

Maria do Rosário da Silva Simões Braga



Efeitos tóxicos subletais de piritionato de zinco em parâmetros toxicológicos de
Gambusia holbrooki

Universidade Fernando Pessoa

Faculdade de Ciências da Saúde

Porto, 2013

Maria do Rosário da Silva Simões Braga

Efeitos tóxicos subletais de piritionato de zinco em parâmetros toxicológicos de
Gambusia holbrooki

Universidade Fernando Pessoa

Faculdade de Ciências da Saúde

Porto, 2013

Maria do Rosário da Silva Simões Braga

Efeitos tóxicos subletais de piritionato de zinco em parâmetros toxicológicos de
Gambusia holbrooki

Projeto de Pós-Graduação/Dissertação apresentado à
Universidade Fernando Pessoa como parte dos requisitos
necessários para obtenção do Mestrado Integrado em
Ciências Farmacêuticas.

(Maria do Rosário da Silva Simões Braga)

Resumo

Atualmente, existem diversos grupos de agentes biocidas que podem ser utilizados em diferentes áreas, como por exemplo higiene, desinfecção, ação antiparasitária e anti-incrustantes, verificando-se assim um maior recurso à sua utilização pelo homem. Os compostos biocidas apresentam diversos usos, incorporando sobretudo tintas anti-incrustantes. O piritionato de zinco (bis (1 hidroxí -2 (1H)-piridetonato-o,s) - (T-4) zinco) classifica-se como um biocida metálico, e possui ação bactericida, algicida e fungicida. Tem sido formulado em tintas anti-incrustantes, que protegem as superfícies que se encontram expostas a um ambiente aquático, evitando assim a formação de biofilmes. Devido à sua ação biológica tem sido também utilizado para fins cosméticos, como em champôs para o tratamento da caspa e seborreia. As alterações fisiológicas em organismos aquáticos decorrentes da presença de compostos poluentes nos diversos compartimentos ambientais são hoje em dia tema de pesquisa, em face das alterações eventualmente causadas que podem ter variadas consequências deletérias ao nível dos indivíduos e dos ecossistemas. Os dados existentes recolhidos em estudos de monitorização destes compostos demonstram a presença sistemática dos mesmos em compartimentos aquáticos. No presente trabalho avaliou-se a potencial ecotoxicidade do piritionato de zinco em termos de stress oxidativo (catalase, GSTs e TBARS), neurotoxicidade (acetilcolinesterase) e danos histopatológicos no fígado e nas brânquias do peixe dulçaquícola *Gambusia holbrooki*, após uma exposição aguda (96 h) ao composto. O piritionato de zinco esteve na base do aparecimento de alterações histopatológicas, quer nas brânquias quer no fígado, dos organismos expostos. No entanto não se obteve nenhum resultado significativamente diferente na determinação dos índices patológicos. Relativamente aos biomarcadores testados, apenas a atividade das GSTs poderá indicar a ocorrência de efeitos pro-oxidantes, visto que para as outras enzimas utilizadas para avaliação de stress oxidativo não se obtiveram resultados significativamente diferentes do grupo controlo.

Palavras-chave: ecotoxicologia, poluentes, parâmetros toxicológicos, saúde ambiental, ecossistema.

Abstract

At the present time, diverse biocidal agents can be used in distinct areas, such as hygiene, disinfection, antiparasitic activity, and antifouling effect, being increasingly used by humans. Biocidal compounds can be employed in a large set of applications, such as antifouling paints. Zinc pyrithione ritionato de (bis (1 hidroxí -2 (1H)-piridetonato-o,s) - (T-4) zinco) is a metallic biocide, with bactericide, algicide and fungicide activity. It has been formulated in antifouling paints, that protect surfaces exposed to the aquatic environment from the instalation of a biofilm. It has also been used in cosmetics, such as anti-dandruff shampoos. Physiological alterations in aquatic organisms exposed to pollutants in different environmental compartments have been theme of research, to diagnose deleterious effects at the individual and ecosystems levels. Already reported data show the systematic presence of these substances in the aquatic compartment. The present work intended to assess the potential ecotoxicity elicited by zinc pyrithione in terms of oxidative stress (activity of catalase, GSTs and TBARS levels), neurotoxicity (acetylcholinesteras activity), and histopathological damage in liver and gills of the freshwater fish *Gambusia holbrooki*, after an acute (96h) exposure to the compounds. Zinc pyrithione was capable of causing histopathological alterations, both in liver and gills of exposed organisms. However, pathological indexes were not altered. In terms of oxidative stress biomarkers, only the activity of GSTs may indicate the ocurrence of pro-oxidative effects, since the other enzymes were not responsive.

Keywords: ecotoxicology, pollutants, toxicological endpoints, environment health, ecosystem.

Agradecimentos

Ao Prof. Doutor Bruno Nunes e ao Prof. Doutor Alberto Correia, respetivamente orientador e co-orientador do presente trabalho, o meu sincero agradecimento por toda a disponibilidade, apoio, paciência e amizade que sempre demonstraram na execução de todo o trabalho. Muito obrigado por tudo!

Ao CESAM e ao CIIMAR por terem disponibilizado todos os recursos materiais indispensáveis para a execução do presente trabalho e a todos os colaboradores que fazem parte destes centros de investigação, em especial à Prof. Doutora Sara Antunes, por todo o apoio e ajuda, um sincero obrigado! Também não poderia deixar de agradecer à colega Ana Sofia Ramos pela ajuda na execução das preparações histológicas.

À Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade Fernando Pessoa e a todos os docentes que contribuíram para o meu conhecimento pessoal.

Um agradecimento profundo aos meus Pais por todo o carinho, dedicação, amizade, apoio... Obrigado por tudo o que fizeram e fazem por mim, sem vocês nada disto seria possível!

À minha família por todo o apoio e ajuda que deram, pois estiveram sempre presentes.

A todas as pessoas especiais que sabem quem são, que estiveram sempre presentes para me apoiar, vocês sabem o significado que têm na minha vida!

A todos os elementos da Farmácia Teles e Sousa por todo o apoio que me têm dado e pela vossa grande amizade!

E a todos que de certa forma contribuíram na minha vida e que me ajudaram a ser quem sou... Um Muito Obrigado!

Índice

I. Introdução	1
I.1. Poluição aquática por compostos de origem humana	1
I.2. Agentes biocidas como contaminantes ambientais	2
I.3. Efeitos ecotoxicológicos dos agentes xenobióticos e seu estudo	3
I.4. Poluição aquática por fármacos	7
I.5. O agente biocida piritionato de zinco	8
I.6. Utilização de peixes em ensaios ambientais	9
II. Biomarcadores	11
II.1. Biomarcadores de monitorização ambiental	11
II.2. Biomarcadores de atividade enzimática	14
II.3. Stress oxidativo e suas enzimas	15
II.3.1. Glutathione <i>S</i> -transferases (GSTs)	17
II.3.2. Catalase	18
II.3.3. TBARS	18
III. Neurotoxicidade	19
IV. Objetivos	20
V. Material e Métodos	20
V.1. Captura dos organismos	20
V.2. Teste in vivo de exposição aguda (96horas)	21
V.3. Determinações enzimáticas	22
V.3.1. GSTs, Catalase e TBARS	22
V.3.2. Acetilcolinesterase	23
V.3.3. Quantificação da proteína total	23
V.4. Determinação histopatológica	24

V.5. Análise Estatística	24
VI. Resultados	25
VI.1. Determinações enzimáticas	25
VI.1.1. Acetilcolinesterase	25
VI.1.2. GSTs	26
VI.1.3. Catalase	27
VI.1.4. TBARS	28
VI.2. Análise histopatológica	29
VI.3. Determinação histopatológica	31
VII. Discussão	32
VII.1. Neurotoxicidade	32
VII.2. Stress oxidativo	32
VII.3. Alterações histopatológicas	34
VIII. Conclusão	36
IX. Bibliografia	38

Índice de Figuras

Fig. 1. Efeito da entrada de um poluente num ambiente marinho (adaptado de Gomes <i>et al.</i> , 2000)	4
Fig. 2. Ilustração de um animal pertencente à família <i>Poeciliidae</i> (adaptado de Coad, 2012)	11
Fig. 3. Esquema utilizado para a exposição da <i>Gambusia holbrooki</i> ao piritionato de zinco	22
Fig. 4. Efeito do piritionato de zinco na atividade da enzima AChE na cabeça de <i>G.holbrooki</i> . As barras correspondem à média dos 5 animais incluindo as respetivas barras do erro padrão	25
Fig. 5. Efeito do piritionato de zinco na atividade das isoenzimas GSTs, no fígado de <i>G.holbrooki</i> . As barras correspondem à média dos 5 animais, incluindo as respetivas barras do erro padrão. *- diferenças significativas em relação ao controlo, $p>0,05$	26
Fig. 6. Efeito do piritionato de zinco na atividade da enzima catalase no fígado de <i>G.holbrooki</i> . As barras correspondem à média dos 5 animais, incluindo as respetivas barras do erro padrão	27
Fig. 7. Efeito do piritionato de zinco na concentração TBARS no músculo de <i>G.holbrooki</i> . As barras correspondem à média dos 5 animais, incluindo as respetivas barras do erro padrão	28
Fig. 8. Imagem da histologia branquial de <i>G. holbrooki</i> . A- grupo controlo com sinais de aneurismas (setas) e hiperplasia (círculo); B- fusão das lamelas secundárias (círculo) (40 μ g/l); C- levantamento epitelial branquial (seta) (80 μ g/l); D- hipertrofia e fusão lamelar (círculo) (160 μ g/l)	29
Fig. 9. Imagem da histologia do fígado da <i>G.holbrooki</i> . A- grupo controlo com sinais de vacuolização (setas); B- presença de núcleos picnóticos e alargamento de sinusoides (setas) (80 μ g/l); C- sinais de necrose (80 μ g/l); D- sinais inflamatórios (40 μ g/l)	30
Fig. 10. Índice patológico das brânquias. As barras correspondem à média de 3 animais, incluindo as respetivas barras de erro padrão	31
Fig. 11. Índice patológico do fígado. As barras correspondem à média de 3 animais, incluindo as respetivas barras do erro padrão	31

