *P. clarkii* é a sua produção em países em que a mão-de-obra é relativamente barata, como é o caso particular da China mas também de Espanha, e exportação para mercados onde o poder de compra é mais elevado (Holdich, 1993).



Figura nº 4 – Principais vias de comércio de *P. clarkii* na Península Ibérica (Fonte: Gheraldi *et al.*, 2006).

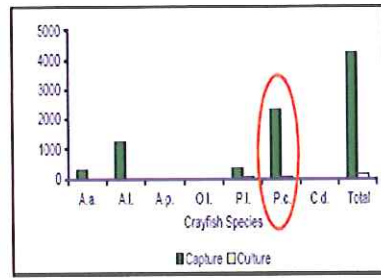


Figura nº5 – Valores de venda (USD) das principais espécies de lagostim de rio (Pc: *Procambarus clarkii*; Fonte: Gheraldi e Acquistapace, 2004).

Apesar da inexistência de dados relativos à produção, captura e consumo de *P. clarkii* em território nacional, é de crer que seja um organismo utilizado como recurso alimentar, à semelhança de outros países europeus. A indústria de transformação de pescado, nomeadamente aquela situada na região espanhola de Sevilha, abastece-se com regularidade deste organismo a partir de fontes portuguesas. Esta indústria, eminentemente exportadora, transforma o lagostim vermelho da Louisiana numa vasta gama de sub-produtos alimentares, que são posteriormente incluídos como ingredientes em muitas especialidades gastronómicas. O consumo directo do lagostim vermelho da Louisiana, se bem que já com alguma expressão em algumas áreas de Portugal, ainda não é uma prática corrente, embora seja possível verificar com crescente frequência o surgimento deste organismo. No âmbito dos produtos transformados derivados de pescado, é já uma forte realidade, derivada do esforço das empresas espanholas de transformação de pescado acima referidas.

IV. Pateira de Fermentelos

A Pateira de Fermentelos é um lago natural com uma área de cerca de 5 Km² e com uma profundidade compreendida entre 4 a 5 metros (Maria *et al.*, 2006), situada na zona centro do território Português, perto da cidade de Aveiro. A sua água provém do rio Cértima e das descargas do rio Águeda (Ahmad *et al.*, 2006). Este lago foi sempre considerado pelas populações vizinhas como uma importante zona de lazer e de pesca (Maria *et al.*, 2006).

compostos tóxicos existentes na Pateira de Fermentelos alguns dos que estarão em maior quantidade no local e/ou que possuem mais riscos para a saúde pública. Foram assim seleccionados dois pesticidas, de nome comercial Milraz® (mistura de cimoxanil e propineb) e Roundup® (glifosato) e dois metais pesados (chumbo e cádmio). Para a escolha dos pesticidas, e dada a escassez de estudos acerca dos pesticidas potencialmente existentes nas águas da Pateira de Fermentelos, contactámos telefonicamente a Cooperativa Agrícola dos Lavradores de Águeda (um dos locais onde se vendem pesticidas e fertilizantes nas imediações da Pateira, e nas bacias hidrográficas dos rios Cértima e Águeda, que drenam para este lago). Este contacto permitiu-nos saber que o Roundup® e o Milraz® seriam os mais utilizados pelos agricultores, tendo em conta os volumes de vendas registadas, levando-nos portanto a concluir que seriam os agentes pesticidas que existirão em maior quantidade no local objecto de estudo. Para os metais pesados, o processo de selecção foi um pouco mais simples, devido ao facto de existirem estudos publicados acerca de quais os metais pesados existentes nos ambientes aquáticos da região. Um estudo realizado em várias regiões da ria de Aveiro (região confluyente) sobre a contaminação provocada nos animais por alguns compostos tóxicos revelou os resultados expressos na tabela abaixo (tabela 2). Estes agentes tóxicos metálicos resultaram, pelo menos em parte, de actividades industriais que ocorreram na região até meados da década de noventa, na área da produção metalomecânica (indústria de velocípedes, com ou sem motor, entretanto desactivada). A contaminação da Pateira de Fermentelos por estes agentes deriva essencialmente do facto de dois rios, o Cértima e o Águeda, drenarem directamente para o lago, contaminando-o. A contaminação do rio Cértima já se encontra divulgada na literatura especializada, contudo não existem dados para todos os possíveis poluentes que podem ter contaminado essa zona durante o tempo de actividade da indústria da cromagem e dos velocípedes. Os dados existentes são para outros metais que não os estudados, tendo para todos eles valores elevados quando comparados com os limites impostos pelas *guidelines* Portuguesas referência. Os valores encontrados foram de 4371 µg/L para o Manganésio, 251 µg/L para o Zinco, 45 µg/L para o Níquel e 1268 µg/L para o alumínio (Teles *et al.*, 2006).

Tabela 2 - Concentrações de diferentes metais nos tecidos musculares de diferentes espécies de peixe da região da ria de Aveiro (Fonte : Cid *et al.*, 2001).

Espécie/Local	Cádmio ($\mu\text{g/g}$)	Cobre ($\mu\text{g/g}$)	Níquel ($\mu\text{g/g}$)	Chumbo ($\mu\text{g/g}$)	Zinco ($\mu\text{g/g}$)
<i>Anguilla anguilla</i>					
São Jacinto	0,0150	1,04	0,288	0,0783	19,7
Torreira	0,0109	0,812	0,157	0,0564	21,7
<i>Mullus surmuletus</i>					
São Jacinto	0,0215	0,955	0,0751	0,0536	6,42
Barra	0,0211	0,897	0,102	0,0519	6,67
<i>Trigla lucerna</i>					
Barra	$6,31 \times 10^{-3}$	0,564	0,0981	0,115	5,94
<i>Mugil cephalus</i>					
Carregal	$2,27 \times 10^{-3}$	0,583	0,0635	0,0404	7,79

Através destes resultados pode concluir-se que possivelmente o chumbo e o cádmio existirão na Pateira de Fermentelos em quantidades significativas. Assim, o chumbo e o cádmio são bons candidatos para estudar a contaminação por metais pesados no organismo em estudo.

V. O uso de pesticidas e o seu potencial de contaminação

Devido ao intenso uso de pesticidas nas actividades agrícolas, essencialmente na última metade do século XX, e a sua conseqüente persistência no meio ambiente, debatemo-nos hoje em dia com um enorme problema de contaminação ambiental (Rodrigues *et al.*, 2006). O uso destes pesticidas deixa resíduos, que poderão contaminar água, ar ou alimentos, causando prejuízos não somente aos ecossistemas mas também à saúde humana (Feigenbrugel *et al.*, 2005). Assim, torna-se necessário monitorizar a presença e os níveis dos pesticidas tanto nos cursos de água, como na água para consumo humano (Rodrigues *et al.*, 2006). Como conseqüência dos inerentes riscos para a saúde pública, a US Environmental Protection Agency (EPA) e a União Europeia colocaram estes compostos na lista dos poluentes perigosos, sendo que outra das medidas tomadas pela União Europeia foi estabelecer limites para a qualidade da água relativamente a estes agentes (98/83/EC): para o caso de um pesticida individual, o seu limite é de 0,1 $\mu\text{g/L}$, enquanto que para o total de pesticidas presentes na mesma água o limite é de 0,5 $\mu\text{g/L}$ (Rodrigues *et al.*, 2006). No caso dos seres humanos, o consumo destes agentes pode causar problemas a nível do sistema nervoso (tanto central como periférico), podendo ser

imunossupressores, disruptores endócrinos ou mesmo carcinogénicos, entre muitos outros efeitos adversos mais ou menos conhecidos (Caldas *et al.*, 2000).

5.1. Cimoxanil

Este agente químico é um fungicida, pertencente ao grupo dos pesticidas mais usados em Portugal. No nosso país encontra-se em diversas formulações, sendo a mais conhecida denominada de Milraz®, da empresa multinacional Bayer. O cimoxanil ou de acordo com a Food and Agriculture Organization (FAO, 2005) 1-(2-ciano-2metoxiaminoacetil)-3-etilureia, foi introduzido em 1977, e pertence ao grupo das acetamidas. Segundo a Extension Toxicology Network (EXTOXNET, 1997) trata-se de um fungicida foliar sendo usado tanto devido à sua acção preventiva como curativa, e tem como mecanismo de acção a inibição da esporulação, sendo a sua acção tanto por contacto como local-sistémica (FAO, 2005). Este composto penetra rapidamente na planta permanecendo na sua forma inactiva por um determinado período, controlando deste modo o aparecimento de danos na colheita (EXTOXNET, 1997). Este fungicida é usado tanto isolado como em formulações, em Agricultura e em Horticultura, nas doenças fúngicas provocadas por fungos patogénicos da ordem *Perenosporales* (FAO, 2005), sendo assim na prática usado no míldio da vinha provocado pelo fungo *Plasmopara vitícola*, e no da batata provocado por *Phytophthora infestans*. Este fungicida é usado também na erradicação de fungos que afectam culturas de tomate (FAO, 2005). Este agente é um sólido cristalino de cor rosa clara, sem odor, com um ponto de fusão de cerca de 162 °C. A sua pressão de vapor é relativamente baixa, cerca de $1,50 \times 10^{-4}$ Pa a 20 °C. Apresenta-se na natureza sob duas formas, a do isómero E e a do isómero Z (FAO, 2005). Apresenta ainda baixa solubilidade em água (cerca de 1g/L neste solvente), mas é muito solúvel em solventes orgânicos de média ou elevada polaridade (FAO, 2005).

5.1.1. Metabolismo e toxicidade

Os dados disponíveis na literatura mostram que o cimoxanil é um composto tóxico extensamente metabolizado e rapidamente eliminado em ratos (EXTOXNET, 1997). Após a administração deste fungicida nestes roedores, o mesmo é rapidamente absorvido e eliminado

(Federal Register, 2003). No espaço de 4 horas após administração, atinge-se a máxima concentração sanguínea (Federal Register, 2003). Cerca de 85% da dose administrada é eliminada e excretada em cerca de 48 horas pela urina e pelas fezes, sendo a maior parte excretada pela urina. Depois de passadas 96 horas, somente cerca de 1% da dose ainda se encontra nos tecidos. Na urina (em pouca quantidade) ou nas fezes, este composto encontra-se normalmente livre ou conjugado com a glicina (Federal Register, 2003). Os metabolitos em maior quantidade são geralmente polares; são eles o ácido 2-ciano-2-metoxiaminoacético, a glicina e outros aminoácidos conjugados, sendo estes muito rapidamente transformados noutros produtos naturais (EXTOXNET, 1997). Um outro metabolito encontrado, mas em ínfima quantidade, é o 1-etil-5,6-di-2,4(1H,3H) piridinidiona, que é um metabolito intermediário do processo (EXTOXNET, 1997). Nos ruminantes, acontece a degradação em produtos naturais muito rapidamente, sendo esta reacção também bastante completa, degradando-se em ácidos gordos, glicerol, aminoácidos, ácidos formilhidrolizáveis e em grupos acetil (EXTOXNET, 1997).

Toxicidade aguda do cimoxanil

O cimoxanil apresenta uma baixa toxicidade aguda, o que pode ser demonstrado através de estudos realizados em animais de laboratório. A dose letal a 50% calculada para ratos é 960 mg/kg por via oral, e mais de 2000 mg/kg para matar 50% dos coelhos por via dérmica, enquanto que por via inalatória a concentração letal a 50% é de cerca de 5,06 mg/L. Quanto aos efeitos causados, este composto não causa irritação nem da pele nem dos olhos em coelhos, nem causa sensibilização da pele no porquinho da Índia (EXTOXNET, 1997). Contudo, através de outros estudos, a European Chemicals Bureau classifica-o de tóxico e sensibilizador de pele (FAO, 2005). Este composto é classificado na categoria tóxica III em termos da toxicidade dérmica e oral e na categoria tóxica IV para a toxicidade por via inalatória e para a irritação dos olhos e da pele (EXTOXNET, 1997).

Toxicidade crónica do cimoxanil

A avaliação da toxicidade crónica varia muito com a espécie, com o tempo de administração e com a escala das doses administradas (pode ficar abaixo do limite inferior de resposta). Em cães, aos quais foram administrados durante 12 meses doses de 0,50, 100 e 200 ppm de cimoxanil juntamente com a alimentação, não se observaram quaisquer efeitos. Ratos aos quais foram administrados juntamente com a alimentação doses crescentes durante 90 dias, observaram-se ao fim desses dias efeitos nas doses de 1500 e 3000 ppm (NOEL de 750 ppm), tais como alterações ao nível do peso do corpo e dos órgãos, diminuição do consumo de alimentos, diminuição da eficiência de consumo, modificações a nível testicular (degeneração dos espermatídeos) e ainda efeitos a nível histopatológico. Num outro estudo, em que durante 90 dias foi administrado cimoxanil juntamente com a dieta a ratinhos em doses de 0, 50, 500, 1750, 3500, 7000 ppm, foi parada a experiência ao fim da terceira semana devido a toxicidade severa. Nos ratinhos fêmea, obtiveram-se efeitos a nível da diminuição do peso do corpo para doses de 500 ppm (NOEL de 500ppm), e diminuição do tamanho do fígado para doses de 1750 e 3500 ppm. No caso dos ratinhos macho não houve estabilização do NOEL, verificando-se variação do peso corporal e diminuição do tamanho dos órgãos para todas as doses testadas (EXTOXNET, 1997). Ao nível da reprodução, aparentemente não se observam efeitos: estudos efectuados em ratos demonstram que não existem aparentes mudanças no organismo, nomeadamente a nível do tamanho e da viabilidade de uma geração para a outra, para doses de 500 ppm deste composto tóxico (EXTOXNET, 1997). Experiências feitas em ratos e em coelhos mostram-nos algumas diferenças de resultados a nível de teratogenia, uma vez que, em ratos, para doses de 25 ppm verifica-se uma diminuição da ossificação nos fetos e uma diminuição de peso nos pais (para a mesma dose existem ambos os efeitos), enquanto que em coelhos existe uma diminuição a nível do NOAEL de 8 mg/kg/dia (efeito tóxico a 16 mg/kg/dia) para 4 mg/kg/dia, de pais para fetos. Apesar destas diferenças, poderá considerar-se que o cimoxanil não promove efeitos teratogénicos (EXTOXNET, 1997).

Devido à dificuldade em se determinar qual a dose de cimoxanil que causa efeitos em seres humanos, a USEPA calculou a Rfd (dose de referência estabelecida). Esta é baseada no NOEL de um estudo de alimentação/oncogenicidade crónica em ratos, sendo que o valor de

NOEL para estes roedores é de 4,1 mg/kg/dia. Para os seres humanos usou-se um factor de incerteza de 100, obtendo-se uma dose de 0,04 mg/kg/dia (Cornell University, 2003).

Em termos de mutagenicidade, o cimoxanil não exhibe quaisquer efeitos, pois testes efectuados sobre um grupo de bactérias *in vitro* revelou resultados negativos (em *Salmonella typhimurium* ou *Escherichia coli*) bem como na análise de células mamárias (células CHO do ovário de hamsters chineses) (EXTOXNET, 1997). Contudo, o cimoxanil possui potencial para induzir efeitos adversos ao longo das gerações, pois este composto, *in vitro*, é capaz de induzir aberrações em cromossomas (em células CHO e em linfócitos humanos) (EXTOXNET, 1997). Estudos efectuados demonstram que o cimoxanil não é carcinogénico, visto que em ratos submetidos a níveis de 0, 30, 300, 1500 e 3000 ppm na sua dieta durante 18 meses, não se verificaram quaisquer efeitos desta natureza durante e após a exposição (EXTOXNET, 1997). Até ao momento não existem dados acerca da toxicidade para o sistema endócrino, contudo não é de descurar a possibilidade dessa existir (EXTOXNET, 1997).

5.1.2. Efeitos a nível ecológico

Ao contrário do que se verifica em pássaros e, em alguma medida, em plantas aquáticas, nos quais o cimoxanil não possui toxicidade aguda aparente, nos organismos aquáticos verificam-se efeitos desse tipo (EXTOXNET, 1997). Isto pode ser demonstrado através dos valores de LC_{50} ao fim de 96 horas para várias espécies de peixes; por exemplo, a carpa comum (*Cyprinus carpio*) possui um LC_{50} de 91 mg/L, enquanto que o seu valor de NOEC é de 47 mg/L, sendo evidente uma grande diferença de concentrações, logo um razoável efeito tóxico. Outro exemplo que poderá ser documentado é a toxicidade aguda sobre *Lepomis macrochirus*, com um LC_{50} de 29 mg/L e um NOEC de 17 mg/L (EXTOXNET, 1997). Estes resultados de toxicidade aguda também podem ser demonstrados ao fim de 48 horas em que o LC_{50} calculado para um crustáceo (*Daphnia Magna*) foi de 27 mg/L e o seu NOEC de 15 mg/L, resultados que nos mostram a grande toxicidade aguda do cimoxanil para os animais aquáticos. Poderá também existir toxicidade crónica sobre os animais aquáticos, quando submetidos a exposição a este tóxico. Isto poderá ser demonstrado através do valor de NOEC para a *Daphnia magna*, que é de 0,067 mg/L, e do valor de LOEC, que é de 0,15 mg/L, após um período de exposição de 14 dias.

5.1.3. Processo de degradação do cimoxanil

O processo de degradação do cimoxanil dá-se de forma bastante rápida no solo, principalmente a valores de pH superiores ou iguais a 7. A fotólise desempenha um papel determinante nesta degradação, podendo esta ocorrer com igual eficácia tanto em condições aeróbias como anaeróbias, sendo em todo caso o CO₂ o produto final da degradação. Ao fim de 7 dias, aproximadamente, já se atingiu o valor da sua semi-vida (EXTOXNET, 1997). Na água, o processo de degradação depende da sua basicidade (ocorrendo preferencialmente a valores de pH superiores a 6) e da temperatura (EXTOXNET, 1997). Nos produtos vegetais, o cimoxanil degrada-se rapidamente a determinados metabolitos, sendo o primeiro destes a glicina, que é reincorporada noutros produtos naturais. Em testes efectuados em batatas não foram encontrados vestígios de cimoxanil em testes de duração inferior a 1 dia (EXTOXNET, 1997).