I. Introdução

I.1. Poluição aquática por compostos de origem humana

Independentemente da sua área de atuação, todos os compostos usados em atividades humanas serão, posteriormente à sua utilização, libertados para o meio ambiente, onde poderão adquirir o estatuto de poluentes. Importante será de salientar que todos os compostos considerados poluentes podem ser provenientes de fontes diversas e atividades distintas, como a agricultura, ou as indústrias, mas podem também ser libertados por atividades complexas que culminam na eliminação dos esgotos domésticos (Ahmad *et al.*, 2006). Outras atividades, como a pecuária e a aquicultura, são igualmente responsáveis pela libertação de poluentes para o ambiente, pois utilizam agentes químicos com ação biológica, como anti-infecciosos e anestésicos, que são libertados para a água de uma forma direta (Daughton e Ternes, 1999). Muitos destes compostos poluentes, ao entrarem em contacto com o ambiente aquático, podem interagir e sofrer acumulação nos organismos existentes neste meio, provocando uma diversidade de efeitos tóxicos (Ahmad *et al.*, 2006). Atualmente sabe-se que a presença de xenobióticos no meio aquático pode resultar na sua acumulação na água de ecossistemas limnológicos e marinhos, nos sedimentos ou mesmo em tecidos de organismos não alvo, provocando efeitos adversos que se possam fazer sentir na saúde dos organismos aquáticos e até do homem (Marschner, 1999; Lombardi, 2004; Bhagwant e Elahee, 2007).

Nem todos os compostos de origem humana levantam questões de relevância ambiental quando lançados no ambiente aquático. Assim, torna-se necessário fazer uma análise exaustiva e criteriosa de modo a colocar o enfoque sobre agentes antropogénicos que

podem, no limite, causar desequilíbrios. Os contaminantes ambientais podem exercer tais efeitos tóxicos quando os compostos não são degradados, ou são parcialmente degradados; quando apresentam uma elevada ação biológica; quando têm um elevado poder de acumulação; ou por fim quando possuem um efeito aditivo ou sinérgico na presença de outros compostos no ambiente em causa (Bernet *et al.*, 1999).

I.2. Agentes biocidas como contaminantes ambientais

Nos nossos dias, vários grupos de agentes biocidas podem ser utilizados em diversas áreas, devido às suas variadas funcionalidades, contribuindo para uma dispersão considerável destes compostos pelo meio ambiente. Para além disso, atualmente vive-se uma constante evolução da indústria, havendo assim um aumento do uso de compostos biocidas (Guardiola *et al.*, 2012). Estes apresentam diversas aplicações, de entre as quais se destaca a sua incorporação em tintas anti - incrustantes, que protegem as superfícies expostas a um ambiente aquático (ex.: navios, cais, estruturas submersas), evitando assim a formação de biofilmes (Yebra *et al.*, 2004). Importante será de salientar que o piritionato de zinco apresenta uma ampla ação biológica sendo muito utilizado para fins cosméticos, exemplo disso são os champôs para o tratamento da caspa e da seborreia (Schwartz *et al.*, 2011).

Os biocidas, em geral, podem ser agrupados em quatro grupos distintos. Fazem parte do primeiro grupo os desinfetantes e os produtos biocidas gerais, onde se enquadram os produtos destinados à higiene humana, os produtos usados na saúde pública para desinfecção do ar, dos hospitais, das piscinas, aquários, águas residuais, entre outras aplicações. Deste grupo também fazem parte os produtos destinados à higiene veterinária, os desinfetantes usados para as superfícies que estão em contacto com os alimentos, rações, bebidas e por fim os compostos com poder desinfetante para tornar as águas potáveis (Les autorités fédérales de la Confédération Suisse, 2012).

Do segundo grupo, fazem parte os biocidas com poder conservante (para impedir a contaminação microbiana), por exemplo de alimentos que estejam dentro de um recipiente. Deste grupo também fazem parte os compostos para controlo da caspa, para proteção da madeira, de fibras, couro, borracha e materiais polimerizados, bem como para proteção das alvenarias, dos líquidos utilizados em sistemas de refrigeração e de fabricação e também dos fluidos usados para a transformação dos metais (Les autorités fédérales de la Confédération Suisse, 2012).

O terceiro grupo de biocidas é designado por produtos antiparasitários, fazendo parte deste grupo os rodenticidas, avicidas, moluscidas, pesticidas, inseticidas, acaricidas, vermícidas e produtos destinados a controlar outros invertebrados. Também fazem parte os piscidas e produtos destinados a controlar outros artrópodes, bem como os repelentes e atrativos e os produtos utilizados para o controlo de outros vertebrados (Les autorités fédérales de la Confédération Suisse, 2012; European Chemicals Agency, 2013).

Por fim ao quarto e último grupo pertencem os agentes anti-incrustantes, e os compostos conservantes para alimentação humana e veterinária, bem como o fluido de embalsamento e taxidermia, ou seja os produtos usados na desinfeção e conservação de cadáveres humanos ou animais ou parte destes (Les autorités fédérales de la Confédération Suisse, 2012; European Chemicals Agency, 2013).

I.3. Efeitos ecotoxicológicos dos agentes xenobióticos e seu estudo

Os efeitos deletérios subletais causados por compostos biocidas ainda são pouco conhecidos, embora a sua presença no ambiente aquático seja bastante comum, daí que haja um crescimento contínuo da necessidade de avaliar os seus efeitos ecotoxicológicos (Nunes *et al.*, 2005; Fent *et al.*, 2006). Embora existam já diversas publicações acerca desta temática, ainda não existem dados abrangentes acerca dos efeitos que os compostos referidos possam causar nos diversos organismos que a eles estejam expostos, mas de uma maneira geral já se sabe a forma de como alteram os ecossistemas (Henschel *et al.*, 1997) (Fig.1).

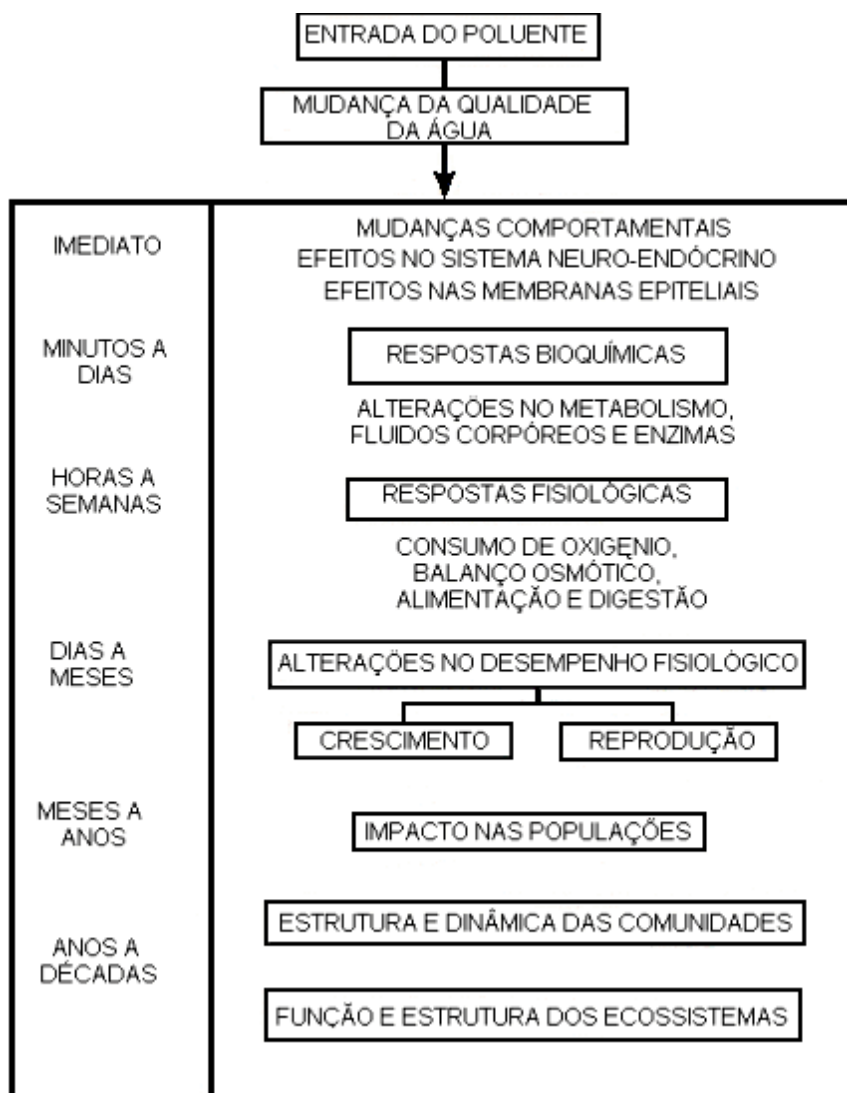


Fig.1. Efeito da entrada de um poluente num ambiente marinho (adaptado de Gomes *et al.*, 2000).