5.1.4 Principais preocupações relacionadas com o impacto sobre a saúde humana de resíduos de cimoxanil

Através das pesquisas efectuadas, podemos inferir que dificilmente os resíduos de cimoxanil, desde que existam em ínfimas quantidades, poderão causar problemas na saúde humana. Isto ficou demonstrado através dos estudos efectuados em animais, em que ficou patente que o cimoxanil não levanta problemas de saúde, mesmo quando ingerido em doses exageradas. Este composto tóxico parece não ser muito persistente, atendendo ao seu tempo de semi-vida não muito elevado ao valor de pH da água (pH=5: semi-vida de 1,8 horas; pH=8: semi-vida de 5,2 horas). Contudo, mesmo com um tempo de semi-vida não muito elevado, poderá este ser o necessário para que o pesticida exerça a sua toxicidade sobre organismos aquáticos. O seu coeficiente de partição óleo/água relativamente elevado poderá causar alguns problemas tais como bioacumulação no organismo, devido à sua grande capacidade de atravessar membranas. Isto leva a crer que este composto tal como o mercúrio, possa alojar-se em locais como o cérebro, causando fenómenos tóxicos por exemplo de neurotoxicidade (Grandjean *et al.*, 2000), e que poderá também alojar-se em depósitos de gordura que a todo o momento se podem mobilizar, deslocando o tóxico para outros locais do organismo e causando assim também fenómenos tóxicos. Poder-se-á inferir que possivelmente este agente não apresente problemas para a saúde

humana quando ingerido numa ínfima quantidade, como é caso de quando ocorre ingestão de um tecido de origem animal por ele contaminado.

5.2. Propinebe

Este fungicida pertence ao grupo dos ditiocarbamatos (DTCs). Estes compostos possuem uma actividade química e biológica grande a baixos custos, sendo por isso muito usados na agricultura (Kazos *et al.*, 2007) devido à sua actividade como fungicidas foliares no tratamento das mais diversas doenças das plantas provocadas por uma grande variedade de fungos entre os quais *Oomycetes*, *Ascomycetes*, *Basidiomycetes* (FAO, 1999). É usado no tratamento de mais de 400 doenças de mais de 70 colheitas diferentes (Kazos *et al.*, 2007), entre as quais o míldio da batata, do tomate e do vinho, a sarna das maçãs, o bolor azul do tabaco e a doença de Sigatoka das bananas (FAO, 1999). O propinebe (ou também denominado quimicamente pela IUPAC de zinco polimérico 1,2-propileno-bis(ditiocarbamato)), pertence à classe dos propileno bis-ditiocarbamatos e consiste quimicamente num complexo polimérico com um metal de transição, tal como em todos os ditiocarbonatos (variando o metal utilizado), neste caso o zinco (Kazos *et al.*, 2007).

Este composto é usado essencialmente sob a forma de *spray* por toda a Europa, particularmente nas regiões do mediterrâneo (Kazos *et al.*, 2007), normalmente em formulações com outras substâncias como o oxidixil, carbendazim, oxidoclorido de cobre, triamefron ou cimoxanil (FAO, 1999). Trata-se de um sólido de aparência branca a amarelada e praticamente sem odor (INCHEM, 1993). O peso molecular do monómero é de 289,8 g/mol, apresenta um ponto de fusão de cerca de 150 °C (FAO, 1999), e uma pressão de vapor relativamente baixa (cerca de $1,6 \times 10^{-4}$ Pa a 20 °C). É praticamente insolúvel em água, com uma solubilidade inferior a 0,01 g/L a 20 °C. Devido a este facto, torna-se praticamente impossível a sua decomposição por hidrólise. Em solventes orgânicos mais comuns como o n-hexano, tolueno, acetona ou acetonitrilo é praticamente impossível a sua solubilização (em todos estes solventes apresenta uma solubilidade inferior a 0,1 g/L); em solventes orgânicos como a dimetilformamida (DMF) e o dimetilsulfóxido (DMSO) é muito solúvel, com solubilidades superiores a 200 g/L (European Commission, 2003). A sua estabilidade hidrolítica depende em muito do pH, sendo mais facilmente

hidrolizável em condições mais ácidas, sendo que a pH=4 o seu tempo de hidrólise é de cerca de 19 horas enquanto que a pH=9 é de cerca de 5 dias, sendo dois os produtos desta hidrólise: o PTU (propilenotioureia) e o carbono dissulfito (European Commission, 2003). O seu produto principal, o PTU (propileno tioureia), apresenta um valor bastante baixo de $\log P_{O/A} = -0,26$ a uma temperatura de cerca de 22 °C (European Commission, 2003). O propinebe é facilmente degradado na presença de luz solar. Quando se encontra em água, este processo demora menos de 1 hora, sendo o produto final deste processo o propilenotioureia (PTU) (European Commission, 2003).

5.2.1. Metabolismo e toxicidade

Trata-se de um tóxico que, quando administrado por via oral, é rapidamente metabolizado e excretado tanto pela urina como pelas fezes (INCHEM, 1977). A sua absorção é rápida mas não se dá de forma completa, pois apenas 50 a 66% da dose administrada é absorvida, enquanto que sob a forma do seu metabolito propilenotioureia mais de 95% da dose é absorvida. Após 2 horas de administração atinge-se o máximo da concentração plasmática (European Commission, 2003). O seu metabolismo desencadeia-se essencialmente através de 2 processos, a via da formação do metabolito propilenotioureia (PTU), e a via da formação do metabolito propilenodiamina (PDA). Sob a forma de propinebe, é excretado de forma rápida e completa em cerca de 48 horas tanto nas fezes como na urina, cerca de 53 e 46% respectivamente, enquanto que sob a forma do seu metabolito propilenotioureia é excretado ainda mais rapidamente mas não de forma completa (90%), em cerca de 18 horas após a administração, sendo excretado quase na totalidade através da urina (cerca de 85 a 92% da dose que foi administrada) (European Commission, 2003). Este composto acumula-se no organismo, essencialmente nas glândulas tiróide e pituitária (INCHEM, 1977), o que pode originar fenómenos de neurotoxicidade no futuro (Kazos *et al.*, 2007). Todos os ditiocarbonatos, não sendo o propinebe uma excepção, através dos seus metabolitos isociânicos, interferem com a síntese e metabolismo das proteínas, interrompendo-os, devido à activação e inactivação dos grupos sulfidril (SH) nos aminoácidos, proteínas e enzimas, exercendo assim toxicidade (Güven *et al.*, 1998).

Toxicidade aguda do propinebe

Através de estudos efectuados em animais, pode-se verificar que o propinebe apresenta toxicidade aguda baixa; por exemplo, é necessária uma concentração superior a 5000 mg/kg tanto por via oral como por via dérmica para matar metade de uma população de ratos. Nos testes de irritação da pele e dos olhos não houve resultados positivos, enquanto que nos de sensibilização existem tanto testes positivos como negativos (European Commission, 2003).

Toxicidade crónica do propinebe

A toxicidade deste composto a médio e longo prazo varia muito consoante a espécie e o tempo de exposição. Por isso, torna-se necessário efectuar vários testes em diversos animais para se poder inferir da sua toxicidade nos seres humanos (INCHEM, 1993). Num grupo de ratinhos wistar foi avaliada a toxicidade para as concentrações de 0, 100 e 500 ppm deste composto tóxico num período de 6 meses. Uma parte desses ratinhos foi sacrificada imediatamente para as concentrações de 500 ppm, tendo-se verificado um aumento do tamanho da tiróide tanto nos indivíduos do sexo masculino como do sexo feminino; contudo, nos restantes ratos, sacrificados 8 semanas depois, não se verificou aumento visível da tiróide relativamente ao controlo nos indivíduos do sexo feminino, indicando uma reversibilidade da anomalia (INCHEM, 1993). Noutro estudo, avaliou-se a função da tiróide sendo estudados durante 63 dias um grupo de 36 ratos do sexo masculino, nas concentrações de 0, 0,2, 0,6, 2 e 10 ppm de propinebe. Em 2 dos 10 ratos submetidos a uma dose de 10 ppm em 63 dias, verificou-se uma pequena hipertrofia no epitélio folicular da tiróide (NOAEL de 10 ppm), contudo com apenas este resultado não se poderá inferir que este seja um efeito adverso permanente em ratos. Em nenhuma das outras experiências se verificaram quaisquer efeitos a nível da tiróide (INCHEM, 1993). Num grupo de 6 coelhos brancos da Nova Zelândia avaliou-se o grau de irritação da pele causada pelo propinebe, administrando-se este 5 vezes por semana em períodos de 7 horas, durante 3 semanas nas concentrações de 0, 50 e 250 mg/kg/dia (INCHEM, 1993). Passado este tempo não se verificou qualquer tipo de irritação da pele, sendo que a única alteração verificada nos coelhos foi um pequeno aumento do tamanho do fígado nas fêmeas tratadas com a concentração de 250 mg/kg/dia (INCHEM, 1993). Em estudos realizados em cães, para concentrações máximas de

3000 ppm (75 mg/Kg/dia) de propinebe durante 2 anos, verificou-se que não houve qualquer tipo de alteração no animal (INCHEM, 1993). Para averiguar acerca da carcinogenicidade do propinebe avaliou-se durante 104 semanas a ocorrência de tumores em ratinhos submetidos a doses de 0, 50, 200 e 800 ppm. Em todos os outros parâmetros estudados, em termos de clínica hematológica, função urinária, peso dos órgãos e avaliação histopatológica de lesões neoplásicas, não se revelaram diferenças relativamente ao controlo com o passar do tempo (INCHEM, 1993). Em termos de carcinogenicidade, começaram a ocorrer maior percentagem de tumores na dose mais elevada nas fêmeas, enquanto que nos ratos do sexo masculino não se verificavam praticamente quaisquer alterações de incidência. Os tumores mais incidentes foram, nos ratos do sexo masculino, os adenomas pulmonares e linfomas malignos, enquanto que nas fêmeas foram tumores benignos das células granulosas dos ovários. Não se verificou qualquer aumento na incidência de cancro da tiróide e da glândula adrenal tanto nos ratinhos de sexo masculino como do sexo feminino. Nos ratinhos do sexo masculino verificou-se um aumento da incidência de adenomas hepatocelulares nas doses mais elevadas, o mesmo não acontecendo com os ratinhos do sexo feminino. O NOAEL para este estudo foi de 200 ppm (26 mg/Kg/dia), baseado no aumento da incidência de tumores hepáticos nas doses de 800 ppm (INCHEM, 1993). Outro estudo de longo prazo realizado em ratos com doses de 0, 1, 2, 10, 100, 1000, 2000 e 8000 ppm durante 2 anos revelou que para as doses acima de 100 (1000, 2000 e 8000), verificou-se um aumento da mortalidade, uma redução do peso do corpo, diminuição da ingestão de alimentos e paralisia muscular. Após a realização das autópsias, verificou-se um aumento do peso do fígado, rins e tiróide às concentrações de 100 ppm e superiores. Os estudos histopatológicos revelaram que não havia modificações no fígado e no rim mas demonstraram degeneração a nível do músculo esquelético e em termos de incidência de tumores na tiróide a 1000 ppm e acima. O NOAEL para este estudo foi de 10 ppm, baseado no aumento do peso dos órgãos a 100 ppm (INCHEM, 1993).

Para aferir acerca dos efeitos do propinebe sobre a reprodução, usou-se durante 3 gerações de ratos concentrações de propinebe na dieta de 0, 20, 60, 200 e 600 ppm, tendo-se constatado que, a partir da concentração de 200 ppm, se verificava uma diminuição do tempo de gestação, um mais baixo peso à nascença e um menor número de filhotes. Sendo assim, o NOAEL desta experiência foi de 60 ppm (3mg/kg/dia) (INCHEM, 1993). Para averiguar acerca

da sua toxicidade em fetos e embriões, estudou-se em ratos fêmeas grávidas, para doses de 0, 3, 10, 30, 100 mg/kg/dia, e testou-se do dia 6 ao dia 15 de gestação. Verificou-se que a partir da dose de 30 mg/kg/dia começaram a aparecer ligeiros efeitos tóxicos a nível das mães, tais como sonolência, eriçar do pelo e coxear, e nas doses de 100 mg/kg/dia foi observada dispneia, ataxia, paralisia das extremidades, tremores e, por vezes, morte. O crescimento fetal encontrava-se deprimido, acontecendo também displasia das extremidades. Assim o NOAEL para este teste foi de 10 mg/kg/dia para a mãe e de 30 mg/kg/dia para os descendentes (INCHEM, 1993).

5.2.2. Efeitos a nível ecológico

Este composto não apresenta toxicidade para os mamíferos terrestres nem para os pássaros. Estudos efectuados demonstraram isso mesmo, pois a dose letal para matar metade da população de algumas espécies de pássaros é superior a 5000 mg/kg, um valor bastante elevado (Bayer CropScience, 2004). O mesmo já não se passa no caso dos animais aquáticos (Bayer CropScience, 2004) em que é necessária apenas uma dose de 0,4 mg/L para matar metade da população de truta arco-íris exposta (*Onchorhynchus mykiss*) sendo que para doses superiores a 0,1 mg/L/dia durante 28 dias já se verificam efeitos tóxicos neste organismo aquático (European Commission, 2003).

5.2.3. Processos de degradação do propinebe

O processo de degradação deste composto no solo dá-se de forma relativamente rápida (Bayer CropScience, 2004), pois apresenta um tempo de semi-vida no solo entre 2 a 8 dias. No solo, este pesticida degrada-se em vários metabolitos e CO₂, sendo estes a propilenoureia (PU; cerca de 50% da quantidade encontrada), a propilenotioureia (PTU; cerca de 4%) e outros metabolitos (menos de 4%) (INCHEM, 1977). Na água, o processo de degradação dá-se de forma também bastante rápida (Bayer CropScience, 2004). Durante o processo de degradação formam-se vários metabolitos, em diferentes quantidades, sendo estes a propilenoureia (PU), a propilenotioureia (PTU), o 4-metilimidazole e compostos metílicos, como o DIDT (5,6-dihidro-3H-imidazo(2,1-C)-1,2,4-ditiole-3-tione) e a base de Jaffe's (3-(2imidazolin-2-il)-2-

imidazolidinone) (INCHEM, 1977). O propinebe degrada-se essencialmente via PTU, sendo este metabolito rapidamente degradado em alguns frutos, tais como maçãs (INCHEM, 1977).

5.2.4 Principais preocupações relacionadas com o impacto sobre a saúde humana de resíduos de Propinebe

Este composto tóxico apresenta alguns problemas em termos de toxicidade, principalmente a nível de toxicidade crónica. Isto ficou demonstrado através dos estudos efectuados em animais, em que se verificou que esta toxicidade se deve essencialmente a dois factores: por um lado, a acumulação na tiróide de determinada parte do composto ingerido e, por outro lado, a toxicidade provocada pelos metabolitos isociânicos que inactivam os grupos sulfidrilo dos aminoácidos, proteínas e enzimas. Deste modo, os principais problemas associados à sua toxicidade são a nível da tiróide, da carcinogénese e a nível da reprodução. Este fenómeno ainda poderá ser agravado devido a este agente ter um tempo de semi-vida relativamente elevado, sendo assim difícil a sua biotransformação e promovendo a sua bioacumulação. Outro factor que poderá ser importante em termos de toxicidade é a sua capacidade de persistir na água. Devido à sua insolubilidade na água, terá uma forte tendência para ser absorvido pelos organismos vivos, pelo que irá persistir durante mais tempo nestes em baixas concentrações; tal facto resulta num aumento do tempo de contacto dos organismos com o composto tóxico, podendo haver assim uma maior extensão da contaminação. Assim, e em face de todos os dados apresentados, podemos concluir que este composto tóxico poderá causar problemas de saúde em seres humanos, até mesmo em pequena quantidade, principalmente através da sua ingestão continuada.

5.3. Glifosato

O glifosato, também designado pela IUPAC N-(fosfometil)-glicina, é um dos herbicidas mais usados em todo o planeta. Foi descoberto antes de 1974 e é comercializado para todo o mundo pela Monsanto Company sob a forma de vários produtos, de seu nome Roundup®, Rodeo®, Accord®, entre outros (COX, 2000). Tornou-se um produto de muito sucesso devido ao seu comportamento e à sua grande persistência no solo (Araújo *et al.*, 2003). O glifosato é um

ácido, mas é usado essencialmente sob a forma de sal, normalmente sob a forma de sal de isopropilamina (EXTOXNET, 1996), como é o caso da formulação do Roundup®.

Trata-se de um herbicida sistêmico, não selectivo, usado no controlo das ervas daninhas, silvas e de todas as outras plantas selvagens não desejadas em jardins ou plantações (Watts e Macfarlane, 1999). O seu mecanismo de acção baseia-se na modificação de processos bioquímicos que se efectuam na planta, como são os casos da síntese de aminoácidos, ácidos nucleicos e proteínas. Um desses processos, e talvez o mais importante, é a inibição da EPSPS (enolpiruvil shikimato-3-fosfato sintase), fazendo com que não haja síntese de aminoácidos aromáticos essenciais para a sobrevivência da planta (Coutinho e Mazo, 2005).

Trata-se de um cristal de aparência branca, muito clara, sem odor, com um peso molecular de 169 g/mol e uma densidade relativa de 1,705, apresentando-se sólido à temperatura ambiente (ponto de fusão de 189,5 °C), e com uma pressão de vapor baixa (cerca de $1,31 \times 10^{-5}$ Pa a 25 °C) (European Commission, 2002). É pouco solúvel em água (com uma solubilidade de 10,5 g/L a 20 °C e pH 2, quando na forma de ácido); quando na forma de sal, a sua solubilidade aumenta muito, chegando a valores na ordem dos 1000 g/L como no caso do Roundup®. Este composto é praticamente insolúvel em solventes orgânicos (European Commission, 2002). Em termos de estabilidade, pode dizer-se que este pesticida é resistente a toda e qualquer condição de pH a 25 °C (European Commission, 2002). Apresenta um coeficiente de partição bastante baixo, $\log P_{o/w} = -3,2$ a pH entre 5 e 9 a 25 °C (European Commission, 2002). A sua resistência à luz na água é enorme, apresentando valores de 33, 69 e 77 dias para valores de pH de 5, 7 e 9, respectivamente, ou seja, quanto maior básico for o ambiente, maior é a sua resistência (European Commission, 2002).

5.3.1. Metabolismo e toxicidade

O glifosato é rapidamente absorvido, mas não na totalidade (somente 30% do que é administrado) por via oral, sendo que apenas uma pequeníssima quantidade atinge todos os tecidos. A acumulação é quase inexistente, sendo de apenas 1% ao fim de 1 semana (European Commission, 2002). A biotransformação dá-se em pequena quantidade, sendo que cerca de 97%

do que é administrado é rapidamente excretado sem qualquer alteração através da urina e fezes, sendo o AMPA (ácido aminometilfosfónico) o único metabolito presente (INCHEM, 1994). O AMPA causa uma grande variedade de efeitos tóxicos, particularmente a nível crónico e sub-crónico, pois a nível agudo apresenta uma toxicidade relativamente baixa ($LD_{50} = 8300$ mg/kg do peso corporal em ratos). Em termos de toxicidade sub-crónica, um estudo realizado em ratos demonstrou que este composto causa problemas tais como o aumento da actividade de enzimas, a diminuição de peso de órgãos e a excessiva divisão do epitélio urinário (Cox, 2000).

O glifosato é metabolizado, apesar de em pequena quantidade, no fígado, estando aqui um dos mais importantes mecanismos da sua toxicidade, originando espécies reactivas de oxigénio (ROS) com consequente desregulação do mecanismo de *stress* oxidativo e ocorrendo elevada produção de malonildialdeído (MDA). Esta produção de ROS vai fazer com que haja danos a nível das proteínas, lípidos e DNA, o que explica muitos fenómenos tóxicos causados por este agente (Beuret *et al.*, 2004). A excreção é rápida e quase completa, sendo que ocorre em cerca de 30% através da via urinária (European Commission, 2002).

Toxicidade aguda do glifosato

O glifosato praticamente não possui toxicidade aguda, pois estudos efectuados demonstraram que o seu LD_{50} para ratos é de cerca 5600 mg/kg e para coelhos, ratinhos e cabras seria superior a 10000 mg/kg (EXTOXNET,1996). Normalmente, este pesticida não causa irritação nem sensibilização da pele, como ficou demonstrado em estudos efectuados em coelhos e em cobaias, respectivamente. Contudo, algumas formulações existentes causam irritação severa dos olhos e da pele (EXTOXNET, 1996). Nas formulações de Roundup®, os efeitos adversos mais comuns que estão descritos são a irritação dos olhos e da pele, o aumento da pressão sanguínea, o aumento dos batimentos cardíacos, edemas, náuseas, palpitações, vômitos, garganta inflamada e febre (Cox, 2000).

Toxicidade crónica do glifosato

O glifosato é um agente que exerce toxicidade quando administrado em baixas concentrações durante um determinado período de tempo (Cox, 2000). Isto poderá ser demonstrado por estudos efectuados em animais. Num estudo de média duração em ratos, verificaram-se para todas as doses estudadas (entre 200 e 3400 mg/kg por dia) lesões nas glândulas salivares. Este agente ainda se torna mais tóxico quando se encontra em formulações juntamente com outros produtos, como é o caso do Roundup®. Um estudo efectuado para avaliação deste efeito concluiu que após uma exposição durante 7 dias, a partir da dose de 790 mg/kg por dia existiam casos de pneumonia e 1/3 da população de ratos estudada morreu (Cox, 2000). Em estudos de longo prazo verificam-se efeitos tóxicos na maioria dos casos. Tal facto foi observado num estudo efectuado durante 2 anos em ratinhos Charles River, que foram submetidos a dietas contendo concentrações deste agente de 0, 1000, 5000, e 30000 mg/kg. Verificou-se uma diminuição do peso do corpo dos machos e necrose centrilobular dos hepatócitos, para doses mais elevadas; hipertrofia centrilobular dos hepatócitos, para doses mais baixas; doses médias a elevadas foram responsáveis por hiperplasia do epitélio urinário (INCHEM, 1994).

Em termos de carcinogénese, estudos efectuados demonstraram que a exposição ocupacional a este agente aumenta o risco de desenvolvimento de linfoma de Hodgkins (Cox, 2000). Outros estudos efectuados em ratos demonstraram que, para as doses mais elevadas de um teste (30mg/kg de peso corporal por dia), ocorreu um aumento do número de cancros do testículo nos machos e um aumento do cancro da tiróide nas fêmeas (Cox, 2000). Outro estudo ainda veio demonstrar um aumento da prevalência de cancro do pâncreas e do fígado nos machos e do cancro da tiróide nas fêmeas (Cox, 2000) de ratos. Apesar destes estudos, a EPA considera que o glifosato não é a causa destes tumores; devido a isto, o glifosato é classificado no grupo E: “não se evidencia como cancerígeno em seres humanos” (Cox, 2000). As empresas de produção de formulações com glifosato revelam que estas não possuem potencial mutagénico, o que não se encontra totalmente esclarecido (alguns estudos efectuados demonstram exactamente o contrário). Estudos efectuados em animais demonstram que, a nível da reprodução, o glifosato pode causar problemas a nível da quantidade e qualidade do esperma, tumores nas células de

Leydig, diminuição da produção das hormonas sexuais, nascimentos prematuros, abortos espontâneos (Cox, 2000), redução do peso dos filhotes (European Commission, 2002), entre outros problemas.

5.3.2. Efeitos a nível ecológico

O glifosato, regra geral, exerce um efeito negativo sobre os ecossistemas, tanto de forma directa, exercendo toxicidade sobre o animal, como de forma indirecta, degradando o ambiente onde vivem os animais. Existem na natureza insectos com efeito positivo a nível da protecção contra as pestes, atacando outros animais responsáveis pela calamidade. O glifosato, devido à sua não-selectividade, mata todo e qualquer organismo, mesmo os que possuem efeitos benéficos. Isto pode ser demonstrado através de um estudo realizado pela International Organization on Biological Control, que demonstrou que após o uso de Roundup®, 80% da população de 4 espécies de insectos benéficos morreram (Cox, 2000). O glifosato na forma de ácido exerce pouquíssimos efeitos tóxicos em organismos aquáticos: os LC₅₀ 96h são de 120 mg/L para o peixe *Lepomis macrochirus*, de 86 mg/mL para a truta arco-íris (*Onchorhynchus mykiss*), e de 168 mg/L para o *Rasbora heteromorpha* (EXTOXNET, 1996). No caso de formulações que se encontram na forma de sal, devido ao uso de surfactantes (como no caso do Roundup®) a toxicidade, expressa em termos de letalidade, aumenta muito em ambientes aquáticos (EXTOXNET, 1996). No caso do Roundup®, a toxicidade da formulação é cerca de 30 vezes mais elevada do que a do composto glifosato. Sobre pássaros, este composto exerce pouca toxicidade directa (LC₅₀ = 2000 mg/kg peso corporal), sendo o prejuízo para estes devido à toxicidade indirecta, baseando-se na destruição de plantas, que servem de alimento e suporte para estes animais (Cox, 2000). Em pequenos mamíferos passa-se exactamente o mesmo, pois os efeitos adversos devem-se essencialmente à morte de plantas que lhe servem de alimento, sendo a toxicidade aguda nestes organismos regra geral bastante baixa (Cox, 2000).

5.3.3. Processos de degradação do glifosato

No solo, o glifosato tem um grau de persistência bastante elevada, podendo o seu tempo de semi-vida ir de uma semana a 174 dias. Este tempo está dependente de como o glifosato está

em contacto com o solo e dos microorganismos nele existentes capazes de o degradarem. A degradação microbiana leva à formação do metabolito AMPA (ácido aminometilfenólico), tendo este uma semi-vida no solo entre 240 e 958 dias, dependendo dos solos (Watts e Macfarlane, 1999). Na água, o glifosato é relativamente persistente, tendo uma semi-vida entre 12 dias e 10 semanas (EXTOXNET, 1993), devendo-se isto ao facto de que, apesar deste ser solúvel em água, é resistente à hidrólise, ficando nos sedimentos e partículas em suspensão (Watts e Macfarlane, 1999). O glifosato e o seu metabolito AMPA são bastante persistentes na maioria das plantas, pois permanecem no alimento mesmo depois dos vegetais serem lavados ou descascados. Tal facto deve-se à deslocação destes compostos para o interior da planta, permanecendo esta assim sempre com resíduos (Cox, 2000). Existem contudo outras plantas que conseguem metabolizar rapidamente estes agentes, ficando a planta livre de resíduos (EXTOXNET, 1996).

5.3.4. Principais preocupações relacionadas com o impacto sobre a saúde humana de resíduos de Glifosato

Este agente poderá causar graves problemas de saúde pública principalmente se consumido sob a forma de sal; é de esperar problemas como diversos tipos de cancro, mutações com efeitos assinaláveis e problemas a nível da reprodução. Isto é sustentado pelo facto deste composto em estudos realizados em animais exercer toxicidade crónica e sub-crónica e, no caso da forma de sal (Roundup®), ainda se verificar para além destes, efeitos a nível agudo assinaláveis (EXTOXNET, 1996). Este problema é um pouco atenuado devido à maior solubilidade dos sais de glifosato na água relativamente à forma ácida, pelo que exibem menor tendência para serem bioacumulados pelos organismos expostos. A toxicidade aquática é contudo agudizada devido à baixa capacidade de hidrólise deste agente, fazendo com que os animais estejam expostos durante mais tempo à sua acção. Contudo a rápida excreção diminui a perigosidade deste composto sendo apenas uma ínfima parte aquela que é acumulada nos tecidos (baixo coeficiente de partição O/A).

VI. Uso de metais pesados e o seu potencial de contaminação

Com a industrialização, rápido desenvolvimento económico e povoamento de determinadas regiões, tem-se assistido à contaminação tanto terrestre como aquática em locais próximos de onde se efectua a utilização de metais (Zhang *et al.*, 2007). Isto acontece em grande parte devido à inexistência de locais de depósito final para esse tipo de resíduos (Sinha *et al.*, 2006). Eliminar estas fontes de contaminação tornou-se um objectivo dos países tanto desenvolvidos como em vias de desenvolvimento (Zhang *et al.*, 2007). Estes metais, após o seu uso, tanto em actividades domésticas como industriais, são despejados para os diversos compartimentos ambientais (água, solo e plantas), entrando no nosso organismo tanto através da cadeia alimentar como através da ingestão directa, passando desta forma a ser uma grande ameaça à saúde pública (Bi *et al.*, 2006). Uma vez no interior do nosso organismo, e através dos mais diversos mecanismos, exercem variados efeitos de algum modo idênticos aos de outros contaminantes (ex: pesticidas), a nível do sistema nervoso, hematopoiético, cardiovascular, urinário, gastrointestinal, reprodutivo e carcinogénese.

O local seleccionado para o presente estudo (Pateira de Fermentelos) sofreu uma grande acumulação de metais pesados, provenientes das actividades industriais e domésticas existentes nesta região, pelo que se torna essencial estudar os efeitos provocados por estes metais no animal em estudo (*Procambarus clarkii*) para se poder inferir acerca dos riscos da ingestão deste crustáceo pela população humana. Entre os muitos metais que poderiam ser estudados irão ser abordados o chumbo, o cádmio.

6.1 Chumbo

O chumbo é um metal que se encontra largamente distribuído pela crosta terrestre, cerca de 13 g/tonelada (Phyles, 2007). Este metal foi sendo aproveitado ao longo dos tempos para os mais variados fins, sendo que na civilização romana já era utilizado como material dos tubos de abastecimento de água, o que se veio a prolongar até quase aos nossos dias (Roma-Torres *et al.*, 2007). A partir dos anos cinquenta, este metal começou a ser utilizado como aditivo na gasolina. Na década de 90 foi muito utilizado nas baterias, na protecção de cabos, como metal condutor de

electricidade, em brinquedos, na cerâmica, na protecção da radiação em televisões e computadores, circuitos eléctricos, entre outros usos (RAIS Lead, 1994). Este metal ocorre naturalmente na forma de galena (PbS), tratando-se de um cristal de aparência azulada, relativamente macio e maleável, sendo também bastante resistente à corrosão mas também bastante oxidável quando em contacto com o ar (Phyles, 2007). Possui um peso molecular de 207,19 g/mol e uma densidade relativa de 11,3 g/cm³, valores elevados quando comparados com os de outros metais (Thornton *et al.*, 2002). Possui também um ponto de fusão baixo quando comparado com os de outros metais (cerca de 327,5 °C) (RAIS Lead, 1994).

6.1.1. Metabolismo e toxicidade

Os dois principais processos pelos quais o chumbo entra no organismo humano são através da ingestão e inalação. Após a entrada no organismo, apenas uma parte é absorvida, sendo nas crianças muito maior que nos adultos, 50% e 10-15% respectivamente (RAIS Lead, 1994). A absorção gastrointestinal é a que se dá em maior quantidade e é dependente de factores da dieta e da natureza química do chumbo. Esta poderá ser aumentada no caso das crianças pela deficiência de ferro ou de cálcio, indo este substituí-los nos seus locais no organismo (essencialmente no osso) (RAIS Lead, 1994). A absorção pelo tracto respiratório está dependente do tipo de partículas inaladas e da quantidade depositada nos pulmões. Contudo, a maior parte das partículas depositadas nos pulmões é absorvida para o sangue (RAIS Lead, 1994). Após absorção, o chumbo é distribuído por três compartimentos, que são o sangue, os tecidos moles e o osso (RAIS Lead, 1994). No sangue, o chumbo encontra-se essencialmente nos eritrócitos (em cerca de 99%), tendo nestes uma semi-vida entre 25 e 28 dias quando em contacto com os outros compartimentos (RAIS Lead, 1994). A fracção de chumbo que se encontra no soro e plasma está em equilíbrio com o chumbo existente nos tecidos moles (RAIS Lead, 1994). Nos tecidos moles, o chumbo encontra-se em maior quantidade ao nível do fígado e do rim, e em menor quantidade ao nível do cérebro e do músculo, podendo com a idade aparecer também ao nível dos ácidos nucleicos (RAIS, 1994). A maior fracção de chumbo encontra-se a nível do osso, com uma semi-vida de cerca de 20 anos, estando esta em equilíbrio com o chumbo dos tecidos moles (RAIS Lead, 1994).

O chumbo inorgânico é conjugado com a glutatona, não sendo assim metabolizado no interior do organismo (RAIS Lead, 1994). O chumbo é essencialmente excretado através da urina, cerca de 75%, sendo o restante eliminado através das fezes e, numa pequeníssima parte nas mulheres, através do leite materno (RAIS Lead, 1994).

6.1.2. Toxicidade do chumbo

O principal mecanismo pelo qual se exerce a toxicidade do chumbo é através da sua capacidade de mimetizar o cálcio, substituindo-o em processos cálcio-dependentes (Phyles, 2007). Outros mecanismos de toxicidade do chumbo são a desregulação da homeostase do cálcio, a estimulação do transporte de cálcio para a mitocôndria, a abertura do poro mitocondrial de passagem, destruição da membrana e da própria mitocôndria, geração de radicais livres de oxigénio (ROS), desregulação do balanço oxidante/antioxidante nos tecidos, alteração no metabolismo dos lípidos, substituição do zinco em vários processos dependentes do zinco, e a mobilização do chumbo para os locais de armazenamento nos tecidos ósseos (Ahmed *et al.*, 2007). O efeito deste metal dá-se após exposição continuada, por diversas vias (dieta, solo, água); esta exposição vai ocasionar um aumento da concentração deste metal nos vários tecidos do corpo, causando a qualquer momento efeitos adversos locais (RAIS Lead, 1994). A melhor maneira de calcular o grau de exposição a este agente assenta na determinação da sua concentração no sangue (RAIS Lead, 1994) ou pela determinação da actividade da enzima sanguínea ALAD (Chia *et al.*, 2007). Os maiores efeitos causados por este metal dão-se a nível do sistema nervoso central e periférico, sistema hematopoiético, sistema cardiovascular, rins, fígado e sistema reprodutor feminino (Hsu *et al.*, 2002). Ao nível do sistema nervoso, os principais efeitos observados são as encefalopatias, que ocorrem quando as concentrações sanguíneas deste metal sobem acima dos 120 µg/dL. Os sintomas observados são normalmente convulsões e coma, e a morte dá-se em 48 horas. A concentrações um pouco mais baixas (por volta dos 40-60 µg/dL), poderão ocorrer sub-encefalopatias que se caracterizam pela diminuição da velocidade de transmissão do impulso nervoso. A concentrações sanguíneas de cerca de 40 µg/dL, existe uma diminuição do tempo de resposta e de reacção, e dificuldades na memória a curto prazo (RAIS Lead, 1994).

O principal efeito verificado ao nível do sistema hematopoiético devido à presença de chumbo na corrente sanguínea é a anemia de Frank. Esta condição verifica-se quando as concentrações de chumbo na corrente sanguínea se situam acima de 80 µg/dL em adultos e dos 70 µg/dL em crianças. Esta situação faz com que haja uma diminuição da produção de hemoglobina e do tempo de semi-vida dos eritrócitos. A diminuição do tempo de semi-vida dos eritrócitos condiciona um aumento da fragilidade das membranas sanguíneas, e a diminuição da hemoglobina faz com que haja diminuição das enzimas envolvidas na síntese de grupos heme (ALAS, ALA, ALAD e as enzimas citolíticas que catalizam a formação do profobilinogéneo). A redução da síntese do grupo heme começa a verificar-se logo quando os valores de chumbo no sangue se encontram em valores da ordem dos 50 µg/dL nos adultos e dos 40 µg/dL em crianças (RAIS Lead, 1994).

Ao nível do sistema cardiovascular, estudos efectuados demonstraram que o chumbo pode provocar aumento da pressão sanguínea (particularmente em casos de homens de meia idade, e a partir de concentrações no sangue tão baixas quanto 7 µg/dL). A exposição ao chumbo em pessoas com problemas de circulação poderá desencadear fenómenos como acidentes vasculares cerebrais e trombozes (Rais Lead, 1994).

Ao nível do sistema urinário, poderão ocorrer duas situações mediante a tipologia de exposição; seja de uma única exposição (aguda), ou de várias exposições (crónica). Se se tratar de uma exposição ocasional a uma grande quantidade de chumbo, o efeito denomina-se de nefropatia aguda, sendo esta caracterizada por modificações nas células epiteliais do tubo proximal; são exemplos dessas modificações a formação de corpos de inclusão nucleados, mudanças ultraestruturais da mitocôndria e citomegalia das células epiteliais. Esta mudança da fisionomia das células causa fenómenos tais como aumento da aminoacidúria, glucosúria, fosfatúria, diminuição da excreção de sódio e da síntese de 1,25-dihidroxitamina D, alterando também o balanço do sistema renina/angiotensina II (Rais Lead, 1994). Se o problema for consequência da exposição continuada ao chumbo estamos na presença de uma nefropatia crónica, e os problemas a esta associados são consequência da escassez ou diminuição no número de corpos de inclusão, atrofia ou hiperplasia das células epiteliais tubulares, como progressivamente das células intersticiais, glomerulares e arteriais, e esclerose arterial. Esta

situação ocorre quando os valores de chumbo no sangue se situam por volta dos 62 µg/dL. Os problemas associados a estes factores são essencialmente a redução da filtração glomerular e a azotemia. É considerada nefropatia crónica, quando 50 a 75% dos túbulos renais estão destruídos (Rais Lead, 1994).

Os efeitos ao nível do sistema gastrointestinal não são particularmente importantes e resultam normalmente quando existe uma intoxicação devido a uma única ingestão de cerca de 100 µg/dL a 200 µg/dL de chumbo em adultos e entre 40 µg/dL a 60 µg/dL em crianças. Os seus principais sintomas são dores abdominais, diarreia, náuseas, vómitos, anorexia e perda de peso (Rais Lead, 1994).