Em Estocolmo, em Junho de 1969, durante uma reunião do *Committee of the International Council of Scientific Unions* (ICSU), o toxicologista René Truhaut, definiu a Ecotoxicologia como uma “ciência que estuda os efeitos das substâncias naturais ou sintéticas sobre os organismos vivos, populações e comunidades animais ou vegetais, terrestres ou aquáticos, que constituem a biosfera, incluindo assim a interação das substâncias com o meio nos quais os organismos vivem num contexto integrado” (Truhaut, 1977).

A Ecotoxicologia é assim uma “ciência que tem por objetivo principal estudar as modalidades de contaminação do ambiente pelos poluentes naturais ou sintéticos,

produzidos por atividades humanas bem como os seus mecanismos de ação e os seus efeitos no conjunto de seres vivos que habitam na biosfera” (Ramade, 1977).

A Ecotoxicologia é uma área que capta cada vez mais investigadores no sentido de se efetuarem avaliações da toxicidade de determinados compostos num ecossistema, ou seja, a quantificação dos efeitos tóxicos causados nos diversos sistemas biológicos por agentes químicos que se encontrem dispersos (Fent *et al.*, 2006). Assim, é uma ciência aplicada, que requer o estudo dos mecanismos, efeitos e danos causados em sistema biológicos, a vários níveis de organização, por agentes de natureza química diversa e que têm em comum o facto de estarem disseminados no meio ambiente. Esta área científica utiliza como ferramentas um vasto leque de metodologias de análise, no sentido de dar respostas relativas aos muitos mecanismos de toxicidade que os agentes dispersos no meio ambiente apresentam. Dada a cada vez maior dispersão de agentes xenobióticos no meio ambiente, surge uma necessidade de evolução ao nível das técnicas disponíveis para avaliação toxicológica de tais compostos. Para responder a esta necessidade, surgiram novos parâmetros indicativos de toxicidade, bem como novos ensaios ecotoxicológicos, que incorporaram novas espécies de peixes, crustáceos e moluscos (Nunes *et al.*, 2005). Normalmente, estes testes de toxicidade são efetuados com base em protocolos padronizados e pré-estabelecidos, tendo em conta as normas internacionais que emanam de organismos supragovernamentais (ex.: Organização para a Cooperação para o Desenvolvimento Económico OCDE, União Europeia UE, e United States Environmental Protection Agency, USEPA) utilizando organismos teste tradicionais e amplamente conhecidos em termos da sua ecologia/biologia (Fent *et al.*, 2006). Muitos destes procedimentos têm vindo a ser desenvolvidos e melhorados desde a década de 1980, pelas diversas agências ambientais a nível mundial (Magalhães e Filho, 2008).

É muito importante perceber a resposta dos organismos individuais aos contaminantes para assim os seus efeitos serem realisticamente previstos ao nível das populações, comunidades e ecossistemas (Magalhães e Filho, 2008). Importa salientar que por vezes os efeitos causados nas populações são difíceis de detetar, pois alguns desses efeitos só se manifestam passados longos períodos de tempo, quando o processo nefasto ou deletério já decorreu, não sendo possível reverter a situação e reduzir o risco (Oost *et*

al., 2003). Assim, uma das preocupações a ter em conta no desenvolvimento e implementação de metodologias de análise e avaliação dos efeitos ecotoxicológicos, é que essas ferramentas possam ser encaradas como sinais de aviso precoce para a ocorrência de alterações potencialmente deletérias a nível subindividual, individual ou até mesmo populacional (Oost *et al.*, 2003).

Os testes de ecotoxicidade permitem efetuar uma avaliação do tipo de contaminação ambiental que pode, como já referido anteriormente, ter origem nos efluentes agrícolas, industriais e domésticos, sedimentos, medicamentos e produtos químicos em geral, mas também podem ser usados para o estudo de efeitos toxicológicos mais básicos (como estudo de mecanismos de interações) dos diversos compostos (Marschner, 1999; Lombardi, 2004). Os testes de ecotoxicidade atuais são testes que apresentam como principais vantagens a simplicidade, o baixo custo, o fornecimento de uma estimativa dos efeitos letais e sub-letais, medem a toxicidade quando o agente tóxico não é identificado quimicamente, podem fornecer um sinal de alarme precoce ou prever os potenciais danos ambientais, contabilizam os efeitos das misturas tóxicas (podendo um efluente quimicamente complexo ser avaliado genericamente como um único poluente) e por fim os resultados destes testes são mais facilmente compreendidos e aceites pelos industriais e público em geral (Chapman, 2000). Apresentam algumas desvantagens: a substância tóxica nem sempre é identificada; nos ensaios são apenas utilizadas algumas espécies das muitas que estão presentes nos ecossistemas, e os organismos-teste não são expostos a fontes de stress que mimetizam as condições ambientais reais (não existem variações nos fatores ambientais) durante a realização do ensaio (Chapman, 2000).

Estes testes podem ser divididos em testes agudos ou crónicos; no primeiro caso, obtém-se uma resposta acerca dos efeitos que podem ser causados por um agente tóxico em concentrações elevadas num organismo exposto durante um período breve. Assim, são habitualmente testes com um curto tempo de exposição, que normalmente varia entre as 24 horas e as 96 horas, e onde se utilizam concentrações elevadas de uma determinada substância química (Walker *et al.*, 2001). Contudo um teste agudo também pode ser definido como uma exposição a um agente tóxico, sendo a concentração total desse agente libertado num único evento, e sendo rapidamente absorvido (Schvartsman, 1991). De forma oposta, um teste crónico envolve exposição dos organismos aos

agentes em estudo em concentrações subletais por períodos de tempo mais longos, que podem abranger parte ou todo o ciclo de vida do organismo em causa (Walker *et al.*, 2001). Quando se trata de um teste crónico, o agente tóxico é libertado por períodos de tempo mais longos e são periodicamente repetidos, sendo utilizadas baixas concentrações dos compostos em estudo (Schvartsman, 1991).

A escolha do tipo de teste a executar, depende do tipo de estudo que se pretende desenvolver (Walker *et al.*, 2001). Um teste crónico remete-nos mais para a realidade do risco ambiental dos efeitos dos compostos tóxicos usados (Fent *et al.*, 2006).

I.4. Poluição aquática por fármacos

Os fármacos (e os seus resíduos) são poluentes ambientais que possuem características determinantes, e que os colocam num patamar diferenciador relativamente à maioria dos restantes poluentes. Alguns compostos terapêuticos têm uma grande capacidade de resistência à degradação metabólica e apresentam uma considerável lipofilia, provocando uma persistência no ambiente após o seu uso (Cleuvers, 2003). Esta característica intrínseca explica a potencialidade de um fármaco se tornar perigoso para o ambiente e eventualmente para a saúde pública. Os fármacos também apresentam, naturalmente, atividade farmacológica; são parcialmente resistentes aos processos de metabolização; podem sofrer processos de biomagnificação ou bioacumulação nas cadeias alimentares (Nunes *et al.*, 2004). São considerados ambientalmente ubíquos e são libertados em grandes quantidades para o ambiente e normalmente sem sofrerem um tratamento prévio (Nunes *et al.*, 2004). Estas características contribuem assim para um aumento dos riscos quer para o ambiente, quer para a saúde pública (Nunes *et al.*, 2004).

Os fármacos de utilização humana e os seus resíduos e metabolitos facilmente atingem o ambiente aquático, visto que após a ingestão do fármaco, este será excretado por uma via fecal ou urinária, mas por vezes sob a forma não metabolizada ou sob a forma de metabolitos, atingindo assim as águas residuais, passando mais tarde para o ambiente aquático (Fent *et al.*, 2006). Tal passagem é favorecida pelo facto de muitos destes compostos farmacêuticos poderem atravessar as estações de tratamento das águas

residuais sem sofrerem qualquer tipo de degradação (Fent *et al.*, 2006). Os fármacos são propícios a apresentar diferentes mecanismos de ação que ainda não são bem conhecidos em diversos organismos, pelo que podem atuar de forma diferente em todos eles, contribuindo assim para uma dificuldade acrescida na avaliação dos seus efeitos ecotoxicológicos (Fent *et al.*, 2006).