O chumbo pode provocar carcinogénese de várias formas, tais como danos directos no DNA ou, indirectamente, através dos efeitos causados por radicais livres de oxigénio (ROS). Para além destes efeitos, este metal pesado quando em altas concentrações pode ligar-se ao DNA e mudar a sua conformação, possuindo ainda a capacidade de hidrolisar a cadeia de RNA (Barciszewska *et al.*, 2004). De forma indirecta, este metal pesado poderá ter a capacidade para produzir radicais livres de oxigénio (ROS), causando danos em vários componentes celulares tais como proteínas, membranas lipídicas e ácidos nucleicos (Hsu *et al.*, 2002). Experiências efectuadas em modelos animais mostraram que o tumor dos rins é o principal tumor verificado em ratos e ratinhos, sendo que o desenvolvimento de tumores a nível do cérebro, glândula pituitária, glândula adrenal, tiróide, próstata e pulmões é também comum (Rais Lead, 1994).

A nível do feto, os efeitos provocados pela ingestão de chumbo por parte da mãe não se encontram totalmente esclarecidos, dada a sua complexidade. A exposição, por parte da mãe, ao chumbo, pode causar fenómenos tais como malformações congénitas, diminuição do desenvolvimento intra-uterino, parto prematuro, preeclampsia e neurotoxicidade fetal. Doses acima dos 45 µg/dL de chumbo estão ligadas a casos de malformações, especialmente ao nível do esqueleto; situações de aborto espontâneo estão descritas para doses moderadamente altas durante a gravidez (cerca de 25 µg/dL); a diminuição da capacidade intelectual está descrita para doses baixas (cerca de 10 a 15 µg/dL) (Weizsaecker, 2003).

6.1.3. Efeitos a nível ecotoxicológico

Um estudo efectuado num crustáceo de nome *Penaeus indicus* tentou demonstrar os efeitos do chumbo sobre dois processos vitais (consumo de oxigénio e excreção de amónia) para a homeostasia destes crustáceos. Neste caso, a capacidade de bioacumulação nos tecidos torna-se particularmente importante porque quanto maior esta for, maior será o efeito observado para o composto tóxico em questão (Chinni *et al.*, 2000).

Estes parâmetros demonstram ser altamente responsivos em função do aumento do teor em chumbo no organismo dos animais expostos. Podem ser, assim, considerados como bons indicadores da toxicidade deste metal em crustáceos.

6.1.4. Principais preocupações relacionadas com o impacto sobre a saúde humana de resíduos de chumbo.

A exposição ao chumbo, mesmo que em baixas concentrações, poderá causar graves problemas de saúde, principalmente em crianças, pois estas encontram-se normalmente mais expostas e nelas a absorção deste metal no organismo é muito maior. A grande resistência deste metal pesado faz com que persista muito tempo no caso de haver contaminação da água, ar ou solo, estando assim a população mais sujeita aos seus perigos.

A acumulação deste metal ao nível do osso poderá trazer dois tipos de problemas, um que é inerente ao seu papel de não substituição do cálcio e, outro, é que a qualquer momento se pode mobilizar a partir do osso, deslocando-se para outros locais e causando toxicidade. A sua acumulação ao nível dos tecidos moles (principalmente a nível do rim e cérebro) poderá causar graves problemas de saúde, visto serem locais onde uma não muito grande quantidade deste metal causará graves problemas de saúde. Outros locais onde este metal poderá causar problemas são o fígado (devido à sua grande bioacumulação), o sistema reprodutor e circulatório (devido às baixíssimas concentrações capazes de causar fenómenos de toxicidade), sendo neste último caso particularmente importante em indivíduos com problemas de circulação. Além destes problemas,

existem também os problemas associados com o desenvolvimento de tumores, demonstrados através de experiências efectuadas em animais de laboratório. Nestes estudos, ficou demonstrado que a maior quantidade de desenvolvimento de tumores se dá onde se verifica maior acumulação (exceptuando o osso), ou seja, nos tecidos moles, particularmente ao nível do rim e cérebro. O chumbo é um metal bastante perigoso para a saúde humana mesmo quando ingerido numa ínfima quantidade através da alimentação, pois ele acumula-se grandemente, ficando depositado durante muito tempo. Deverá assim ter-se particular cuidado com a sua ingestão, particularmente no caso das crianças devido à grande capacidade de absorção e nas grávidas devido a que quantidades muitíssimo pequenas poderão causar perturbações nos descendentes.

6.2. Cádmi

Normalmente não aparece na natureza na sua forma isolada mas sim na forma de sal (óxido de cádmio, cloreto de cádmio ou sulfureto de cádmio). Geralmente estes seus sais são bastantes tóxicos (Sousa, 2007). Trata-se de um metal que aparece raramente na crosta terrestre, contudo em algumas rochas poderá aparecer em quantidades relativamente grandes, na ordem das partes por bilião (Martelli *et al.*, 2006). O seu lançamento para o meio ambiente dá-se essencialmente para a atmosfera (valores entre os os 0,01 ng/m³ em áreas remotas e os 90 ng/m³ em determinados locais vulcânicos), seguida respectivamente para a água (valores entre 2 ng/l no Oceano Atlântico junto a Portugal e os 16 ng/l na costa do Senegal) e para o solo (valores de 0,3 pg/g e as 5 pg/g) (Cardoso e Chasin, 2001). O seu aumento na natureza fica a dever-se tanto a actividades naturais como a explosões vulcânicas (Godt *et al.*, 2006) e a erosão de rochas (Cardoso e Chasin, 2001) como a actos de natureza antropogénica, como a utilização em diversas actividades industriais (Godt *et al.*, 2006) e a exploração mineira (Cardoso e Chasin, 2001). Pensa-se que actualmente a quantidade expelida para o ambiente se cifra em cerca de 7000 toneladas por ano (Godt *et al.*, 2006). Este metal foi isolado pela primeira vez em 1817, mas somente no início do século XX começou a sua produção a nível industrial (Cardoso e Chasin, 2001). Actualmente, é utilizado como revestimento de outras ligas (como aço) para evitar a corrosão (Martelli *et al.*, 2006), como componente de várias ligas, melhorando as propriedades térmicas e mecânicas de materiais usados em anti-fricção, soldagem e aplicações eléctricas (Martelli *et al.*, 2006), como absorbente de neutrões em centrais nucleares (Godt *et al.*, 2006), como ânodo das baterias Ni-Cd (Martelli *et al.*, 2006). A sua utilização deve-se às propriedades

dos seus componentes interagirem com fótons (conferindo propriedades ópticas), pelo é utilizado em pigmentos de plásticos, pinturas, esmaltes e tintas (Martelli *et al.*, 2006). É também utilizado nos fertilizantes contendo fosfato (Godt *et al.*, 2006).

6.2.1. Metabolismo e toxicidade

A absorção do cádmio dá-se essencialmente através dos pulmões (pode chegar a 60%), podendo dar-se em alguma extensão através do aparelho gastrointestinal e numa pequena parte por via dérmica. A eficácia da sua absorção está dependente da solubilidade específica do cádmio nos diversos compartimentos do organismo, da concentração de exposição e da sua rota. O processo de absorção por via gastrointestinal está muito dependente da quantidade de cádmio absorvido por esta via, visto este processo ser saturável para concentrações muito elevadas. A absorção encontra-se aumentada nos casos de deficiência em cálcio e ferro e diminuída nos casos da existência de catiões bivalentes e trivalentes (Zn^{2+} , Mg^{2+} , Cr^{3+}) (Rais cadmium, 1991). Quanto à distribuição, o cádmio é transportado no sangue pelas hemácias e proteínas de elevado peso molecular como a albumina, sendo após isto distribuído para todos os locais do organismo, sendo que a sua acumulação se dá quase na totalidade nos rins e fígado (entre 50 e 70%). A idade interfere com a quantidade acumulada (principalmente ao nível dos rins), pois até aos 60 anos esta vai aumentando, permanecendo depois constante. A placenta funciona como barreira para o cádmio, pois esta só expõe o feto a uma pequena parte do cádmio a que a mãe se encontra exposta (Rais cadmium, 1991). O cádmio, tal como a maior parte dos outros metais, não sofre conversão metabólica; contudo liga-se a proteínas, grupos sulfidril e grupos aniônicos para formarem macromoléculas. Algumas destas ligações são de bastante importância como a ligação às metalotioneínas, que permite a ligação do cádmio a outros metais, que vão favorecer a sua deposição pelo corpo (Rais cadmium, 1991). Devido ao enorme tempo de semi-vida do cádmio no organismo (17 a 30 anos) somente uma pequeníssima parte da quantidade existente é eliminada, cerca de 0,01% do cádmio existente no corpo. Da quantidade excretada, a maior parte ocorre por via urinária (cerca de 2 a 3 $\mu\text{g}/\text{dia}$), ocorrendo a restante por via fecal (Rais cadmium, 1991).

Mecanismos de toxicidade do cádmio

Alguns mecanismos pelos quais o cádmio exerce sua toxicidade (Martelli *et al.*, 2006) são:

- Ligação a proteínas contendo grupos tiólicos, perturbando a homeostase redox, fazendo com que haja produção de radicais livres e mudanças da expressão de genes conduzindo a fenómenos como diferenciação, imortalização e apoptose da célula; esta perturbação é responsável pela resposta de alguns factores de transcrição.
- Substituição de vários metais por cádmio nos locais de ligação das proteínas.
- Alteração da concentração de cálcio intracelular, modificando a transmissão do sinal deste mensageiro, podendo provocar fenómenos de mitose ou apoptose.
- Capacidade de modular os receptores de cálcio intracelular, afectando as funções desempenhadas pelo sistema nos tecidos.
- Inibição da reparação do DNA.
- Pensa-se também que o cádmio provoca inibição da função lisossomal, fazendo com que haja interferências nos caminhos da tradução do sinal celular (Sousa, 2007).

6.2.2. Toxicidade do Cádmio

A sua toxicidade provoca diferentes efeitos a nível do organismo, sendo os primeiros a ocorrer em baixas doses, disfunções renais e doenças no osso, seguidas de efeitos a nível dos pulmões, próstata, placenta e sistema eritropoiético (Sant'Ana *et al.*, 2004).

Toxicidade aguda

Quando a entrada no organismo se dá por ingestão, apenas uma pequena parte do cádmio ingerido é absorvido (cerca de 5%), pelo que se torna necessário ingerir uma dose relativamente

elevada para causar efeitos tóxicos (Public Health Guidance Note, 2002). Encontra-se descrito que doses muito elevadas de cádmio (entre 1500 e 8900 mg, ou 20 a 30 mg/kg), foram responsáveis por morte. Os sintomas mais comuns são náuseas, vômitos, câimbras abdominais, dor de cabeça crâimbras musculares, exaustão, choque e morte (Rais cadmium, 1991). Em animais de experiência o LD₅₀ situa-se entre 225 e 890 mg/kg de cádmio elementar, sendo para os seus sais entre 63 e 88 mg/kg, para o cloreto de cádmio 72 mg/kg, para o oxido de cádmio e entre 590 e 1125 mg/kg para o estearato de cádmio (Rais cadmium, 1991).

Toxicidade crónica

O cádmio é um metal tóxico que possui um efeito cumulativo bastante elevado. Sendo assim, uma ingestão continuada deste metal através da dieta vai fazer com que haja uma grande acumulação a nível do organismo. Essa acumulação dá-se essencialmente a nível do córtex renal, devendo-se à filtração existente a nível do rim dos complexos formados entre metalotioneínas e o cádmio, sendo a disfunção renal o primeiro indício de toxicidade crónica (Public Health Guidance Note, 2002). A disfunção renal ocorre em seres humanos expostos a uma concentração crónica no córtex renal de cerca de 200 µg/g (Rais cadmium, 1991), sendo que concentrações acima deste valor causam danos a nível tubular, com impactos para a saúde difíceis de quantificar (Public Health Guidance Note, 2002). Pensa-se, no entanto, que esta grande quantidade de cádmio no rim possa aumentar a excreção de cálcio fazendo com que haja maior probabilidade de aparecimento de pedras no rim (Godt *et al.*, 2006). Os danos a este nível são os principais danos causados pela exposição ao cádmio (Sousa, 2007).

O cádmio pode causar anemia, após muitos anos de exposição, pois faz com que haja uma menor absorção de ferro pelo intestino (Public Health Guidance Note, 2002). Um problema bastante importante derivado da ingestão de cádmio surge devido à sua capacidade de substituição do cálcio a nível dos ossos, provocando afecções tais como osteoporose, fracturas espontâneas, doença de Itai-Itai (Rais cadmium, 1991). Esta última afecção causa muitos problemas graves a nível do osso (osteomalácia). A designação desta patologia decorre de uma epidemia ocorrida na bacia do rio Jinzu (Japão) em 1940, rio no qual estava implementada uma plantação de arroz que servia toda a população adjacente, e que estava contaminada com elevado

teor de cádmio (Godt *et al.*, 2006). Estudos *in vitro* efectuados em ratos demonstraram que a exposição ao cádmio interfere com as vias de estrogénios a nível dos ovários, afectando a produção de progesterona e testosterona. Consequentemente, há maior incidência de abortos espontâneos e diminuição do peso à nascença (Godt *et al.*, 2006). Estudos recentes demonstram que só por via respiratória é que o cádmio poderá possuir efeitos carcinogénicos, existindo citações na literatura que dão conta da possibilidade de este metal pesado provocar o aparecimento de cancro a nível renal e da próstata. Este encontra-se classificado pela Agência Internacional de Pesquisa contra o Cancro no grupo 1 (Godt *et al.*, 2006).

6.2.3. Efeitos a nível ecotoxicológico

Um estudo conduzido na espécie de arroz *Oryza sativa*, sujeito a concentrações de cádmio crescentes desde 0,1 μM a 1 mM durante 15 dias, demonstraram que apenas na concentração 1mM se observaram alterações macroscópicas (inibição do crescimento), e que a concentrações mais baixas até ocorria estimulação do crescimento; ocorreu aumento do número de polimorfismos à medida que aumenta a concentração e aumento dos níveis de glutathiona (GSH) até 10 μM (Aina *et al.*, 2006). Outro estudo efectuado, desta vez em cordões japonesas, para uma concentração de 100 ppm de CdCl_2 durante 28 dias permitiu verificar diminuição do peso dos animais e toxicidade hepática, embora não tenham ocorrido alterações no sistema imune e na função renal (Sant'Ana *et al.*, 2005).

6.2.4. Principais preocupações relacionadas com o impacto sobre a saúde humana de resíduos de cádmio.

Apesar dos esforços realizados no sentido de eliminar a quantidade de cádmio existente no meio ambiente, este ainda se encontra em determinados locais numa quantidade capaz de causar danos irreversíveis. O grande problema da presença deste metal na natureza prende-se com a sua capacidade para se acumular nas plantas e na água (com degradação natural bastante demorada). Estas plantas e água irão ser consumidos por animais, incluindo o homem. A via gastrointestinal, embora não sendo a via preferencial de entrada no organismo (papel que cabe à via inalatória), é muito importante. Este metal é altamente persistente no organismo, dado que

apenas 0,01% da quantidade existente no organismo é eliminada (tempo de semi-vida de cerca de 30 anos), havendo aqui um efeito cumulativo bastante pronunciado. A ingestão continuada poderá provocar toxicidade a médio e longo prazo. Pode assim afirmar-se que este metal pesado exerce o seu efeito principalmente a longo prazo, por via cumulativa, pois apresenta uma toxicidade aguda pouco pronunciada, sendo necessárias doses bastante elevadas para causar a morte (na ordem do g por kg). Isto mostra-nos que uma ingestão ocasional de um alimento contaminado com este metal não irá provocar a morte do ser humano em questão. Contudo, se essa ingestão se der de modo continuado ao longo de toda a vida, aí a situação modifica-se bastante, podendo ocorrer fenómenos de toxicidade bastante acentuados, nomeadamente a nível dos rins, fígado, e a nível reprodutivo. O principal problema deste metal em termos de saúde humana dá-se a nível renal, em que concentrações cumulativas na ordem dos 200µg/g são já capazes de causar toxicidade. É de salientar o fraco poder carcinogénico deste metal. Com isto em mente poder-se-á concluir que, uma exposição normal ou mesmo ocasional a baixas doses deste metal através da alimentação ou através da bebida, não causará problemas de maior em termos de toxicidade. Contudo, uma exposição continuada poderá ser causadora de efeitos potencialmente graves a nível da saúde, devendo portanto estar-se atento a possíveis focos de contaminação por este metal.

VII. Acumulação de compostos tóxicos no crustáceo em estudo (*Procambarus clarkii*).

Este animal é muitas vezes usado, tal como muitos outros crustáceos, como indicador de níveis de poluição por metais pesados, hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (PAHs) e pesticidas organoclorados, devido à capacidade que têm para os acumularem nos seus tecidos (Schilderman *et al.*, 1998). Um estudo realizado em laboratório (Anderson *et al.*, 1997) pretendeu avaliar o grau de acumulação por metais pesados no organismo *Procambarus clarkii* exposto a água contaminada por hidrocarbonetos proveniente de uma baía da Louisiana. A comparação dos resultados com os valores obtidos para amostras de sedimentos, permitiu obter os seguintes resultados:

Avaliação dos Efeitos Toxicológicos Decorrentes do Consumo Humano de Lagostim Vermelho da Louisiana (*Procambarus clarkii*).

Tabela nº 3- Concentrações de metais na superfície dos sedimentos (Fonte : Anderson *et al.*, 1997).

Contaminante	Concentração no sedimento 1 ($\mu\text{g/g}$)	Concentração no sedimento 2 ($\mu\text{g/g}$)
Cádmio	2	1
Crómio	43	63
Chumbo	6027	433

Tabela nº 4 - Concentrações de metais nos tecidos de *Procambarus clarkii* (Fonte : Anderson *et al.*, 1997).

Tecidos/ Dias de exposição	Chumbo (ng/g)		Crómio (ng/g)		Cádmio (ng/g)	
	Dia 0	Dia 7	Dia 0	Dia 7	Dia 0	Dia 7
Brânquias	26	205	4	74	64	4
Hepatopâncreas	4	104	18	42	295	99
Sangue	42	59	0	30	0	0
Músculo	9	0	14	16	26	21

Através destes resultados, pode concluir-se que o *P. clarkii* é um bom modelo para estudos de bioacumulação de metais (nomeadamente chumbo), pois ao longo do período de exposição as suas concentrações no organismo foram aumentando. Essa acumulação dá-se essencialmente ao nível das brânquias, ocorrendo com alguma extensão ao nível do hepatopâncreas, e no caso do crómio esta ainda poderá ocorrer ao nível do sangue. Neste estudo verificou-se que o cádmio não sofreu bioacumulação no organismo, uma vez que as suas concentrações desceram ao longo do tempo. Outro estudo realizado com o intuito de avaliar a contaminação por metais pesados no rio Guadianar (Espanha) usando o organismo *P. clarkii* durante 12 dias, revelou que o cádmio também é bioacumulável neste organismo, dando-se essa acumulação essencialmente ao nível do músculo e do hepatopâncreas (Alcorlo *et al.*, 2006). Esta evidência pode ser verificada pela análise das figuras apresentadas abaixo.

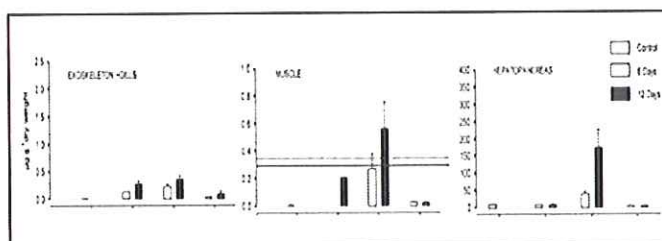


Figura nº8 - Valores das concentrações de cádmio em diferentes tecidos do organismo *Procambarus Clarkii* (Fonte : Alcorlo *et al.*, 2006).

Esta figura mostra-nos que as concentrações de cádmio no organismo vão aumentando ao longo do tempo de exposição, o que significa que o cádmio é acumulável pelo organismo deste crustáceo. Assim, pode concluir-se que o cádmio, chumbo são bioacumuláveis pelo organismo *P. clarkii*.

Quanto à capacidade do organismo *P. clarkii* bioacumular os pesticidas em estudo, não existem dados que sustentem esta hipótese. Contudo, um estudo publicado acerca do risco para a saúde de determinados compostos tóxicos num grande número de organismos existentes em vários locais dos Estados Unidos da América, revelou os seguintes resultados para um organismo semelhante àquele aqui em estudo (Watanabe *et al.*, 2003):

Tabela nº5 – Concentrações de diversos pesticidas no organismo *Procambarus acutis* (Fonte : Watanabe *et al.*, 2003)

	DDT	DDD	ALD	ABHC	PCBs	TOX	BBHC
Concentrações (mg/Kg)	0	0,45	0	0,425	0	0	0,275
	CHLD	DIEL	ENDR	GBHC	HEP	HEPOX	DDE
Concentrações (mg/Kg)	0	0,0325	0	0	0,015	0	1,92

DDT – p,p' -
diclorodifeniltricloroetanoano
DDD – p,p' -
diclorodifenildicloroetanoano
ALD – Aldrin

ABHC- Hexacloro alfa-benzeno
PCB – Bifenilos policlorados
CHLD – chlordane
DIEL – Dieldrin
ENDO – Endosulfano

ENDR – Endrin
GBHC – Hexacloro Gama-benzeno
HEPOX- Epóxido de heptacloro
TOX – Toxafeno

Através destes resultados é de supor que poderá haver algum grau de acumulação no organismo *Procambarus clarkii*, se não de todos, pelo menos de algum dos pesticidas estudados (cimoxanil, propinebe e glifosato), desde que estes existem numa quantidade significativa no local de estudo. Isto poderá ser inferido devido a alguma acumulação de outros pesticidas num organismo idêntico, como nos mostra a Tabela nº 5. De acordo com os dados acima apresentados, é de supor que o *P. clarkii* possa funcionar como um vector de contaminação apreciável de consumidores humanos nas condições referidas.

VIII. Biomarcadores possíveis de ser utilizados na monitorização ambiental da presença de contaminação e efeitos sobre o *P. clarkii*.

Os biomarcadores são usados na detecção prévia de possíveis respostas tóxicas passíveis de se darem por exposição tóxica numa determinada população a um composto xenobiótico, possibilitando uma intervenção protectora atempada. Estes dão-nos respostas quantificáveis em termos celulares, bioquímicos, moleculares e fisiológicos, nos fluidos corporais, tecidos ou órgãos de modo a que possam ser indicativas da exposição verificada (Monteiro, 2003). Segundo Timbrell (1998), um biomarcador é uma ferramenta que permite medir a exposição a um agente tóxico e avaliar a sua extensão, prevenindo-se assim a resposta tóxica mais provável. Um dos objectivos deste trabalho monográfico prende-se com o estudo de possíveis biomarcadores que poderão ser utilizados na avaliação da toxicidade provocada pelos pesticidas cimoxanil, glifosato e propinebe e pelos metais crómio, cádmio e chumbo sobre o crustáceo *Procambarus clarkii* contaminado com estes tóxicos.

8.1. Possíveis biomarcadores para o estudo da toxicidade exercida pelo composto tóxico cimoxanil no organismo *Procambarus clarkii*.

Existem poucos estudos efectuados à cerca de possíveis biomarcadores usados na avaliação do potencial tóxico do cimoxanil, e os que existem não avaliam a exposição apenas deste pesticida mas sim de misturas complexas de pesticidas que por vezes chegam às dezenas de componentes. Sendo assim, todos os estudos relatados serão da avaliação de determinado biomarcador num conjunto de pesticidas no qual está inserido o cimoxanil.

Alguns dos biomarcadores passíveis de ser utilizados na avaliação da contaminação por pesticidas foram já amplamente utilizados em humanos expostos por via ocupacional a estes compostos. Um trabalho de revisão realizado em 2001 (Bolognesi, 2003) pretendeu avaliar os efeitos citogenéticos provocados pela exposição a diferentes misturas de pesticidas em trabalhadores de diversas actividades que utilizam pesticidas. O biomarcador referido nesse estudo para avaliar o potencial de misturas contendo cimoxanil foi a frequência de micronúcleos na mucosa das células da boca. Os resultados apontaram para a não ocorrência de alterações na

frequência de micronúcleos, para nenhuma das misturas e populações observadas (Bolognesi, 2003). Outro estudo realizado em 64 trabalhadores de estufas agrícolas da região de Almeria (Espanha) expostos a cerca de 26 pesticidas, entre os quais o cimoxanil, revelou um aumento ligeiro na quantidade de micronúcleos nas células da mucosa da boca (contudo, estatisticamente não significativo) (Lueero *et al.*, 1999). Atendendo a que uma percentagem relativamente elevada da população em estudo (14,1%) utiliza este pesticida, poderá inferir-se que talvez este pesticida possua capacidade para causar danos citogénicos; contudo terão que se efectuar estudos mais aprofundados acerca do assunto. Um estudo realizado em 1995 numa população de 29 trabalhadores expostos a um grande número de pesticidas incluindo o cimoxanil (utilizado por cerca de 3,5% da população) na região de Barcelona, revelou um aumento significativo do número de aberrações cromossómicas na população em estudo, comparativamente com a população controlo (não utilizavam pesticidas) (Carbonell *et al.*, 1995). Este valor indica-nos que esta população está a sofrer as consequências da utilização de pesticidas, contudo, devido a não serem conhecidos qual ou quais os pesticidas que provocam os danos, não se pode inferir acerca do potencial de causar aberrações por parte do cimoxanil. No mesmo estudo foi verificada a actividade das enzimas do soro: plasma colinesterase (PChe), γ -glutamyltransferase (GGT), transaminase oxaloacética-glutâmica (SGOT), transaminase pirúvica-glutâmica (SGPT), verificando-se um pequeno aumento das actividades destas enzimas nos trabalhadores expostos aos pesticidas relativamente aos valores dos controlos; contudo, essas diferenças não são estatisticamente significativas para se poder dizer que o composto tóxico afecta as suas actividades (Carbonell *et al.*, 1995). Com isto também não se poderá dizer que os níveis destas enzimas são bons biomarcadores para a contaminação por este pesticida, ainda para mais tratando-se de uma mistura de pesticidas e não do pesticida em particular

A partir dos estudos descritos, as ilacções que se poderão retirar para o âmbito do presente trabalho são limitadas. No entanto, podemos sugerir que biomarcadores como as aberrações cromómicas e as enzimas do soro (plasma colinesterase (PChe), γ -glutamyltransferase (GGT), transaminase oxaloacética-glutâmica (SGOT), transaminase pirúvica-glutâmica (SGPT)) são passíveis de ser utilizados em projectos de avaliação de risco por contaminação por este pesticida.

8.2. Possíveis biomarcadores para o estudo da toxicidade exercida pelo composto tóxico propinebe no organismo *Procambarus clarkii*

Para o caso do propinebe, ao contrário do cimoxanil, já existem estudos publicados acerca de possíveis biomarcadores que poderão ser utilizados para estudar o grau de contaminação de diversos organismos por este pesticida. Um desses estudos teve como finalidade estudar o grau de acumulação e os efeitos histológicos provocados pela exposição a dois pesticidas organometálicos (propinebe e manebe) em rins de ratos fêmeas e dos seus fetos. Os resultados obtidos após 2 semanas de exposição a uma concentração de 400 ppm revelaram bastantes modificações histológicas, tanto nos fetos como na mãe, relativamente aos ratos controlo. Entre essas modificações, destaca-se o aparecimento de edema, degeneração das células, hemorragias graves, irregularidades nas estruturas dos túbulos renais e hiperplasia desses mesmos (Güven *et al.*, 1998). Pode portanto concluir-se que os danos histológicos são bons biomarcadores da contaminação por propinebe em ratos. No mesmo estudo é referido outro biomarcador que poderá ser utilizado para avaliar a toxicidade provocada pelo propinebe em animais, que é o peso corporal. Após exposição durante 2 semanas a 200 ppm e 400 ppm desse composto tóxico, verificou-se uma diminuição do peso corporal tanto das mães como dos filhos (Güven *et al.*, 1998). Existe também um estudo que nos refere um possível biomarcador usado para estudar a contaminação provocada pelos ditiocarbamatos (classe à qual pertence o propinebe) em crustáceos. Este estudo, da autoria de Fingerman *et al.* (1998), refere-nos que os ditiocarbamatos inibem a regeneração dos membros no camarão grama (*Palaemonetes pugio*). Esta inibição poderá ser usada como biomarcador da contaminação por propinebe no organismo do estudo em questão.

Mais uma vez, alguns estudos com a população humana podem ser importantes fontes de metodologias passíveis de serem utilizadas em análise ambiental. Foi efectuado um estudo numa população do Equador acerca da razão de causalidade entre o uso de pesticidas na região (entre os quais o propinebe) e o aumento do número de aberrações cromossómicas e de DNA na população humana, tendo-se verificado uma muito maior incidência destes parâmetros na população exposta do que na população controlo (Paz-y-Miño *et al.*, 2004). Apesar destas evidências, não se poderá inferir acerca da possibilidade do uso das aberrações tanto do DNA

como dos cromossomas como biomarcadores de toxicidade por propinebe em animais, devido ao facto de se tratarem de misturas de pesticidas e não do pesticida em particular. Contudo, isto poderá ser um ponto de partida para possíveis estudos acerca do assunto.

Através dos estudos descritos anteriormente, os únicos biomarcadores conhecidos que poderão ser utilizados para avaliar a toxicidade em seres vivos pelo composto tóxico propinebe são a inibição da regeneração dos membros, o peso corporal e os danos histológicos a nível renal. Destes, o que mais garantias dará de ser utilizado no animal em estudo é a inibição da regeneração dos membros, não sendo certo que o peso corporal e os danos histológicos possam ser utilizados para avaliar os efeitos decorrentes da ingestão de propinebe no organismo em estudo, devido a possíveis diferenças biológicas entre os organismos. Para se ter a certeza sobre a utilização destes biomarcadores de toxicidade para este composto tóxico na espécie *Procambarus clarkii* teriam de se fazer estudos *in vivo* com este pesticida isoladamente.

8.3. Possíveis biomarcadores para o estudo da toxicidade exercida pelo composto tóxico glifosato no organismo *Procambarus clarkii*.

Existem estudos que demonstram alterações metabólicas derivadas da acção do glifosato sobre os seres vivos, podendo a quantificação dessas alterações ser usada para determinar o grau de toxicidade a que esses organismos estão sujeitos (biomarcadores de toxicidade por glifosato). Apresentam-se a seguir alguns estudos acerca desses possíveis biomarcadores. Através de um estudo realizado em ratos fêmeas e seus fetos, acerca dos efeitos decorrentes da ingestão de glifosato a 1% durante 21 dias, podem-se verificar dois possíveis biomarcadores para a contaminação por glifosato. São eles o nível de TBARS (substâncias reactivas do ácido tiobarbitúrico - indicador de peroxidação lipídica), e o nível de GPx (glutathione peroxidase - enzima antioxidante). Os seus aumentos relativamente aos valores controlo levam-nos a crer que houve modificações biológicas nos ratos estudados devido ao composto tóxico; portanto, a quantificação destes representa bons biomarcadores da exposição a glifosato em ratos (Beuret *et al.*, 2004). Existem igualmente estudos acerca da capacidade do glifosato em inibir *in vitro* a actividade das enzimas alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST), lactato desidrogenase (LDH) e acetilcolinesterase (AChE) (Hernández *et al.*, 2006). Contudo, os

estudos *in vivo* não têm conseguido provar essas evidências. Um estudo realizado tentava provar a inibição da actividade de certas enzimas no peixe mosquito (*Gambusia yucatana*) por parte do pesticida glifosato; entre essas enzimas, encontrava-se a lactato desidrogenase (LDH), e a análise dos resultados provou que não havia alteração significativa na quantidade da enzima entre os animais expostos ao composto tóxico por longos períodos de tempo comparando com os organismos controlo (Osten *et al.*, 2004). Sendo assim, a actividade da lactato desidrogenase não será um bom biomarcador para avaliar a contaminação por glifosato no organismo estudado. Outros biomarcadores que anteriormente se pensava pudessem ser usados na quantificação da exposição a glifosato já se encontram praticamente fora de uso, devido aos resultados negativos já observados. São exemplos disso os níveis das enzimas Ca^{2+} -ATPase e das colinesterases, quantificados num estudo realizado nos gânglios nervosos do molusco *Phyllocaullis soleiformis* (Silva *et al.*, 2003), e os níveis de glutathione S-transferase (GST) demonstrado num estudo realizado nas guelras do peixe *Gambusia yucatana* (Osten *et al.*, 2004). Posto isto, pode concluir-se que os biomarcadores que oferecem mais garantias de utilização na espécie de crustáceo em estudo (*Procambarus clarkii*) são o nível de TBARS e o nível de GPx, pois para todos os outros não existem provas suficientes de que possam ser biomarcadores da toxicidade por glifosato. Contudo, mesmo estes biomarcadores terão de ser sujeitos a estudos mais aprofundados nomeadamente no próprio animal (*Procambarus clarkii*) e com concentrações mais baixas de composto tóxico, pois as respostas fisiológicas variam muito de animal para animal e de acordo com as concentrações em estudo.

8.4. Possíveis biomarcadores para o estudo da toxicidade exercida pelo chumbo no organismo *Procambarus clarkii*.

Pelo facto de o chumbo ser um agente que contactou com o ser humano ao longo de toda a história da civilização, existem vários estudos que nos permitem inferir acerca da toxicidade exercida pelo chumbo em humanos. Entre os possíveis biomarcadores da exposição humana a chumbo, podemos referir modificações a nível da qualidade do sêmen e modificações na condensação da cromatina do esperma. Isto ficou provado através de um estudo realizado numa população de homens da região de Lagunera (México), região altamente industrializada que possui das maiores indústrias de chumbo do mundo. Neste estudo verificou-se uma diminuição

do volume de esperma, um aumento da condensação da cromatina, uma diminuição da concentração do esperma, uma variação da morfologia do esperma e da sua viabilidade nos homens da região, relativamente a valores de referência (Hernández-Ochoa *et al.*, 2005). Todos estes parâmetros podem ser considerados bons biomarcadores da toxicidade por chumbo em seres humanos, uma vez que se verificam alterações significativas nas funções biológicas destes cidadãos pela exposição ao chumbo. Outros possíveis biomarcadores poderão ser a actividade da ácido-delta-aminolevulínico desidratase (ALAD) no sangue e a concentração de protoporfirina (EP) nos eritrócitos. Isto ficou demonstrado através de um estudo realizado na Croácia, em que trabalhadores expostos a chumbo durante 10 ou mais anos apresentavam um menor valor tanto da enzima ALAD como de protoporfirina (Telisman *et al.*, 2000). O nível de cálcio no plasma poderá ser usado para determinar o grau de contaminação por chumbo ao qual os organismos estão sujeitos, pois o principal mecanismo de toxicidade deste metal ocorre através da substituição do cálcio nos tecidos ósseos (Phyles, 2007). Um estudo efectuado na Nigéria, entre outras coisas, demonstrou isso mesmo, pois trabalhadores que estavam sujeitos a este metal evidenciavam um nível menor de cálcio no plasma do que os trabalhadores controlo (não sujeitos a qualquer tipo de exposição a chumbo) (Onunkwor *et al.*, 2004).

Encontra-se provado que o chumbo em elevada quantidade inibe a acção das enzimas dependentes da glutatona, entre as quais se encontra a glutatona S-transferase (GST), enzimas essas importantes na defesa do organismo contra o stress oxidativo (Onunkwo *et al.*, 2004). Estas isoenzimas podem ser assim consideradas bons biomarcadores da toxicidade por chumbo em animais.

Um estudo realizado no bivalve *Ruditapes philippinarum* revelou uma diminuição da actividade da enzima alanina aminotransferase (ALT) à medida que se aumentava a concentração de chumbo no local (350–700 $\mu\text{g/L}$) (Blasco e Pupo, 1999). Isto quer dizer que a alanina aminotransferase (ALT) poderá ser um bom biomarcador para a contaminação por chumbo no animal do estudo. Em locais próximos da Pateira de Fermentelos encontramos em diversos peixes concentrações de chumbo entre 0,04 e os 0,115 $\mu\text{g/g}$, como nos mostra a tabela nº2; através destes valores e dos valores dados por Blasco e Puppò (1999), concentrações na ordem dos 350–700 $\mu\text{g/L}$ para obter alterações no organismo (enzima ALT), é de supor que na Pateira de

Fermentelos não existem concentrações de chumbo significativas para causar efeitos tóxicos no organismo.