I.5. O agente biocida piritionato de zinco

O piritionato de zinco (bis (1 hidróxi -2 (1H)-piridetonato-o,s) - (T-4) zinco) classifica-se como um biocida metálico (Yebra *et al.*, 2004), e possui ação bactericida, algicida e fungicida (Turley *et al.*, 2000; Yebra *et al.*, 2004; Turley *et al.*, 2005). É assim uma substância química que atua ao eliminar ou impedir o crescimento de microrganismos que são responsáveis pela incrustação biológica (Turley *et al.*, 2000; Yebra *et al.*, 2004; Turley *et al.*, 2005). Este composto é usado por exemplo em tintas de embarcações comerciais e de recreio, plataformas petrolíferas, tubulações submarinas e tanques destinados à aquicultura, entre outras aplicações (Yebra *et al.*, 2004). Devido à sua ação biológica tem sido também utilizado para fins cosméticos, como em champôs para o tratamento da caspa e seborreia (Schwartz *et al.*, 2011).

Apesar da sua utilização ao longo de décadas, ainda não existe um consenso no que diz respeito ao seu mecanismo de ação. Este poderá estar relacionado com um aumento dos níveis intracelulares de cobre, que conduzem à perda da funcionalidade de proteínas específicas que contêm ferro e enxofre (Reeder *et al.*, 2011). O piritionato de zinco é um composto ionóforo do cobre, permitindo a entrada de cobre nas células e facilitando a sua distribuição através das membranas intracelulares (Reeder *et al.*, 2011). O piritionato de zinco demonstrou também ser capaz de aumentar o cobre intracelular no fungo *Malassezia globosa* que está presente no couro cabeludo (Reeder *et al.*, 2011).

A questão da presença e persistência ambiental do piritionato de zinco é atual e pertinente, pois este composto apresenta um grande potencial de bioacumulação (Marcheselli *et al.*, 2010). Adicionalmente, alguns autores defendem que a forma da utilização do piritionato de zinco como anti-incrustante conduz à sua presença no ambiente aquático, com um forte impacto ambiental, pois estará altamente difundido

nas zonas costeiras (Yebra *et al.*, 2004). No entanto, o piritionato de zinco é um composto foto-degradável que rapidamente se degrada em compostos menos tóxicos quando exposto à luz solar (Turley *et al.*, 2000, 2005). No entanto, este processo denominado fotólise, poderá acontecer apenas à superfície das águas (zona eufótica) quando estas se encontram límpidas, pois a turvação provocada por sedimentos diminuiu a penetração da luz e compromete a consequente fotodegradação do piritionato de zinco, podendo ser uma explicação para a sua presença nos ambientes aquáticos (Maraldo e Dahllöf, 2004).

I.6. Utilização de peixes em ensaios ambientais

Para a monitorização da poluição ambiental no meio aquático, os peixes são dos organismos mais adequados, visto que conseguem acumular nos seus tecidos alguns poluentes que são provenientes da água e da própria dieta (Ayas *et al.*, 2007). Os ecotoxicologistas cada vez mais recorrem a peixes para a realização dos seus estudos, pois os peixes são considerados organismos sentinela de significativa utilidade apresentando diversas vantagens, pois permitem detetar os efeitos dos contaminantes ambientais, sendo considerados sistemas modelo eficientes e rentáveis (Bolis *et al.*, 2001; Scott e Sloman, 2004; Lourenço *et al.*, 2010). Assim, não é surpreendente o número crescente de estudos publicados com peixes (Peakall, 1992; Bolis *et al.*, 2001).

Os peixes são seres vivos que ocupam um grande número de habitats como os lagos, rios, mares, oceanos e fontes hidrotermais (Bolis *et al.*, 2001), permitindo assim desenvolver formas diferentes de sobrevivência a uma vasta gama de ambientes, o que os torna organismos teste de excelência em estudos toxicológicos para a avaliação dos efeitos de diversos poluentes (Ballesteros *et al.*, 2009).

A seleção da espécie de peixe para efetuar um estudo ecotoxicológico, deve levar em linha de conta algumas características intrínsecas que o animal deva possuir. Assim, o organismo teste a utilizar deve ser sensível e não resistente; deve ser uma espécie que exista em quantidade apreciável num determinado local, e ao longo de todo o ano; deve ser uma espécie abundante e de elevada distribuição geográfica, para se conseguir executar amostragens e para que obedeça a critérios de representatividade ecológica;

deve ser de fácil manuseamento e manutenção laboratorial e de adaptação pronta a condições de exposição; a sua fisiologia deve apresentar características que permitam obter boas relações dose-efeito em termos toxicológicos e devemos ter em consideração a possível existência de uma metodologia padronizada para a sua utilização (Peakall, 1992). A utilização de peixes em ensaios ambientais não se esgota nos procedimentos laboratoriais, pelo que estudos de biomonitorização podem igualmente recorrer a estes organismos. A espécie de peixe a utilizar deve ser boa bioindicadora (responsiva às condições do meio), e deve ter em conta os objetivos específicos do processo de biomonitorização (Zhou *et al.*, 2008).

Assim, um organismo teste ideal deverá sofrer facilmente alterações ao nível comportamental, fisiológico ou funcional. Estas alterações poderão ser selecionadas com *end-points* toxicológicos, pois alterações nestas funções biológicas poderão provocar uma perda da capacidade para a procura de alimentos, ou capacidade de fuga a predadores ou perda de desempenho ao nível reprodutivo (Oost *et al.*, 2003).

O peixe mosquito (*Gambusia holbrooki*), é um pequeno peixe dulçaquícola (2 - 2,5 cm nos machos e 5 - 6 cm nas fêmeas) (Cabral e Marques, 1999) pertencente à família *Poeciliidae*. É uma espécie que se encontra naturalmente distribuída pela costa este dos Estados Unidos da América, e que se encontra praticamente em todas as bacias da Península Ibérica (Nico e Fuller, 2013). É utilizado como um peixe controlador de mosquitos, evitando assim a transmissão de doenças (Cabral e Marques, 1999).

G. holbrooki é também conhecida como uma espécie invasora, que facilmente se adapta a meios com condições adversas, como sejam temperaturas muito elevadas ou com água pouco oxigenada (Cabral e Marques, 1999). É também uma espécie que apresenta uma alta fecundidade e pode ser considerado um consumidor secundário na cadeia alimentar aquática (Vargas e Sostoa, 1996).

Trata-se de um organismo eurialino, que consegue suportar variações de salinidade da água (Vargas e Sostoa, 1996) e que está presente em sistemas de água doce e estuários de regiões temperadas (Beandouin, 2007). Devido ao seu reduzido tamanho corporal é uma espécie de fácil manutenção laboratorial (Nunes *et al.*, 2008). É um organismo

muito utilizado para executar estudos experimentais dos efeitos dos poluentes químicos a diferentes níveis de organização biológica, desde o nível celular até ao populacional (Beandouin, 2007).

O sucesso da utilização de *G. holbrooki* como organismo teste em estudos ecotoxicológicos pode ser comprovado pelo número de publicações na literatura. Esta espécie foi já utilizada em estudos que visaram a avaliação dos impactos de tóxicos em biomarcadores enzimáticos (Nunes *et al.*, 2004, 2005), em ensaios comportamentais (Nunes *et al.*, 2008), em estudos genéticos e demográficos (Tatara *et al.*, 2002), bem como ao nível da reprodução (Edwards *et al.*, 2006).

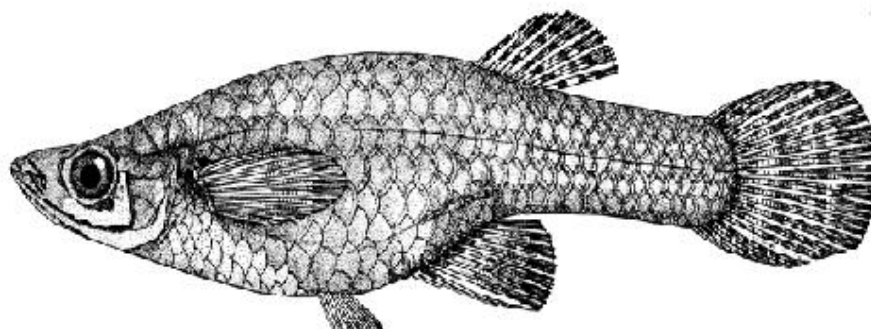


Fig.2. Ilustração de um animal pertencente à família *Poeciliidae* (adaptado de Coad, 2012)

II. Biomarcadores

II.1. Biomarcadores de monitorização ambiental

Atualmente a execução de uma análise ambiental ampla e global pode recorrer à utilização de biomarcadores, pois estes fornecem informação acerca dos efeitos biológicos dos poluentes, que pode dar indicações acerca do mecanismo toxicológico que o poluente poderá exercer sobre os organismos que se encontram em contacto com o mesmo. Assim, a utilização de biomarcadores vai para além da abordagem clássica, ao não apresentar apenas uma quantificação dos níveis de poluentes existentes no ambiente, mas sim qual a sua fração que está, de facto, disponível para exercer efeitos (McCarthy *et al.*, 1991).

Biomarcadores podem ser definidos como alterações bioquímicas, histológicas ou fisiológicas que podem ser provocadas por contaminantes, que estejam presentes em amostras biológicas ou num sistema (Timbrell, 1998). Ou seja, um biomarcador corresponde a uma alteração numa resposta biológica (molecular, celular, fisiológica ou comportamental) devido a uma exposição a algum contaminante químico (Peakall, 1994).

No entanto, nem todos os parâmetros biológicos poderão servir como biomarcadores em análise ambiental. A sensibilidade e a rápida resposta são duas características que estão inteiramente associadas à deteção rápida e prévia dos efeitos que um determinado poluente possa provocar num organismo, mesmo que os efeitos ainda não sejam observáveis ou ainda não sejam registados resultados que decorram da exposição ao poluente (Morgan *et al.*, 1999). Um biomarcador para ser considerado adequado deve possuir baixo custo, aplicabilidade em várias condições de teste e deve possuir índices de sensibilidade em relação à biodisponibilidade de diversos poluentes e às respostas biológicas precoces (Nunes *et al.*, 2008). São seis os critérios indispensáveis num biomarcador: a resposta do biomarcador deve ser sensível à exposição aos poluentes e aos efeitos que estes causam para que possam ser usados como parâmetro precoce de aviso; o teste para quantificar o biomarcador deve ser fiável, barato e de fácil execução; o mecanismo subjacente das relações entre o biomarcador e a exposição ao poluente, como dose e tempo deve ser padronizado; a base de dados do marcador deve ser definida para que se possa distinguir entre a variabilidade natural que será o ruído e o stress induzido pelos contaminantes que será o sinal; a significância toxicológica do biomarcador deve estar estabelecida; e por fim o impacto dos fatores que possam causar confusão na resposta entre o biomarcador também deve estar estabelecido (Oost *et al.*, 2003). Para além destes seis critérios, um sétimo pode ser acrescentado, pois um biomarcador deverá ser idealmente não invasivo ou não destrutivo para tornar mais fácil a monitorização ambiental dos efeitos que os compostos em estudo poderão exercer sob espécies que estejam em vias de extinção e que possuem um contacto permanente com o composto em causa (Fossi e Marsili, 1997).

É importante ter em conta que o efeito toxicológico provocado num organismo por um dado composto normalmente desencadeia uma cascata de respostas biológicas, em que cada uma dessas respostas poderá servir como biomarcador (McCarthy *et al.*, 1991).

Desta forma, reconhece-se que, com a utilização de biomarcadores, se obtém uma ampla visão do mecanismo de ação que o poluente em causa possui e quais os efeitos que possam provocar num organismo que a ele esteja exposto. Vários estudos efetuados em diversos organismos como peixes, mamíferos, moluscos, plantas, crustáceos e insetos, demonstraram que a utilização de biomarcadores para a execução de uma análise ambiental é bastante versátil, podendo ser monitorizados parâmetros específicos dependendo do estudo em causa (Nunes *et al.*, 2005, 2006). Então, os biomarcadores podem ser utilizados para diversas finalidades tendo sempre em conta o objetivo do estudo, o tipo de exposição e a interação da substância química com os recetores biológicos (Heberer, 2002).

Os biomarcadores podem ser divididos em três classes principais (Oost *et al.*, 2003). A primeira classe é a dos biomarcadores de exposição, que detetam e quantificam um composto poluente, os seus metabolitos ou interações que possam existir entre o composto ou os seus metabolitos e as moléculas ou células-alvo, sendo medidos num determinado compartimento do organismo em estudo. À segunda classe pertencem os biomarcadores de efeito, que detetam as alterações bioquímicas e fisiológicas, podendo ser avaliadas nos tecidos ou fluidos corporais e que possam ser associadas a possíveis patologias que se vão desenvolvendo no organismo em causa. A terceira classe inclui os biomarcadores de suscetibilidade, em que os fatores genéticos poderão estar na base da capacidade que um organismo tem em modificar a sua suscetibilidade a uma exposição (Oost *et al.*, 2003).

Diversos biomarcadores de efeito podem ser utilizados para o estudo do impacto dos diversos poluentes no mundo aquático, pois várias alterações podem-se fazer sentir na presença de um composto poluente. Para tal utilizam-se como ferramentas de pesquisa enzimas de biotransformação, sendo estas consideradas muito sensíveis; parâmetros de stress oxidativo, pela pesquisa das consequências provocadas pelos radicais livres de oxigénio ou de azoto, que podem inativar enzimas ou danificar o DNA; produtos da

biotransformação, pelo seu aumento nos fluidos corporais; proteínas resultantes do stress, metalotioneínas e resistência xenobiótica, sendo estas importantes para a proteção e reparação celular contra o stress e a toxicidade; parâmetros hematológicos, sendo avaliados o hematócrito, a hemoglobina, as proteínas, a glicose, bem como algumas hormonas específicas; parâmetros imunológicos, pois a imunidade celular pode estar diminuída pela presença de determinados compostos; parâmetros endócrinos e reprodutivos, ocorrendo uma alteração hormonal; parâmetros neuromusculares; parâmetros genotóxicos, pela alteração da estrutura do DNA e por fim através de parâmetros fisiológicos e morfológicos, que incluem a pesquisa de lesões tecidulares e alterações morfológicas como desenvolvimento de tumores ao nível tecidual (Oost *et al.*, 2003).

II.2. Biomarcadores da atividade enzimática

Os níveis ou as atividades de determinadas enzimas podem sofrer alterações na presença de compostos poluentes, podendo então ser utilizados como biomarcadores em diversos organismos aquáticos (Livingstone, 1991; Regoli *et al.*, 2002). As diversas substâncias presentes no ambiente aquático podem, quando em contacto com os organismos presente no meio, provocar uma indução enzimática (aumentando a capacidade metabólica) ou uma inibição enzimática (diminuindo a capacidade metabólica), sendo um alvo comum para a determinação de exposição a determinados compostos poluentes (Guimarães *et al.*, 2006).

De entre os biomarcadores enzimáticos mais frequentemente utilizados, destaca-se a quantificação da atividade de enzimas de biotransformação. As reações de biotransformação *in vivo* podem ser divididas em reações de fase I e de fase II, sendo estas reações catalisadas por enzimas biotransformadoras (Guimarães *et al.*, 2006). Considerando que muitos dos compostos poluentes ambientais carecem de metabolização prévia antes da sua eliminação, a utilização da atividade de enzimas de biotransformação poderá ser empregue com sucesso para o diagnóstico da exposição de organismos a estes compostos. Este tipo de reações (tanto de fase I como de fase II) modificam estrutural e quimicamente os compostos (incluindo os poluentes) dando origem a moléculas denominadas metabolitos, sendo estes geralmente mais polares e

consequentemente mais hidrossolúveis do que os compostos que lhes dão origem, facilitando assim a sua excreção. Tal ocorre pois os metabolitos passam a ter maior quantidade de grupos funcionais hidrofílicos, e maiores dimensões, do que o composto inicial, diminuindo a capacidade de passagem através das membranas biológicas (Guimarães *et al.*, 2006).

As reações de fase I envolvem hidrólises, reduções e oxidações, e constituem frequentemente um passo no sentido da preparação da molécula a eliminar para o que irá acontecer nas reações da fase II (Guimarães *et al.*, 2006). Este passo nem sempre corresponde a um aumento marcado da hidrossolubilidade do metabolito, pelo que este metabolito terá de ser sujeito a reações adicionais, de fase II, para que seja suficientemente hidrossolúvel e possa ser eliminado. Esse passo adicional corresponde às designadas reações de fase II, ou de conjugação, nas quais ocorrem reações de conjugação com substratos endógenos, formando-se compostos muito polares e hidrossolúveis, que são excretados facilmente pelos rins ou através das fezes. As reações de biotransformação ocorrem principalmente no fígado devido à multiplicidade de enzimas presentes neste órgão, bem como o elevado fluxo sanguíneo que o fígado possui (Guimarães *et al.*, 2006).

De entre as reações de fase II utilizadas em análises ambientais, assume particular importância a quantificação da atividade das isoenzimas glutathione-S-transferases. Nestas reações o que acontece é uma conjugação entre o tripéptido glutathione (ácido glutâmico-glicina-cisteína) pelo grupo sulfidrílico, com o carbono eletrofílico do agente tóxico poluente, sendo esta reação catalisada pelas referidas isoenzimas glutathione-S-transferases (Guimarães *et al.*, 2006). O conjugado daqui resultante pode ser rápida e eficazmente eliminado do organismo, por via aquosa.

II.3. Stress oxidativo e suas enzimas

A utilização de oxigénio molecular na maioria dos processos biológicos dos organismos aeróbios é um fator importante para o estudo dos efeitos toxicológicos causados pela exposição a múltiplos compostos por via ambiental (Dorval e Hontela, 2003).

Tal facto decorre da utilização de oxigénio que pode condicionar a formação de espécies reativas de oxigénio (ROS), que por sua vez podem causar danos irreversíveis, sendo então classificados como radicais livres de oxigénio potencialmente tóxicos (Regoli *et al.*, 2002).