Após estes estudos, pode concluir-se que o biomarcador que oferece mais certezas relativamente à sua utilização no animal em estudo (*Procambarus clarkii*) é o nível da enzima ALT devido a ter sido efectuado o teste num organismo filogeneticamente não muito distante do organismo em estudo e devido ao facto de se tratar também de um organismo aquático. Outros possíveis biomarcadores são os níveis de glutathione S-transferase, ALAD e o nível de cálcio, apesar da distância filogenética entre o homem e o animal em estudo; a quantidade de sémén, bem como a sua qualidade, poderão não ser bons indicadores, devido ao facto do mecanismo sexual do animal ser bastante diferente do humano. Contudo, todos os possíveis biomarcadores teriam de ser confirmados no organismo em estudo e a concentrações baixas de composto tóxico, pois existem bastantes diferenças biológicas entre os vários animais estudados e o animal em estudo, e as concentrações variam muito a expressão das respostas.

8.5. Possíveis biomarcadores para o estudo da toxicidade exercida pelo cádmio no organismo *Procambarus clarkii*.

Existem vários biomarcadores descritos em estudos que nos permitem inferir acerca da toxicidade exercida pelo cádmio em animais, entre os quais se podem enumerar níveis de enzimas, peso corporal, defeitos a nível de DNA e RNA entre outros. Entre os biomarcadores que poderão ser usados para avaliar a toxicidade exercida pelo cádmio em animais podemos enumerar as actividades das enzimas $\text{Na}^+ \text{K}^+ \text{ATPase}$, como ficou demonstrado através de um estudo realizado nas brânquias de juvenis da espécie *Cyprinus carpio*, estudo este em que houve uma inibição da actividade destas enzimas por exposição ao metal tóxico (concentração de 1,6 mg/L durante 14 dias). Esta inibição terá um papel muito importante em termos de toxicidade, uma vez que esta enzima medeia o transporte activo de Na^+ e K^+ , sendo que a sua inibição irá desencadear uma perturbação a nível da osmoregulação (De la Torre *et al.*, 1999). Sendo assim, esta enzima é um bom biomarcador de toxicidade por cádmio no animal *Cyprinus carpio*. Um estudo efectuado no gastrópode marinho *Nassarius festivus* demonstrou vários biomarcadores passíveis de serem utilizados em organismos na avaliação da toxicidade decorrente da exposição a cádmio

(concentrações na ordem das mg/L), sendo os biomarcadores utilizados o crescimento potencial (SfG), variação de peso, variação de tamanho e a variação na proporção RNA/DNA. Verificaram-se alterações significativas em todos estes parâmetros (Wo *et al.*, 1999), o que demonstra a possível utilização destes como biomarcadores de toxicidade para este organismo. Outros possíveis biomarcadores passíveis de serem usados na determinação da toxicidade causada pelo cádmio sobre animais são o nível de metalotioneínas e de algumas enzimas muito importantes no mecanismo de defesa antioxidante contra compostos tóxicos, tais como a superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx) e a glutathione reduzida (GSH). Isto pode ser demonstrado através de um estudo em que se avaliou essas alterações nas brânquias e no hepatopâncreas do crustáceo *Charybdis japonica* sujeitos a concentrações de 0,025 e 0,05 mg/L de cádmio durante um período de 15 dias, obtendo-se variações significativas em todos os parâmetros estudados (Pan *et al.*, 2006). Sendo assim, estes poderão ser utilizados como biomarcadores para a toxicidade provocada pelo cádmio neste organismo. Um estudo realizado no crustáceo *Daphnia magna* revelou outros possíveis biomarcadores para a contaminação por cádmio, sendo eles o crescimento e a taxa de reprodução. Um aumento de concentração de cádmio (concentrações entre os $0,1 \times 10^{-8}M$ e os $4,0 \times 10^{-8}M$) causou uma diminuição significativa destes parâmetros em *D. magna*, (Baillieul *et al.*, 2005). Contudo, os estudos que oferecem mais garantias de possíveis biomarcadores para o animal em estudo, são aqueles que são efectuados ou no próprio animal ou em animais filogeneticamente próximos. O nível de açúcar no sangue, a taxa de eclosão de ovos e a taxa de fecundação poderão ser usados como biomarcadores para a exposição a cádmio no organismo *Procambarus clarkii*. Os dados descritos por Fingerman *et al.* (1998) mostraram que a exposição do lagostim em estudo ao cádmio causou um aumento no primeiro e diminuições no segundo e terceiros parâmetros. Após estes estudos, poderá dizer-se que os biomarcadores que mais possibilidades de sucesso para avaliar os efeitos do metal cádmio no crustáceo *Procambarus clarkii* serão o nível de açúcar no sangue, taxa de eclosão e a fecundidade. Pode também sugerir-se o emprego do crescimento, da taxa de reprodução, o nível de metalotioneínas e das enzimas SOD, CAT, GPx e GSH, as variações de SfG (taxa de crescimento potencial), o peso, o tamanho, a relação RNA/DNA e as enzimas $Na^+ K^+ ATPase$. No entanto, será necessário realizar testes com o próprio animal e a diversas concentrações de metal tóxico para aferir da real possibilidade de utilizar estes biomarcadores para avaliação da toxicidade do cádmio veiculado por via ambiental.

De acordo com os valores encontrados por Baillieul *et al.* (2005) e atendendo às concentrações deste metal verificadas em peixes provenientes de locais próximos da Pateira de Fermentelos, como nos mostra a Tabela 2 (concentrações entre $0,1 \times 10^{-8}$ M e $4,0 \times 10^{-8}$ M), não será de crer que este metal se encontre neste local em concentrações capazes de causar efeitos adversos nos animais da Pateira, entre os quais o *Procambarus clarkii*.

IX. Depuração

Segundo Lemaire e Lemaire (1975) a depuração ou purificação de um corpo ou substância por processo natural é um “processo biológico natural de depuração dos poluentes orgânicos de um meio aquático”. Dependente dos microrganismos presentes (bactérias, algas, fungos, protozoários), das possibilidades de oxigenação e reoxigenação, da atmosfera e da luz (fotossíntese)”. A depuração consiste em colocar pescado em recipientes durante um determinado período de tempo sujeitos a água corrente. Esta tem como principal objectivo a limpeza do tracto digestivo e da parte exterior do organismo (Ferreira *et al.*, 2003), possibilitando a eliminação de tóxicos existentes. Segundo o Centro de Ciências Agrárias da Universidade de Santa Catarina (CCAUFSC, 2003) o tempo de depuração está muito dependente do que se pretende depurar, existindo alguns componentes que são de difícil depuração como os metais pesados, biotoxinas, hidrocarbonetos e vírus. A depuração pode ser de dois tipos: natural ou artificial. O processo natural baseia-se somente na transferência dos animais de locais onde exista menor qualidade de água para locais de boa qualidade; a depuração artificial é efectuada numa estação depuradora com fluxo de contínuo de água esterilizada (CCAUFSC, 2003). Os crustáceos, para além de poderem depurar a quantidade de tóxico existente no organismo através dos tecidos moles, possuem um mecanismo muito eficaz de depurar muitos tóxicos que é através da sua muda de exoesqueleto. Este mecanismo torna-se particularmente vantajoso no caso de alguns metais. Isto pode ser demonstrado através de um estudo em dois locais dos Estados Unidos (um muito industrializado, Piles Creek e outro pouco industrializado, Tuckerton), efectuada no organismo *Uca pugnax* durante o qual foram estudados os níveis de zinco, cobre e chumbo antes e depois da muda de exoesqueleto como nos mostra a tabela abaixo (Bergey e Weise, 2007).

Tabela nº6 – Concentração de metais nos tecidos de *Uca pugnax* (Fonte: Bergey e Weise, 2007)

<u>Antes da muda</u>	Piles Creek n=18		Tuckerton n=18	
	Tecidos moles (µg/g)	Carapaça (µg/g)	Tecidos moles (µg/g)	Carapaça (µg/g)
Cobre	639,69	152,7	518,9	136,66
Chumbo	41,37	41,28	20,36	27,03
Zinco	165,78	46,58	149,85	46,64
<u>Depois da muda</u>	Piles Creek n=25		Tuckerton n=20	
	Tecidos moles (µg/g)	Exuvium (µg/g)	Tecidos moles (µg/g)	Exuvium (µg/g)
Cobre	306,46	78,53	194,37	16,72
Chumbo	18,31	129,81	11,46	33,07
Zinco	133,30	79,63	108,75	25,63

Através destes resultados pode-se concluir que o organismo em estudo (*Uca pugnax*) depura muita quantidade de chumbo, dando-se essa depuração essencialmente através da muda de exoesqueleto, verificando-se passagem de tóxico de locais interiores do organismo para a casca. Um estudo realizado por Kahle e Zauke (2001) no animal *Metridia gerlachei* da região da Antártida veio demonstrar essa capacidade dos crustáceos depurarem chumbo, bem como a dos mesmos depurarem igualmente cádmio, como se pode ver pelas figuras abaixo.

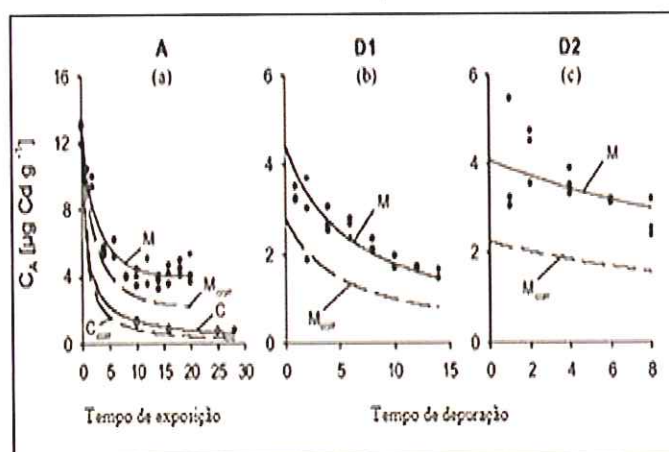


Figura nº 9 – Exposição e depuração (D1-14 dias de depuração após 10 dias de exposição, D2-8 dias de depuração após 20 dias de exposição) de cádmio por parte do animal *Metridia gerlachei* (Kahle e Zauke, 2001).

Avaliação dos Efeitos Toxicológicos Decorrentes do Consumo Humano de Lagostim Vermelho da Louisiana (*Procambarus clarkii*).

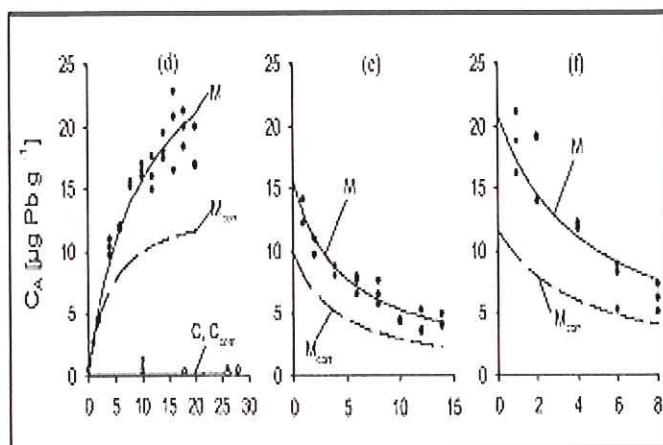


Figura nº10 – Exposição e depuração (D1-14 dias de depuração após 10 dias de exposição, D2-8 dias de depuração após 20 dias de exposição) de chumbo por parte do animal *Metridia gerlachei* (Kahle e Zauke, 2001).

Apesar de não se possuir estudos acerca da capacidade de crustáceos depurarem os pesticidas em estudo (nem qualquer outro tipo de pesticidas), existem estudos em outros animais marinhos que nos poderão dar informação acerca dessa possibilidade. Entre estes pode enunciar-se um estudo realizado sobre um grupo de tainhas (*Mugil cephalus*) existentes no rio Douro, acerca da sua capacidade de depurarem PCBs (Bifenilos Policlorados) e DDTs (Diclorodifeniltricloroetanoanos). Estando os dados dessa depuração na tabela abaixo.

Tabela nº7 – Concentrações (ng/g^{-1}) de organoclorados nos músculos e fígado do grupo de tainhas durante o tempo de estudo (270 dias) (Fonte: Antunes *et al.*, 2004).

Compostos	Tempo de depuração (dias)				Tempo de depuração (dias)			
	Músculo				Fígado			
	0	21	120	270	0	21	120	270
□ PCBs	311	821	88	49	686	870	259	503
p,p'- DDE	40	55	29	11	81	79	79	123
p,p'- DDD	8,3	14	5,0	1,2	30	25	12	18
p,p'- DDT	17	23	7,4	0,5	3,4	4,0	20	14
□ DDTs	65	106	41	13	115	108	111	153

Apesar de este estudo ter sido feito num animal filogeneticamente bastante diferente do animal em estudo, poderá se transpor algumas ilações deste, devido essencialmente aos seus mecanismos de eliminação de tóxicos serem bastante idênticos. No animal estudado ocorreu bastante eliminação de PCBs e DDTs; contudo, esta eliminação não se deu logo após o início da depuração, mas sim a partir dos 120 dias e essencialmente a nível dos músculos, não se dando praticamente nenhuma através do fígado. Atendendo a isto será de supor que o organismo *Procambarus clarkii*, eliminará grande quantidade de pesticidas, pois para além da eliminação efectuada nos músculos, é de crer que tal como alguns metais haja grande eliminação através da muda de exoesqueleto.

Através de todos estes resultados é de supor que o organismo *Procambarus clarkii* existente na Pateira de Fermetelos, caso fosse sujeito a um processo de depuração durante um tempo relativamente longo, seria capaz de eliminar a maioria dos tóxicos por ele acumulados, passando a não constituir risco para a espécie humana decorrente do seu consumo. Assim, pode-se concluir que a ingestão de animais por seres humanos que não estejam sujeitos a um processo de depuração representa um risco potencial de toxicidade, relativamente à ingestão de animais que estejam sujeitos a esse processo.

X. Metodologias usadas actualmente para a detecção dos diversos contaminantes

Apesar das quantidades de alguns dos contaminantes estudados tanto nos locais de captura como nos próprios organismos serem já importantes do ponto de vista toxicológico, e por isso ser necessária a sua determinação, tais quantidades ainda não são suficientemente elevadas para poderem ser determinadas, do ponto de vista das metodologias analíticas convencionais de determinação, sendo necessários métodos analíticos com elevada precisão e baixo limite de detecção para os determinar com eficácia. Assim, ao longo dos tempos tentaram-se desenvolver métodos cada vez mais avançados do ponto de vista destes requisitos. Encontram-se descritos na literatura vários métodos para a determinação dos pesticidas e dos metais em estudo, em diversas matrizes (água, frutos e vegetais), não existindo contudo estudos referenciados da determinação destes contaminantes em animais, sendo por isso algo difícil a transposição com certezas desses resultados para os casos em questão.

10.1. Possíveis metodologias a serem usadas na determinação do cimoxanil em amostras do crustáceo *Procambarus clarkii*.

Existem vários métodos descritos para a determinação do pesticida cimoxanil em diversas matrizes, baseados essencialmente em técnicas de cromatografia gasosa (GC) e de cromatografia líquida (LC), variando o método de acordo com o tipo de extração e solvente utilizado, assim como com o tipo de detector utilizado.

Uma das metodologias que poderá ser utilizada na determinação de cimoxanil encontra-se descrita por Gelsomino *et al.* (1997), que combina a técnica de GC-ECD (cromatografia gasosa com detecção por captura de electrões) com GC-MS (cromatografia gasosa com detecção por espectroscopia de massa). De referir que neste estudo não foi determinado o cimoxanil isoladamente mas sim numa mistura de pesticidas existentes nas uvas, pelo que a interacção dos vários pesticidas na mistura condiciona a detecção e os tempos de retenção de cada um.

Outras metodologia que poderá ser usada na determinação do cimoxanil encontra-se descrita por Hengel e Shibamoto (2001), tendo sido usada na determinação deste pesticida em uvas através de um método sequencial que incluía cromatografia de permeação em gel (GPC), extração em fase sólida (SPE) e cromatografia gasosa (GC), com a detecção a ser feita através de um detector fósforo/azoto (NPD), um tipo especial de detector que responde selectivamente, e de forma linear, a compostos orgânicos que contenham azoto e/ou fósforo. Este detector (NPD) responde ainda a hidrocarbonetos normais, com uma intensidade cerca de 100000 vezes menor do que a compostos contendo azoto ou fósforo. Devido à sua selectividade e sensibilidade o detector NPD é geralmente usado para a detecção de pesticidas, herbicidas e drogas de abuso. No mesmo estudo é ainda referido que poderá ser usado também na determinação do cimoxanil cromatografia líquida de alta performance com multicoluna multidireccional (MC-HPLC) com detecção por UV, fornecendo contudo piores resultados em termos de limite de detecção e de resolução do cromatograma (mais complexo), mas igualmente com uma boa sensibilidade e tempo de análise.

Um dos métodos analíticos mais aceites e utilizados por muitos laboratórios na determinação de cimoxanil e de outros pesticidas em amostras de água, é a técnica de cromatografia líquida com detecção por espectrometria de massa (*Tandem mass spectrometry*, MS/MS) com extracção em fase sólida (SPE); esta técnica permite determinações com elevada sensibilidade, confiança e rapidez usando apenas uma pequena quantidade de amostra. Outros autores referem ainda uma outra técnica ainda mais avançada em termos de resolução de cromatograma, maior rapidez de análise e maior sensibilidade: trata-se da cromatografia líquida de alta performance acoplada a detectores MS/MS (Rodrigues *et al.*, 2007).

Através dos resultados emanados destes estudos e publicados na literatura da especialidade é de sugerir que o método que oferece mais garantias em termos da determinação do pesticida em estudo (cimoxanil) numa amostra do organismo *Procambarus clarkii* é a cromatografia líquida (LC), pois para além de ser um dos métodos mais avançados é o único método estudado para o pesticida isoladamente. É de supor também que o método de detecção que mais garantias dá de ser utilizado é a espectrometria de massa tandem (MS/MS), pois é o método actualmente mais aceite, como se pode ver nos estudos mais recentes.

10.2. Possíveis metodologias a serem usadas na determinação do propinebe em amostras do crustáceo *Procambarus clarkii*.

As metodologias tradicionais de detecção deste pesticida baseavam-se na hidrólise ácida do propinebe na presença de cloreto de estanho resultando na libertação do bissulfito de carbono (CS₂), sendo este posteriormente determinado por diversas técnicas, tais como espectrofotometria ou por cromatografia gasosa (GC). Mais recentemente têm sido utilizadas nessa determinação técnicas sem degradação do propinebe, como o HPLC com detecção por UV ou com detecção electroquímica, voltametria de redissolução anódica de pulso diferencial ou a cromatografia líquida com detector de massa (Kazos *et al.*, 2007).

A metodologia estudada por Kazos *et al* (2007) baseia-se na hidrólise pelo método tradicional com formação de CS₂ seguido da determinação por cromatografia gasosa com

detecção por espectroscopia de massa (GC-MS). De acordo com estes autores, este método é rápido, simples e sensível para a determinação destes contaminantes nas amostras que os contêm.