As espécies reativas de oxigénio são fisiológica e constantemente produzidas nas células como subprodutos do metabolismo aeróbio. A produção de ROS decorre de fatores como a exposição a radiação e a luz UV, produção de peróxido de hidrogénio e oxigénio reduzido pelos macrófagos e fagócitos ativados, ou da interação do organismo com compostos poluentes (Droge, 2002; Hensley e Floyd, 2002).

Geralmente, a produção intracelular de ROS é controlada por agentes antioxidantes, que como o próprio nome indica, são compostos que atrasam ou impedem a oxidação de substratos oxidáveis (Halliwell e Gutteridge, 1989). Os agentes antioxidantes podem ser do tipo enzimático e não enzimático. Do tipo enzimático fazem parte a catalase, a superóxido dismutase e a glutathione peroxidase (Piao *et al.*, 2011); do tipo não enzimático fazem parte a vitamina C, E, β -caroteno, flavonoides, proteínas do plasma, selénio, glutathione, clorofilina, curcumina e L-cisteína (Bianchi e Antunes, 1999).

Na presença de compostos poluentes, pode ocorrer uma indução da produção intracelular de ROS principalmente através de mecanismos de ciclo redox e do metabolismo oxidativo, tendo em conta o complexo enzimático P450 (Halliwell e Gutteridge, 1989; Livingstone, 1991). As ROS podem provocar um conjunto de alterações ao nível dos lípidos membranares (provocando peroxidação lipídica), DNA e/ou proteínas, contribuindo então para alterações do pH e das concentrações intracelulares de cálcio podendo mesmo provocar a morte celular (Davies, 1995). Quando tal facto sucede podemos concluir que as moléculas antioxidantes estão em níveis diminutos (Halliwell e Gutteridge, 1989; Dorval e Hontela, 2003). Esta condição enquadra-se num cenário de stress oxidativo. O stress oxidativo é definido como um desequilíbrio que ocorre entre a produção de ROS e a sua destoxificação por sistemas biológicos que os consigam remover ou reparar danos celulares que poderão ser provocados pela sua presença (Halliwell e Gutteridge, 1989).

Nos últimos anos são vários os investigadores que estudam o metabolismo dos radicais livres, pois estes estão cada vez mais associados a diversos efeitos, como por exemplo o envelhecimento e algumas patologias (Halliwell e Gutteridge, 1989; Livingstone, 1991). A nível ambiental o stress oxidativo é igualmente importante como parâmetro toxicológico, pois a presença e exposição a compostos poluentes, pode causar uma indução da produção intracelular de ROS (Halliwell e Gutteridge, 1989; Livingstone, 1991), havendo conseqüentemente um conjunto de alterações que podem mesmo provocar a morte celular (Davies, 1995). Logo, a avaliação do stress oxidativo pode tornar-se numa ferramenta analítica importante para avaliar e diagnosticar alterações da saúde ambiental. Para tal, pode proceder-se ao estudo de diversas enzimas que fazem parte da defesa antioxidante da maioria dos organismos, tais como superóxido dismutase, catalase, glutathione-S-transferase, glutathione peroxidase, glutathione reductase (Regoli *et al.*, 2002). No caso da ocorrência de dano peroxidativo, nomeadamente ao nível dos lípidos membranares, a determinação dos níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (thiobarbituric acid reactive substances, TBARS) pode ser também importante (Regoli *et al.*, 2002).

II.3.1. Glutathione-S-transferases (GSTs)

As GSTs correspondem a um conjunto de isoenzimas, com um papel muito importante no que diz respeito à eliminação de compostos eletrofílicos, pois quando estes compostos são conjugados com o tripéptido glutathione a sua eliminação encontra-se muito mais facilitada (Gulick e Fahl, 1995; Armstrong, 1997; Halliwell e Gutteridge, 1999). Estas enzimas estão presentes na biotransformação de compostos poluentes ou substâncias endógenas nas reações de fase II (Halliwell e Gutteridge, 1991). Possuem na sua constituição proteínas diméricas solúveis e multifuncionais que têm a capacidade de se conjugar com moléculas eletrofílicas, tornando-as menos tóxicas (Habig *et al.*, 1974).

As GSTs também são biomarcadores de stress oxidativo, pois na presença de alterações nas concentrações das ROS, estas isoenzimas poderão sofrer alterações na sua expressão, tornando-se num indicador de que as células podem estar a desenvolver uma sensibilidade aos compostos pelos quais estão expostos (Regoli *et al.*, 2002).

II.3.2. Catalase

O peróxido de hidrogénio é um composto que resulta do metabolismo celular nos organismos que estão expostos ao oxigénio atmosférico (Nelson e Cox, 2005). Em cenários de stress oxidativo, a sua quantidade encontra-se substancialmente aumentada; quando o peróxido de hidrogénio existe em grandes quantidades, não existindo nenhum mecanismo compensatório que o elimine, pode desencadear o aparecimento de diversas patologias relacionadas com o stress oxidativo (Nelson e Cox, 2005). A catalase é uma enzima intracelular que decompõe o peróxido de hidrogénio em oxigénio e água, sendo muito importante na destoxificação deste composto. A catalase é uma enzima que se encontra dentro dos peroxissomas celulares e possui quatro cadeias polipeptídicas em que cada uma destas cadeias liga um grupo heme, possuindo cada heme um ião de ferro que reage com o peróxido de hidrogénio (Nelson e Cox, 2005).

II.3.3. TBARS

TBARS é o acrónimo para *thiobarbituric acid reactive substances* ou “substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico”, cuja quantificação permite que haja uma avaliação da extensão da peroxidação lipídica, que é um fator crucial para uma análise dos efeitos decorrentes de uma condição de stress oxidativo, bem como para verificar quais os danos causados nos lípidos membranares (Brandão *et al.*, 2011).

A peroxidação lipídica ocorre quando existe uma reação entre os lípidos insaturados (que estão presentes nas membranas celulares e nas lipoproteínas) e os radicais livres de oxigénio, constituindo assim uma reação base de stress oxidativo (Lima e Abdalla, 2001), pois estas reações podem desencadear vários processos como destruição celular, falência nos mecanismos de troca de metabolitos ou mesmo em situações extremas, a morte celular (Benzie, 1996). O produto final resultante do processo degradativo dos lípidos membranares pelos radicais livres é o malonildialdeído (MDA) (Buege e Aust, 1978). A quantificação do teor em MDA é indicativa da extensão da peroxidação lipídica (Buege e Aust, 1978).

III. Neurotoxicidade

As colinesterases são enzimas que pertencem à família das esterases, tendo estas a capacidade para hidrolisar ésteres carboxílicos (Gonçalves *et al.*, 2010). Estas enzimas apresentam um fator que as distingue das restantes esterases, visto que apresentam uma maior preferência para a hidrólise de ésteres de colina, em vez de outros ésteres carboxílicos e são inibidas pelo fisiostigmina (eserina) em concentrações na gama dos 10^{-5} M (Garcia *et al.*, 2000; Nunes *et al.*, 2003).

Na generalidade dos organismos, podem ser encontrados dois tipos de colinesterases: a acetilcolinesterase (AChE) ou colinesterase verdadeira ou específica (Xuereb *et al.*, 2009; Gonçalves *et al.*, 2010) e a butirilcolinesterase ou pseudocolinesterase (BChE), que se distinguem pela especificidade que têm para com os substratos e inibidores (Mora *et al.*, 1999; Sturm *et al.*, 1999; Monteiro *et al.*, 2005; Leticia e Gerardo, 2008).

A AChE tem como principal função fisiológica a regulação da transmissão nervosa (Xuereb *et al.*, 2009; Gonçalves *et al.*, 2010), e catalisa a hidrólise da acetilcolina (principal neurotransmissor nos sistemas sensoriais e neuromusculares na maioria dos animais (Xuereb *et al.*, 2009)), em ácido acético e colina (Garcia *et al.*, 2000; Leticia e Gerardo, 2008). Havendo uma inibição da acetilcolinesterase, haverá uma acumulação de acetilcolina nas sinapses nervosas e uma interrupção da transmissão nervosa, provocando uma estimulação excessiva do sistema nervoso central e periférico. Consequentemente, ocorrerão efeitos neurotóxicos para os organismos expostos a agentes que perturbem a função acetilcolinesterásica (Nunes *et al.*, 2003; Xuereb *et al.*, 2009; Gonçalves *et al.*, 2010).

Assim, cada vez mais os ecotoxicologistas procedem à monitorização da atividade da enzima acetilcolinesterase nos organismos aquáticos, para uma avaliação da exposição dos mesmos a compostos poluentes, nomeadamente os que reconhecidamente possuem ação anticolinesterásica, como pesticidas, metais, detergentes e fármacos (e.g. Nunes *et al.*, 2003; Sismeiro-Vivas *et al.*, 2007; Feng *et al.*, 2008; Ballesteros *et al.*, 2009).

IV. Objetivos

O principal objetivo deste projeto de Pós-Graduação/Dissertação foi determinar os efeitos toxicológicos, ao nível histológico e enzimático/bioquímico, decorrentes da exposição aguda do peixe dulçaquícola *Gambusia holbrooki*, a concentrações ecológicamente relevantes do composto ativo piritionato de zinco.

V. Material e Métodos

V.1. Captura dos organismos

A captura de exemplares de *Gambusia holbrooki*, ocorreu em Outubro de 2012 na Pateira de Fermentelos (40° 34' 48'' N, 8° 31' 12'' W). A Pateira de Fermentelos é uma lagoa natural, sendo considerada a maior da Península Ibérica (Ferreira *et al.*, 2003) e está localizada entre Águeda, Aveiro e Oliveira do Bairro. Faz parte da bacia hidrográfica do Rio Cértima e da bacia hidrográfica do rio Águeda (Ahmad *et al.*, 2006). Trata-se de um ecossistema rico em fauna, flora e diferentes espécies aquáticas (Ferreira *et al.*, 2003). Os animais foram capturados da margem com a ajuda de uma rede de camaroeiro (rede de mão). Após a captura, os peixes foram colocados em arcas com água da Pateira de Fermentelos e arejamento, e imediatamente transportados para o laboratório. Os peixes foram medidos e selecionados para utilização nos testes de exposição, aqueles cujo tamanho se situasse entre 2 e 2,5 cm (machos e fêmeas inférteis).

Posteriormente, os animais ficaram em quarentena durante 15 dias num aquário. O meio selecionado foi água da torneira previamente desclorinada, à qual se adicionou cloreto de sódio (6 g/l) com o intuito de minimizar a probabilidade de contaminação por fungos. Os animais foram mantidos com arejamento contínuo, a uma temperatura de 20±1°C, fotoperíodo de 16hD:8hN e alimentação diária *ad libitum* com ração comercial (Sera Vipán®).

V.2. Teste in vivo de exposição aguda (96 horas)

O ensaio seguiu as orientações constantes na norma OECD nº 203 (OECD, 1992), mas com as seguintes alterações: os peixes foram expostos de forma individual em garrafas de plástico (Fig.3) previamente utilizadas para consumo de água, que foram devidamente lavadas com água desionizada e posteriormente cheias até 200 ml com água desclorinada e com aerificação contínua.

Foram utilizados 8 peixes para cada concentração (baixa, média e alta), incluindo os grupos controlo, em que 5 foram utilizados para as determinações enzimáticas e 3 para as determinações histopatológicas. A solução mãe de piritionato de zinco foi preparada com água desionizada tendo uma concentração de 1mg/l.

As concentrações testadas foram de 40, 80 e 160 µg/l, incluindo um controlo em que os animais não estavam expostos ao composto em estudo. Durante o tempo de ensaio (96h) não foi fornecido nenhum alimento aos animais. O ensaio decorreu com arejamento contínuo, fotoperíodo controlado (16hD8hN) e uma temperatura de 20±1°C. Cada peixe foi exposto individualmente num volume de 200 ml de meio.

Realizou-se uma observação às 0, 24, 48 e 72 horas para verificar a existência de alguma alteração nos animais em estudo, tendo o meio sido mudado às 48 horas. Todo o ensaio ocorreu na obscuridade para evitar a fotodegradação do piritionato de zinco, tendo sido diariamente retirados do aquário peixes que apresentassem alguma patologia aparente, ferimento ou que estivessem mortos. A taxa de mortalidade foi inferior a 10% no grupo controlo (OCDE, 1984, 1992, 2000).



Fig.3. Esquema utilizado para a exposição da *Gambusia holbrooki* ao piritionato de zinco

V.3. Determinações enzimáticas

Findo o período de exposição, os animais foram sacrificados por decapitação em gelo com tampão fosfato. Posteriormente procedeu-se à remoção dos órgãos (fígado, cabeça e músculo) que foram homogeneizados com homogeneizador rotativo, em tampão fosfato 50 mM; pH=7 com 0,1% de Triton X-100 e colocados em tubos de eppendorf. Os tecidos homogeneizados foram centrifugados a 15000g durante 10 minutos a uma temperatura de 4°C (Nunes *et al.*, 2008). As amostras foram devidamente rotuladas e congeladas a -80°C.

V.3.1. GSTs, Catalase e TBARS

A atividade das isoenzimas GSTs pode ser determinada espectrofotometricamente a um comprimento de onda de 340 nm por um método adaptado a microplaca, pois as isoenzimas GSTs catalisam a conjugação do substrato cromogénico CDNB (1-cloro-2,4-dinitrobenzeno) com a glutatona na sua forma reduzida (GSH) formando um tioéter, sendo este o composto sujeito a uma monitorização. Os resultados obtidos são

expressos em nanomoles do tioéter produzido por minuto, por miligrama de proteína (Habig *et al.*, 1974).

A catalase é uma enzima que apresenta uma dupla funcionalidade, pois esta é responsável pela decomposição de H_2O_2 e pela oxidação de dadores de hidrogénio (metanol, ácido fórmico e fenóis) com atividade peroxídica, ou seja com consumo de peróxido (Aebi, 1984).

O princípio do método utilizado para determinação da atividade da catalase consiste na monitorização da decomposição de H_2O_2 a 240 nm, em que a diferença em absorvância ($\Delta 240$) por unidade de tempo é uma medida da atividade da enzima (Aebi, 1984).

Para análise da extensão da peroxidação lipídica, quantificou-se o teor de MDA através da medição da absorvância a 535 nm referente ao produto corado que resulta da reação que ocorre entre o malonildialdeído (MDA) e o 2-ácido tiobarbitúrico (TBA) (Buege e Aust, 1978).

V.3.2. Acetilcolinesterase

Uma das funções da AChE é catalisar a hidrólise da acetilcolina (principal neurotransmissor nos sistemas sensoriais e neuromusculares na maioria dos animais (Xuereb *et al.*, 2009)), em ácido acético e colina (Garcia *et al.*, 2000; Nunes *et al.*, 2003; Leticia e Gerardo, 2008), este último produto complexa com o DTNB (ditiobisnitrobenzoato), dando origem a um composto corado de coloração amarela, cuja formação pode ser determinada a 412 nm. Este processo irá ser responsável por um aumento da intensidade da coloração e da absorvância (Ellman *et al.*, 1961).

V.3.3. Quantificação da proteína total

O método de Bradford (1976) foi o utilizado para a quantificação das proteínas solúveis totais nas amostras em estudo, utilizando a γ -globulina como padrão, de forma a expressar a atividade enzimática em função do conteúdo proteico das amostras. Nesta reação o que acontece é uma ligação de um corante (reagente de Bradford) à proteína

solúvel total, dando origem a um complexo corado e estável de forma a ser quantificado a 595 nm.

V.4. Determinação histopatológica

Os 3 peixes utilizados para análise histopatológica foram mergulhados inteiros em solução de Bouin durante 24 horas para que ocorresse a fixação química. Posteriormente, sofreram um processo de descalcificação e desidratação através de soluções de álcool tendo estas graduações crescentes (70%, 80%, 90% e 100%), foram incluídos em parafina a uma temperatura entre os 56 e 58°C e seccionados (5-7µm) num micrótomo manual rotativo no plano lateral. Seguidamente corou-se as secções com hematoxilina-eosina montou-se em DPX e foram avaliados por microscopia ótica convencional (Olympus, CX41). As brânquias foram avaliadas a 100 e 200X, e o fígado a 100 e 400X.

O método utilizado para avaliação qualitativamente e semi-quantitativamente das alterações histopatológicas foi o de Bernet *et al.* 1999. As alterações foram classificadas em seis categorias principais (distúrbios circulatórios, proliferativos, degenerativos, inflamatórios, estruturais e citoplasmáticos). No cálculo do índice patológico foi atribuído um grau de severidade às alterações (1 a 6) com base na % da área afetada. Também foram atribuídos fatores de importância (1 a 3) a cada alteração como medida avaliativa do grau de impacto sobre o peixe. O índice branquial e hepático resultou no somatório: Índice Patológico = \sum fator de importância x grau de impacto (Bernet *et al.*, 1999).

V.5. Análise estatística

Cumpridos os pressupostos da distribuição normal dos dados e homogeneidade de variâncias, nalguns casos por logaritmização, os resultados obtidos das análises enzimáticas foram analisados através de uma análise de variância unifatorial (One-Way Anova), seguida, quando necessário ($P < 0,05$), de um teste de Dunnett para assim se verificar a ocorrência de diferenças significativas dos grupos expostos em relação ao tratamento controlo. O nível de significância utilizado foi de 0,05. Os dados são

apresentados com média e respectivo erro padrão. As análises foram realizadas com recurso ao Sigmaplot 11.

VI. Resultados

VI.1. Determinações enzimáticas

VI.1.1. Acetilcolinesterase

A atividade da acetilcolinesterase não sofreu alteração após exposição às concentrações selecionadas ($F= 0,65$; g.l. = 3;16; $p= 0,589$).