Através destes indícios será difícil determinar qual o método que oferece mais garantias de ser utilizado devido à escassez de resultados, contudo será de supor que a técnica de GC-MS poderá ser uma boa escolha devido a ser uma técnica rápida e muito sensível, contudo ter-se-ia que ter em atenção na escolha de método, a adequação ao tipo de amostra a analisar.

10.3. Possíveis metodologias a serem usadas na determinação do glifosato em amostras do crustáceo *Procambarus clarkii*.

Ao longo dos tempos têm surgido diversas técnicas para se proceder à determinação do glifosato nas mais variadas amostras. Começou-se com técnicas em que era necessária pré-concentração como cromatografia gasosa (GC) e HPLC com a detecção a ser feita por UV ou MS (espectroscopia de massa) (Cartigny *et al.*, 2008), passando pela Electroforese capilar (CE), ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay) (Guo *et al.*, 2005) e cromatografia líquida (LC) com detecção a ser feita por espectroscopia de massa (MS) (Ghanen *et al.*, 2007) ou por fluorescência (FD) (Hidalgo *et al.*, 2004). Mais recentemente surgiu a cromatografia iónica acoplada a espectrometria de massas com uma fonte de plasma indutivamente acoplado (IC-ICP-MS) (Guo *et al.*, 2005) e a espectroscopia de ressonância magnética nuclear (NMR) (Cartigny *et al.*, 2008).

As técnicas de GC, HPLC (Cartigny *et al.*, 2007) e LC (Ghanen *et al.*, 2007) começaram a cair em desuso devido à baixa sensibilidade devido essencialmente à necessidade de processos de pré-concentração e de derivatização que são necessários. Processos como ELISA e métodos electroforéticos não são muito usados devido aos custos elevados e aos testes não se encontrarem facilmente disponíveis no caso da ELISA e às baixas sensibilidades conseguidas devido ao pequeno volume de amostra injectado no caso dos métodos electroforéticos (Guo *et al.*, 2005). Sendo assim os métodos que oferecem mais garantias de serem utilizados na determinação do teor em glifosato em amostras é a cromatografia iónica (IC) (Guo *et al.*, 2005) e a espectroscopia

de ressonância magnética (NMR) (Cartigny *et al.*, 2008) devido a serem métodos selectivos e sensíveis sem necessitarem de derivatização e/ou pré-concentração da amostra.

Assim, no caso de amostras do crustáceo em estudo, os métodos que oferecerão mais garantias de poderem ser utilizados com maior eficácia na determinação do pesticida (glifosato) serão a cromatografia iónica acoplada a espectrometria de massas com uma fonte de plasma indutivamente acoplado (IC-ICP-MS) e a espectroscopia de ressonância magnética nuclear (NMR), tendo que se ter em atenção na escolha da técnica as especificidades da amostra a analisar.

10.4. Possíveis metodologias a serem usadas na determinação do chumbo em amostras do crustáceo *Procambarus clarkii*.

Várias técnicas têm sido utilizadas na determinação do metal chumbo em amostras, entre essas técnicas as mais utilizadas ao longo dos tempos foram as técnicas voltamétricas, potenciométricas, ICP e as espectrofotométricas (sendo estas as mais usadas actualmente).

As técnicas voltamétricas requerem uma mineralização completa da amostra de forma a eliminar todos os seus interferentes, sendo assim muito laboriosas (Dessuy *et al.*, 2008). As técnicas potenciométricas apresentam como grande vantagem em relação às voltamétricas a não necessidade de grandes quantidades de amostra para se proceder à determinação (Dessuy *et al.*, 2008), contudo estas não são as técnicas mais utilizadas na determinação de metais devido a haver muita oscilação de potencial durante a determinação, não se conseguindo determinações muito precisas (Couto e Montenegro, 2000).

Tanto a espectrometria de massa com plasma acoplado indutivamente (ICP-MS) como a espectrometria de emissão óptica com plasma acoplado indutivamente (ICP-OES) possuem graves problemas na sua utilização, no caso da detecção por MS devido ao custo de análise, no caso da detecção por OES devido à baixa sensibilidade (Dessuy *et al.*, 2008).

De entre as técnicas espectrofotométricas são usadas essencialmente três técnicas: espectroscopia de absorção atômica por chama (FAAS), espectroscopia de absorção atômica com atomização electrotérmica (ETAAS) e a espectroscopia de absorção atômica em câmara de grafite (GFAAS). A FAAS é uma técnica muito usada nas amostras de vinho (Dessuy *et al.*, 2008), tratando-se de uma técnica simples e de baixo custo (Aleixo *et al.*, 2004), que apresenta contudo uma sensibilidade baixa (Dessuy *et al.*, 2008) estando o limite de detecção do aparelho geralmente abaixo dos valores encontrados nas amostras (Aleixo *et al.*, 2004). A técnica GFAAS é uma das técnicas mais usadas para a determinação em amostras de alimentos contaminados, tratando-se de uma técnica muito sensível e de fácil execução (Aleixo *et al.*, 2004). A técnica que se encontra descrita que oferece mais garantias de ser utilizada nas mais variadas amostras contendo chumbo é a técnica de espectroscopia de absorção atômica com atomização electrotérmica (ETAAS) possuindo esta como principais vantagens a sua elevada sensibilidade, a boa tolerabilidade das matrizes (Dessuy *et al.*, 2008) e a sua capacidade de requerer apenas uma pequena quantidade de amostra (reduzindo em muito as possibilidades de contaminação) (Jurado *et al.*, 2006).

Assim, as técnicas que poderão oferecer melhores resultados na determinação do metal em estudo nos tecidos do animal *Procambarus clarkii* serão as técnicas de espectroscopia de absorção atômica em câmara de grafite e a espectroscopia de absorção atômica com atomização electrotérmica.

10.5. Possíveis metodologias a serem usadas na determinação do cádmio em amostras do crustáceo *Procambarus clarkii*

Encontram-se diversas técnicas descritas para a determinação de cádmio em amostras, entre estas pode-se enumerar a Voltametria, cromatografia iónica (Jurado *et al.*, 2006), métodos ICP (ICP-MS e ICP-OES), espectroscopia de absorção atômica com atomização electrotérmica (ETAAS) (Farinas *et al.*, 2007), método de activação de iões (NAA), espectroscopia de absorção atômica por chama (FAAS) (Pourreza e Mousavi, 2004) e a espectroscopia de absorção atômica em câmara de grafite (GFAAS) (Hernandez-Caraballo *et al.*, 2003).

De entre estas técnicas tal como já foi referido anteriormente algumas destas técnicas praticamente não são utilizadas como é o caso das ICP-MS e as NAA devido ao elevado preço de análise, apesar de possuírem elevada selectividade e sensibilidade (Pourreza e Mousavi, 2004), a ICP-OES (Farinas *et al.*, 2007) e a FAAS (Pourreza e Mousavi, 2004) devido ao facto de não serem suficientemente sensíveis e ao baixo limite de detecção (necessidade de técnicas de pré-concentração e separação).

Posto isto, as técnicas mais usadas na determinação do cádmio são a ETAAS e a GFAAS. As ETAAS destacam-se da maioria das outras técnicas devido à sua simplicidade de utilização, sensibilidade elevada, especificidade (Farinas *et al.*, 2007) e pouco tempo para a determinação (Jurado *et al.*, 2004), contudo este método apresenta algumas limitações entre as quais se destacam a interferência de aniões e catiões e a perda de analitos por volatilização. A técnica GFAAS também é uma técnica de excelência na análise de cádmio sendo usada em muitíssimas análises, sendo um método rápido, simples e de confiança (Hernandez-Caraballo *et al.*, 2003).

Através destas evidências, tal como acontece no caso do chumbo, os métodos que oferecem mais garantias de poderem ser utilizados na determinação de cádmio nos tecidos do animal em estudo são a espectroscopia de absorção atómica em câmara de grafite (GFAAS) e a espectroscopia de absorção atómica electrotérmica (ETAAS).

XI. Conclusão

Através deste trabalho de pesquisa bibliográfica foi possível constatar que o lagostim vermelho da Louisiana pode constituir um vector de contaminação para as populações humanas que dele se alimentam, nomeadamente no caso dos metais pesados estudados (cádmio e chumbo), devido ao facto de estes serem muito e facilmente acumuláveis pelo animal em estudo. Para o caso dos pesticidas estudados (cimoxanil, propinebe e glifosato) não foi possível tirar conclusões acerca dessa possibilidade, pois os estudos existentes na bibliografia não foram efectuados no próprio animal, nem com os pesticidas em estudo. Assim, e em função dos resultados referidos, só se poderá falar em meras possibilidades. Assim, poderá dizer-se que as populações humanas que se alimentam destes organismos capturados na Pateira de Fermentelos, poderão estar a acumular principalmente metais pesados, e eventualmente pesticidas. Através da análise dos resultados existentes para os pesticidas estudados, poderá dizer-se que, caso ocorram intoxicações pelos pesticidas Milraz[®] e Roundup[®], poderão surgir alguns problemas de saúde em humanos. Estas consequências serão importantes principalmente se esta ingestão se der de forma continuada. No caso da mistura Milraz[®], a sua toxicidade deve-se essencialmente ao pesticida propinebe, pois este exhibe uma toxicidade bastante pronunciada mesmo em baixas doses (ex.: problemas a nível da tiróide, reprodução e vários tipos de cancro). Nesta mistura (cimoxanil + propinebe) a toxicidade referente ao pesticida cimoxanil é negligenciável quando comparada com a do propinebe; contudo, este composto, devido à sua facilidade em atravessar membranas, poderá causar toxicidade a nível neurológico. O pesticida Roundup[®] (glifosato), aparentemente devido à sua rápida excreção, não acarretará muitos problemas para a população que se alimenta do organismo. No entanto, podem surgir diversos tipos de cancro, mutações ou problemas a nível reprodutivo. Relativamente aos metais estudados, estes poderão também levantar alguns problemas de toxicidade para as populações que se alimentam do organismo *Procambarus clarkii*. O chumbo exerce toxicidade mesmo em baixas doses, logo a ingestão deste metal através da alimentação poderá já ser suficiente para desencadear toxicidade. Essa toxicidade é agravada devido à elevada taxa de acumulação a nível dos tecidos moles (principalmente rim e cérebro), podendo por vezes essa acumulação resultar em fenómenos carcinogénicos. No caso da ingestão deste metal se dar por parte de crianças e grávidas, deveremos estar particularmente atentos a possíveis efeitos que daí poderão advir. O cádmio, tal como o chumbo, poderá também causar

graves problemas de saúde, principalmente em indivíduos que façam uma alimentação frequente com alimentos contendo resíduos de cádmio, pois este exerce seus efeitos principalmente por via cumulativa (altamente persistente no organismo), dando-se esses efeitos essencialmente a nível dos rins, fígado e sistema reprodutivo. Assim, e atendendo às quantidades relativamente elevadas dos metais chumbo e cádmio existentes nas zonas confluentes da Pateira de Fermentelos, a ingestão do animal *Procambarus clarkii*, poderá já ser encarada como danosa para a saúde pública. Quanto ao caso dos pesticidas, não existem dados sólidos para se inferir acerca dessa possibilidade. O ideal será fazer determinações no próprio animal, por intermédio da utilização de diversas metodologias e diversos biomarcadores.

O risco que representa a ingestão deste animal pelo ser humano pode ser avaliado pela determinação experimental dos níveis dos tóxicos nos organismos dos animais a consumir, bem como as alterações fisiológicas causadas pela presença dos mesmos resíduos (biomarcadores). Para isso existem determinadas metodologias laboratoriais para a quantificação dos resíduos de metais e pesticidas nos tecidos edíveis, bem como dos efeitos decorrentes. Como método de determinação para o cimoxanil poderá ser usada a cromatografia líquida com detecção por espectroscopia de massa (LC-MS), e como biomarcadores as aberrações cromossomais, bem como os níveis de algumas enzimas (PChe, GGT, SGOT, SGTP) do soro. No caso do propinebe, poderá ser usada como metodologia de determinação a cromatografia gasosa com detecção por espectroscopia de massa (GC-MS) e como biomarcador a inibição da regeneração dos membros. Por fim, para o último pesticida em questão, o glifosato, poderá usar-se como metodologia de determinação a espectroscopia de massa com plasma indutivamente acoplado (IC-ICP-MS) ou a espectroscopia de ressonância magnética nuclear (NMR), e como biomarcadores poderá se escolher a avaliação da peroxidação lipídica (TBARS) ou da glutathiona peroxidase (GPx). Para o caso dos metais os métodos de detecção são semelhantes: espectroscopia de absorção em câmara de grafite (GFAAS). O biomarcador preconizado para o caso do chumbo será a actividade da enzima ALT (alanina aminotransferase), e para o cádmio, poder-se-á utilizar a avaliação do nível de açúcar no sangue, a taxa de eclosão ou de fecundidade.

Bibliografia

- Ahmad, I., Pacheco, M., Santos, M.A. (2006). *Anguilla anguilla* L. oxidative stress biomarkers: An in situ study of freshwater wetland ecosystem (Pateira de Fermentelos, Portugal). *Chemosphere* 65, 952-962.
- Ahmed, M., Kaleem, M., Siddiqui, J. (2007). Environmental lead toxicity and nutritional factors. *Clinical Nutrition*, 400-408.
- Aina, R., Labra, M., Fumagalli, P., Vannini, C., Marsoni, M., Cucchi, U., Bracale, M., Sgorbati, S., Citterio, S. (2006). Thiol-peptide level and proteomic changes in response to cadmium toxicity in *Oryza sativa* L. roots. *Environmental and Experimental Botany*, 381-392.
- Alcorlo, P., Otero, M., Crehuet, M., Baltanás, A., Montes, C. (2006). The use of the red swamp crayfish (*Procambarus clarkii*, Girard) as indicator of bioavailability of heavy metals in environmental monitoring in the River Guadiana (SW, Spain). *Science of the Total Environment* 366, 380-390.
- Aleixo, P., Júnior, D., Tomazelli, A., Rufini, I., Berndt, H., Krug, F. (2004). Cadmium and lead determination in foods by beam injection flame furnace atomic absorption spectrometry after ultrasound-assisted sample preparation. *Analytica Chimica Acta* 512, 329-337.
- Anastácio, P. (1993). Ciclo biológico e produção do lagostim vermelho da Louisiana (*Procambarus Clarkii*) na região do baixo Mondego. Tese de mestrado. Departamento de Zoologia da Universidade Coimbra .
- Anderson, M.B., Reddy, P., Preslan, J., Fingerman, M., Bollinger, J., Jolibois, L., Maheshwarudu, G., George, W. (1997). Metal Accumulation in Crayfish, *Procambarus clarkii*, Exposed to a Petroleum-Contaminated Bayou in Louisiana. *Ecotoxicology And Environmental Safety* 37, 262-272.
- Antunes, P., Gil, O., Ferreira, M., Vale, C., Henriques, M. (2004). Depuration of PCBs and DDTs in mullet under captivity conditions. *Chemosphere* 68, S58-64.
- Araújo, A., Monteiro, R., Abarkeli, R. (2003). Effect of glyphosate on the microbial activity of two Brazilian soils. *Chemosphere* 52, 799-804.
- Baillieul, M., Smolders, R., Blust, R. (2005). The effect of environmental stress on absolute and mass-specific scope for growth in *Daphnia magna* Strauss. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 140(3-4), 364-373.
- Barbaresi, S., Gherardi, P. (2000). The invasion of the alien crayfish *Procambarus clarkii* in Europe, with particular reference to Italy. *Biological Invasions* 2, 259-264.
- Barciszewska, M.Z., Szymanski, M., Wyszko, E., Pas, J., Rychlewski, L., Barciszewski, J. (2004). Lead toxicity through the leadzyme. *Mutation Research* 589, 103-110.

- Bayer CropScience (2004). [Em linha] Disponível em: http://www.bayercropscience.com.au/products/resources/msds/Antracol_MSDS_1107.pdf [consultado em 10/09/07].
- Bergey, L., Weis, J. (2007). Molting as a mechanism of depuration of metals in fiddler crab, *Uca pugnax*. *Marine Environmental Research* 64, 556–562.
- Beuret, C., Zirulnik, F., Giménez, M. (2004). Effect of herbicide glyphosate on liver peroxidation in pregnant rats and their fetuses. *Reproductive Toxicology* 19, 501-504.
- Bi, X., Feng, X., Yang, Y., Qiu, G., Li, G., Li, F., Liu, T., Fu, Z., Jin, Z. (2006). Environmental contamination of heavy metals from zinc smelting areas in Hezhang Country, western Guizhou, China. *Environment International* 32, 883–890.
- Blasco, j., Puppo, J. (1999). Effect of heavy metals (Cu, Cd and Pb) on aspartate and alanine aminotransferase in *Ruditapes philippinarum* (Mollusca: Bivalve). *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology* 122 (2), 253-263.
- Bolognesi, C. (2003). Genotoxicity of pesticides: a review of human biomonitoring studies. *Mutation Research* 543, 251-272.
- Caldas, E.D., Kenupp, L.C., Souza, R. (2000). Avaliação do risco crônico da ingestão de resíduos de pesticidas na dieta brasileira. *Revista de saúde pública* 34, 529-537.
- Carbonell, E., Valbuena, A., Xamena, N., Creus, A., Marcos, R. (1995). Temporary variations in chromosomal aberrations in a group of agricultural workers exposed to pesticides. *Mutation Research* 344, 127-134.
- Cardoso, L., Chasin, A. (2001). Ecotoxicologia de cádmio e seus compostos. Série de cadernos de Referência ambiental v.6.
- Cartigny, B., Azaroual, N., Imbenotte, M., Mathieu, D., Parmentier, E., Vermeersch, G., Lhermitte, M. (2008). Quantitative determination of glyphosate in human serum by ¹H NMR spectroscopy. *Talanta* 74, 1075–1078.
- CCA UFSR (2003). Pescados processados: Maior vida de prateleira e maior valor agregado [Em linha] Disponível em: www.cca.ufsc.br. [consultado em 16/2/08].
- Chia, S-E., Huijin, Z., Theng T.M., Yap, E. (2007). Possibilities of newer ALAD polymorphism influencing human susceptibility to effects of inorganic lead on the neurobehavioral function. *NeuroToxicology* 28(2), 312 – 317.
- Chinni, S., Khan, R.N., Yallapragada, P.R. (2000). Acute toxicity of lead on tolerance, Oxygen Consumption, Ammonia-N excretion, and, Metal Accumulation in *Pennaeus indicus* Postlarvea. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 51, 79-84.

- Cid, B.P., Boia, C., Pombo, L., Rebelo, E. (2001). Determination of trace metals in fish species of the Ria de Aveiro (Portugal) by electrothermal atomic absorption spectrometry. *Food Chemistry* 75, 93–100.
- Cimoxanil; Notice of filling a Pesticide Petition to Establish Tolerance for a Certain Pesticide Chemical in or on Food (2003). *Federal Register* 68, 9660-9666.
- Cornell University (2003). [Em linha] Disponível em: http://pmep.cce.cornell.edu/profiles/fung-nemat/aceticacid-etridiazole/cymoxanil/cymoxanil_reg_105.html [consultado em 02/08/07].
- Correia, A. (2002). Niche breadth and trophic diversity: feeding behavior of the red swamp crayfish (*Procambarus Clarkii*) towards environmental availability of aquatic macroinvertebrates in a rice field (Portugal). *Acta Oecologica* 23, 421–429.
- Correia, A.(2003). Food choice by introduced crayfish *Procambarus clarkii*. *Annales Zoologici Fennici* 40, 517-528.
- Coutinho, C., Mazo, L. (2005). Complexos metálicos com o herbicida glifosato. *Química Nova* 28, 1038-1045.
- Cox, C. (2000). [Em linha] Disponível em: <http://www.mindfully.org/Pesticide/Roundup-Glyphosate-Factsheet-Cox.htm> [consultado em 06/01/08].
- Couto, C., Montenegro, C. (2000). Detectores potenciométricos para sistemas de análise por injeção em fluxo, evolução e aplicação. *Química Nova* 23, 774-784.
- De la Torre, F., Salibián, A., Ferrari, L. (1999). Biomarkers assessment in juvenile *Cyprinus carpio* exposed to waterborne cadmium. *Environmental Pollution* 109, 277-282.
- Dessuy, M.B., Vale, M.V., Anderson, Souza, A.S., Ferreira, S.L., Welz, B., Katskov, D.A. (2008). Method development for the determination of lead in wine using electrothermal atomic absorption spectrometry comparing platform and filter furnace atomizers and different chemical modifiers. *Talanta* 74, 1321–1329.
- European Commission (2003). [Em linha] Disponível em: http://ec.europa.eu/food/plant/protection/evaluation/existactive/list1-34_en.pdf [consultado em 05/09/07].
- European Commission (2002). [Em linha] Disponível em: http://ec.europa.eu/food/fs/ph_ps/pro/eva/existing/list1_glyphosate_en.pdf [consultado em 05/09/07].
- EXTOXNET (1997). [Em linha] Disponível em: <http://pmep.cce.cornell.edu/profiles/extoxnet/carbaryl-dicrotophos/cymoxanil-ext.html> [consultado em 11/01/07].

EXTOXNET (1996). [Em linha] Disponível em:
<http://extoxnet.orst.edu/pips/glyphosa.htm> [consultado em 16/09/07].

FAO (2005). [Em linha] Disponível em:
<http://www.fao.org/ag/AGP/AGPP/Pesticid/Specs/docs/Pdf/new/cymoxa05.pdf> [consultado em 11/01/07].

FAO (1999). [Em linha] Disponível em:
www.fao.org/ag/AGP/AGPP/Pesticid/JMPR/Download/93_eva/propineb.pdf - [consultado em 05/09/07].

Farinas, M.V., Garcia, J.B., Martin, S.G., Crescente, R.P., Latorre, C.H. (2007). Direct determination of cadmium in *Orujo* spirit samples by electrothermal atomic absorption spectrometry: Comparative study of different chemical modifiers. *Analytical Chemical Act* 591, 231–238.

Federal Register (2003). Cymoxanil; Notice of Filing a Pesticide Petition to Establish a Tolerance for a Certain Pesticide Chemical in or on Food. [Em linha] Disponível em:
<http://edocket.access.gpo.gov/2003/pdf/03-4257.pdf> [consultado em 01/08/07].

Feigenbrugel, V., Le Calvé, S., Mirabel, P. (2005). Molar absorptivities of 2,4-D, cymoxanil, fenpropidin, isoproturon and pyrimethanil in aqueous solution in the near-UV. *Spectrochimica Acta Part A* 63, 103-110.

Ferreira, M., Silva, V., Bressan, M., Faria, P., Vieira, J., Oda, S. (2003). Pescados processados: Maior vida de prateleira e maior valor agregado. [Em linha] Disponível em:
http://www.editora.ufla.br/BolExtensao/pdfBE/bol_66.pdf [consultado em 03/08/08].

Fingerman, M., Jackson, N., Nagabhushanam, R. (1998). Hormonally-regulated functions in crustaceans as biomarkers of environmental pollution. *Comparative*, Vol. 120, 343-350.

Fishar, M. (2006). Red swamp crayfish (*Procambarus clarkii*) in river Nile, Egypt. Case study. National Institute of Oceanography and Fisheries.

Florent, Q. (2006). L'écrevisse de Louisiane *Procambarus Clarkii*. Master Gei. Université Denis Diderot & IPGP.

Grandjean, P., Weihe, P., White, R.F. (2000). Delayed neurotoxicity due to developmental exposure to methylmercury. [Em linha] Disponível em:
<http://www.cprm.gov.br/pgagem/Manuscripts/grandjeanp.pdf> [consultado em 01/08/07].

Gelsomino, A., Petroviocova, B., Tiburtini, S., Magnani, E., Felici, M. (1997). Multiresidue analysis of pesticides in fruits and vegetables by gel permeation chromatography followed by gas chromatography with electron-capture and mass spectrometric detection. *Journal of Chromatography A* 782, 105-122.

- Ghanem, A., Bados, P., Estaun, A., Alencastro, L., Taibi, S., Einhorn, J., Mougin, C. (2007). Improved coupled-column liquid chromatographic method for the determination of glyphosate and aminomethylphosphonic acid residues in environmental waters. *Chemosphere* 69, 1368–1373.
- Gherardi, F., Acquistapace, P. (2004). Biological Invasions in European Inland Waters – A case of the red swamp crayfish *Procambarus Clarkii*. An international Workshop - Firenze – Aula Magna dell' Università. [Em linha] Disponível em: http://www.icaiss.org/pdf/21Tuesday/B/tues_b_l_pm/Francesca_Gherardi.pdf [consultado em 25/06/07].
- Gherardi, F., Aquiloni, L., Berti, R. (2006). The impact *Procambarus clarkii* in Mediterranean Wetlands and proposals of this migration. [Em linha] Disponível em: http://www.icaiss.org/pdf/2006ppt/Gherardi_Francesca.pdf [consultado em 26/06/07].
- Godt, J., Scheiding, F., Grosse-Siertrup, C., Esche, V., Brandenburg, P., Reich, A., Groneberg, D. (2006). The toxicity of cadmium and resulting hazards for human health. *Journal of occupational Medicine and Toxicology*.
- Grandjean, P., Weihe, P., White, R.F. (2000). Delayed neurotoxicity due to developmental exposure to methylmercury. [Em linha] Disponível em <http://www.cprm.gov.br/pgagem/Manuscripts/grandjeanp.pdf> [Consultado em 20/08/2007].
- Guven, K., Deveci, E., Akba, O., Onen, A., Pomerai, D. (1998). The accumulation and histological effects of organometallic fungicides Propineb and Maneb in kidneys of fetus and females rats during pregnancy. *Toxicology Letters* 99, 91-98.
- Guo, Z-H., Cai, Q., Yang, Z. (2005). Determination of glyphosate and phosphate in water by ion chromatography—inductively coupled plasma mass spectrometry detection. *Journal of Chromatography A* 1100, 160–167.
- Harlioglu, M.M., Harlioglu, A.G. (2006). Threat of non-native crayfish introductions into Turkey: global lessons. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 16, 171-181.
- Hengel, M., Shibamoto, T. (2001). Development of a Gas Chromatographic Method for Fungicide Cymoxanil Analysis in Dried Hops. *Journal Agricultural Food Chemistry* 49, 570-573.
- Hernández, A., Gómez, M., Pérez, V., Garcia-Lario, J., Pena, G., Gil, F., López, O., Rodrigo, L., Pino, G., Pla, A. (2006). Influence of exposure to pesticides on serum components and enzyme activities of citotoxic among intensive agriculture farmers. *Environmental Research* 102, 70-76.
- Hernández-Caraballo, E., Burguera, M., Burguera, J.L. (2004). Determination of cadmium in urine specimens by graphite furnace atomic absorption spectrometry using a fast atomization program. *Talanta* 63, 419–424.

Hernández-Ochoa, I., García, V., López-Carrillo, L., Rubio-Andrade, M., Mórán-Martínez, J., Cébrían, M., Quintanilla-Veja, B. (2005). Low lead environmental exposure alters semen quality and sperm chromatin condensation in northern México. *Reproductive Toxicology* 20, 221-228.

Hidalgo, C., Rios, C., Hidalgo, M., Salvadó, V., Sancho, J.V., Hernández, F. (2004). Improved coupled-column liquid chromatographic method for the determination of glyphosate and aminomethylphosphonic acid residues in environmental waters. *Journal of Chromatography* 1035, 153-157.

Holdich, D.M. (1993). A review of Castaciculture: freshwater crayfish farming. *Aquatic Living Resources* 6, 307-317.

Hsu, P.C., Guo, Y.L. (2002). Antioxidant nutrients and lead toxicity. *Toxicology* 180, 33-44.

INCHEM (1994). [Em linha] Disponível em: www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc159.htm. [consultado em 16/09/07].

INCHEM (1977). [Em linha] Disponível em: <http://www.inchem.org/documents/jmpr/jmpmono/v077pr41.htm>[consultado em 05/09/07].

INCHEM (1993). [Em linha] Disponível em: <http://www.inchem.org/documents/jmpr/jmpmono/v93pr16.htm>[consultado em 10/09/07].

Jurado, J., Martín, M.J., Pablos, F., Moreda-Pineiro, A., Bermejo-Barrera, P. (2006). Direct determination of copper, lead and cadmium in aniseed spirits by electrothermal atomic absorption spectrometry. *Food Chemistry* 101, 1296–1304.

Kahle, J., Zauke, G. (2001). Bioaccumulation of trace metals in the calanoid copepod *Metridia gerlachei* from the Weddell Sea (Antarctica). *The Science of the Total Environment* 295, 1–16.

Kazos, E.A., Stalikas, C.D., Nanos, C.G., Konidari, C.N. (2007). Determination of Dithiocarbamate fungicide propineb and its main metabolite propylenethiourea in airborne samples. *Chemosphere* 68, 2104-2110.

Kerbi, J.L., Riley, S.P.D., Kat, L.B., Wilson, P. (2005) Barriers and flow as limiting factors in the spread of an invasive crayfish (*Procambarus Clarkii*) in Southern California streams. *Biological Conservation* 126, 402-409.

Luerro, L., Pastor, S., Suárez, S., Durbán, R., Gómez, C., Parrón, T., Creus, A., Marcos, R. (1999). Cytogenetic biomonitoring of Spanish greenhouse workers exposed to pesticides: micronuclei analysis in peripheral blood lymphocytes and buccal epithelial cells. *Mutation Research* 464, 255-262.

Maria, V.L., Pacheco, M., Santos, M.A. (2005). *Anguilla anguilla* L. Genotoxic responses after in situ exposure to freshwater wetland (Pateira de Fermentelos, Portugal). *Environmental International* 32, 510-515.

Martelli, A., Rousselet, E., Dycke, C., Bouron, A., Moulis, J.-M. (2006). Cadmium toxicity in animal cells by interference with essential metals. *Biochemical* 88, 1807-1814.

Mc Clain, R., Romaine, R., Lutz, C., Shirley, M.(2005). Louisiana Crawfish Production manual. LSU Ag center, research and extension, 4-9.

Monteiro, M. (2003). Avaliação da toxicidade de contaminantes ambientais em populações naturais de *Pomatoschistus microps* (Kroyer, 1938). Tese de Mestrado. Universidade de Aveiro.

Onunkwor, B., Dosumu, O., Odukoya, O., Arowolo, T., Ademuyiwa, O. (2004). Biomarkers of lead exposure in petrol station attendants and autom-mechanisms in Abeokuta, Nigéria: effect of 2-week ascorbic acid supplementation. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 17, 169-176.

Osten, j., Ortíz-Arana, A., Guilhermino, L. Soares, A. (2004). In vivo evaluation of three biomarkers in the mosquitofish (*Gambusia yucatana*) exposed to pesticides. *Chemosphere* 58, 627-66.

Pan, L., Zhang, H. (2006). Metallothionein, antioxidant enzymes and DNA strand breaks as biomarkers of Cd exposure in a marine crab, *Charybdis japonica*. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C*, 67-75.

Paz-y-Miño, C., Arévalo, M., Sanchez, M., Leone, P. (2004). Chromosome and DNA damage analysis in individuals occupationally exposed to pesticides with relation to genetic polymorphism for CYP 1A1 gene in Ecuador. *Mutation Research* 562, 77-89.

Pereira, M.J., Azeiteiro, U. (2003). Ecological notes on the species of *Phacus Dujardin* (Euglenophyta) from the region of Portugal. *Acta Oecologica* 24, 833-848.

Phyles (2007) - Toxicity of lead. [Em linha] Disponível em: <http://www.phyles.ge.cnr.it/htmling/toxicityoflead.html> - Plytoextraction of lead from soil [consultado em 20/09/07].

Pourreza, N., Mousavi, H.Z. (2004). Determination of cadmium by flame atomic absorption spectrometry after preconcentration on naphthalene–methyltrioctylammonium chloride adsorbent as tetraiodocadmiate (II) ions. *Analytical Chemical Act* 503, 279–282.

Public Health Guidance Note (2002). [Em linha] Disponível em <http://www.heath.qld.gov.au/phs/Documents/echu/2665.pdf> [consultado em 27/09/07].

Rais Cadmium (1991). [Em linha] Disponível em <http://rais.ornl.gov/tox/profiles/cadmium.shtml> [consultado em 10/01/08].

Rais Lead (1994). [Em linha] Disponível em <http://rais.ornl.gov/tox/profiles/lead.shtml> [consultado em 20/09/07].

Rodrigues, A., Ferreira, V., Cardoso, V., Ferreira, E., Benoliel, M.J. (2007). Determination of several pesticides in water by solid-phase extraction, liquid chromatography and electrospray tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1150, 267-278.

Roma-Torres, J., Silva, S., Costa, C., Coelho, P., Henriques, M.A., Teixeira, J.P., Mayan, O. (2007). Lead exposure of children and newborns in Porto, Portugal. *Int. J. Hyg. Environmental-Health* 210, 411-414.

Sant'Ana, M.G., Moraes, R., Bernardi, M.M. (2005). Toxicity of cadmium in Japanese quail: Evaluation of body Weight, hepatic and renal function, and cellular immune response. *Environmental Research* 99, 273-277.

Schilderman, P., Moonen, E., Maas, L., Welle, I., Kleinjans, J. (1998). Use of Crayfish in Biomonitoring Studies of Environmental Pollution of River Meuse. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 44, 241-252.

Silva, R., Cognato, G., Vuaden, F., Rezende, M., Thiesen, F., Fauth, M., Bogo, M., Bonan, C., Dias, R. (2003). Different sensitivity of Ca^{2+} -ATPase and cholinesterase to pure and commercial pesticides in nervous ganglia of *Phyllocaulis soleiformis* (Mollusca). *Comparative Biochemistry and Physiology Part C* 135, 215-220.

Sinha, S., Mallick, S. Misra, R., Singh, S., Basant, A., Gupta, A (2006). Uptake and translocation of metals in *Spinacia oleracea* L. grown on tannery sludge-amended and contaminated soils: Effect on lipid peroxidation, morpho-anatomical changes and antioxidants. *Chemosphere* 67, 176-187.

Sousa, S. (2007). Nefrotoxicidade, metais e ambiente Relações Perigosas?. Monografia de final de curso. Universidade Fernando Pessoa.

Teles, M., Pacheco, M., Santos, M.A. (2006). Endocrine and metabolic responses of *Anguilla anguilla* L. caged ion freshwater-wetland (Pateira de Fermentelos - Portugal). *Science of the Total Environment* 372, 562-570.

Telisman, S., Jurasovic, J., Pizent, A., Cvitkovic, P. (2000). Blood Pressure in Relation to Biomarkers of Lead, Cadmium, Copper, Zinc, and Selenium in Men without. *Occupational Exposure to Metals. Environmental Research Section A87*, 57-68.

Thorton, I., Rautiu, R., Brush, S. (2002). Properties of Lead- [Em linha] Disponível em: www.ldaint.org/factbook/chapter2.pdf [consultado em 20/09/07].

Timbrell, J. (1998). Biomarkers in toxicology. *Toxicology* 129, 1-12.

Vijayavel, K., Gopalakrishnan, S., Balasubramanian, M. (2007). Sublethal effect of silver and cadmium in the green mussel *Perna viridis* with reference to alterations in oxygen uptake, filtration rate and membrane bound ATPase system as biomarkers. *Chemosphere* 69, 979-986.

Wang ,Z., Wang, S., Cai, M. (2007). Determination of cadmium in paint samples by graphite furnace atomic absorption spectrometry with optical temperature control. *Talanta* 72, 1723–1727.

Watanabe, K. H., Desimone, F.W., Arunthavarani,T., Hartley, W.R., Hindrichs, A.E. (2003). Fish tissue quality in the lower Mississippi River and health risks from fish consumption. *The Science of the Total Environment* 302, 109–126.

Wats, M., Macfarlane, R. (1999). [Em linha] Disponível em: <http://www.poptel.org.uk/panap/pest/pe-gly.htm> [consultado em 16/09/07].

Weiss, T., Hardt, J., Angerer, J. (1999). Determination of urinary 2-thiazolidinethione-4-carboxylic acid after exposure to alkylene bisdithiocarbamates using gas chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, 85-94.

Weizsaecker, K. (2003). Lead toxicity during pregnancy. Honorable Mention Manuscript. Activity and protein content of *Nelumbo Nucifera* Gaertn. *Chemosphere* 39(12), 2159-2169.

Wo, K., Lam, K., Wu, R. (1999). A Comparison of Growth Biomarkers for Assessing Sublethal Effects of Cadmium on a Marine Gastropod, *Nassarius festivus*. *Marine Pollution Bulletin* 39, 165-173.

Zhang, L., Ye, X., Feng, H., Jing, Y., Ouyang, T., Yu, X., Liang, R., Gao, C., Chen, W. (2007). Heavy metal Contamination in Western Xiamen Bay sediments and vicinity. China. *Chemosphere* 67, 1138-1143.

Avaliação dos Efeitos Toxicológicos Decorrentes do Consumo Humano de Lagostim Vermelho da Louisiana
(*Procambarus clarkii*).