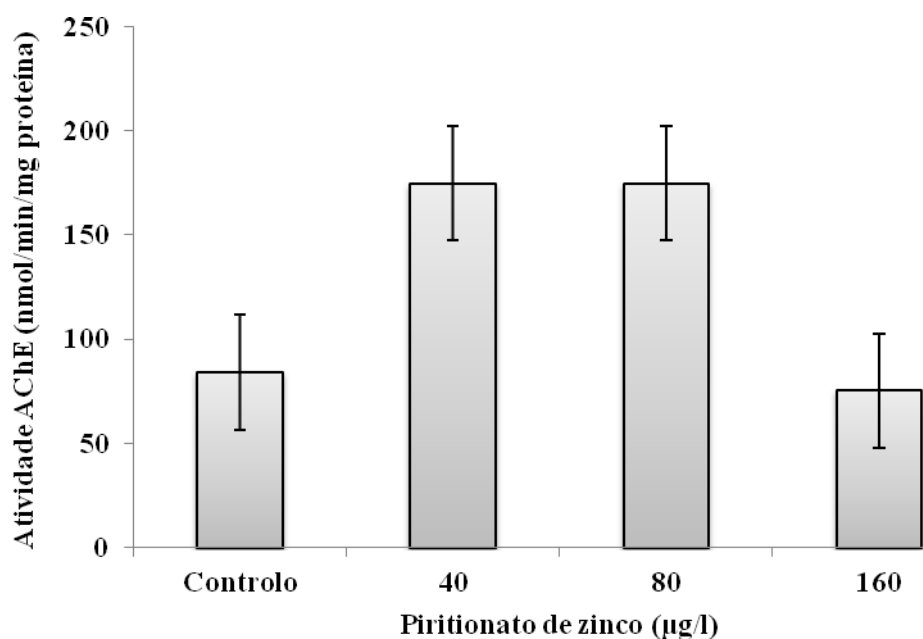


Fig.4. Efeito do piritionato de zinco na atividade da enzima AChE na cabeça total de *G. holbrooki*. As barras correspondem à média de 5 animais, incluindo as respetivas barras do erro padrão

VI.1.2. GSTs

Após a observação da Fig. 5 podemos verificar que ocorreu efeito do piritionato de zinco na atividade da enzima GST no fígado, pois na concentração de 80 µg/l obteve-se um resultado significativamente diferente comparativamente com o controle, com um acentuado aumento da atividade das GSTs (One-Way ANOVA: F= 4,44; g.l.= 3;14; p= 0,022).

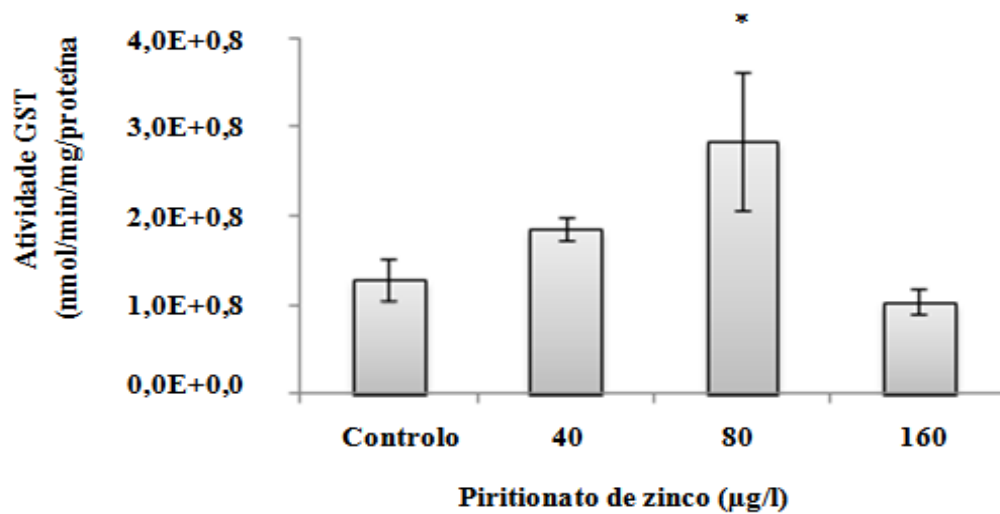


Fig.5. Efeito do piritionato de zinco na atividade das isoenzimas GSTs no fígado de *G. holbrooki*. As barras correspondem à média de 5 animais, incluindo as respectivas barras do erro padrão. * - diferenças significativas em relação ao controle, p<0,05

VI.1.3. Catalase

Com a observação do gráfico apresentado (Fig. 6) constata-se que a catalase não sofreu qualquer alteração significativa na sua atividade após exposição às concentrações testadas (40, 80 e 160 $\mu\text{g/l}$), embora tenha havido um aumento da sua atividade comparada com o controlo, mas sem significado estatístico (OneWay ANOVA: $F = 1,90$; g.l. = 3;16; $p = 0,17$).

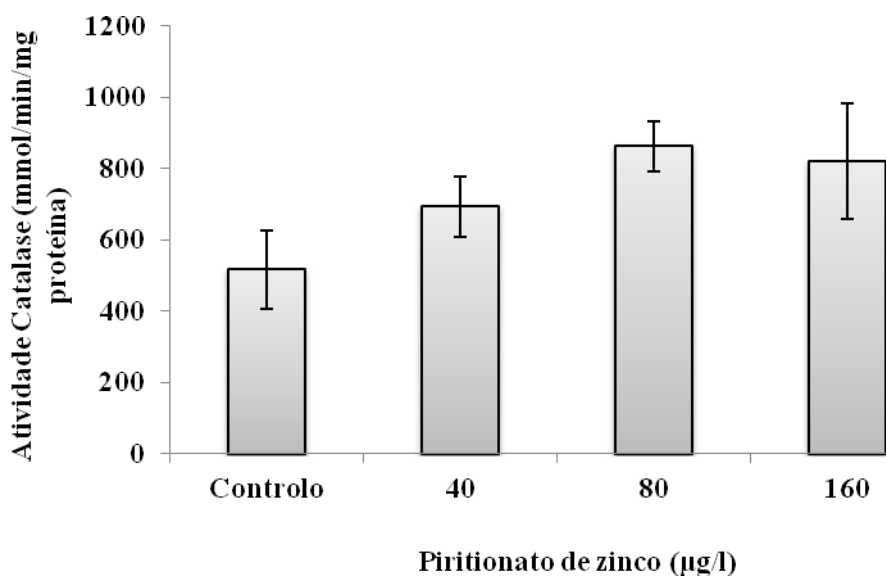


Fig.6. Efeito do piritionato de zinco na atividade da enzima Catalase no fígado de *G. holbrooki*. As barras correspondem à média de 5 animais, incluindo as respetivas barras do erro padrão

VI.1.4. TBARS

Neste ensaio não ocorreu qualquer tipo de alteração significativa da concentração TBARS nos diferentes grupos experimentais (One-Way ANOVA: $F = 0,36$; g.l. = 5;12; $p = 0,86$).

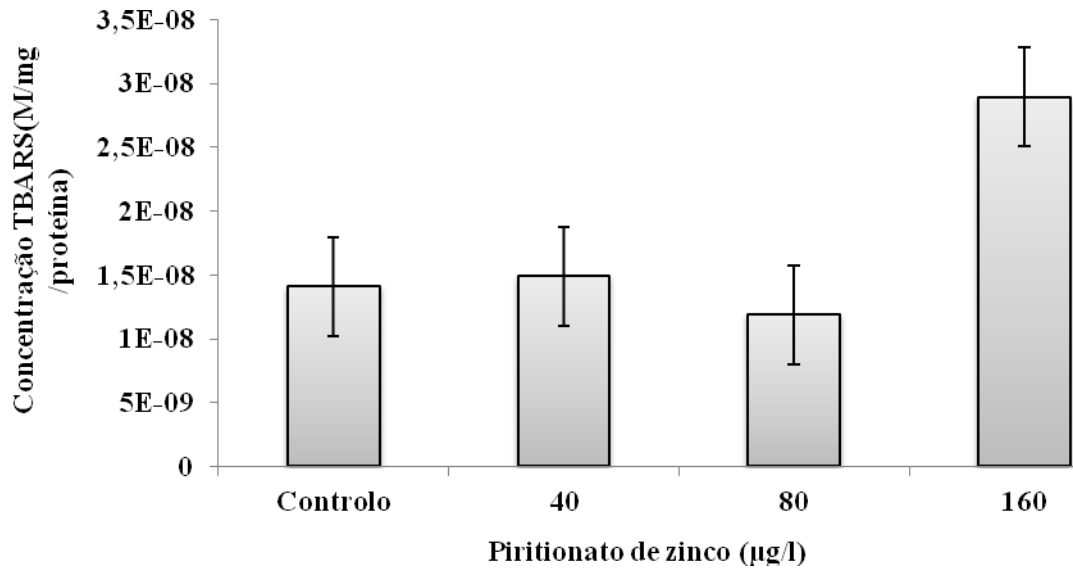


Fig.7. Efeito do piritionato de zinco na concentração de TBARS no músculo de *G. holbrooki*. As barras correspondem à média de 5 animais, incluindo as respetivas barras do erro padrão

VI.2. Análise histopatológica

A *Gambusia holbrooki* sofreu uma exposição aguda a diferentes concentrações de piritionato de zinco, verificando-se a ocorrência de alterações histopatológicas, tais como fusão das lamelas secundárias (Fig.8B), levantamento epitelial (Fig.8C) e hipertrofia e fusão lamelar (Fig.8D).

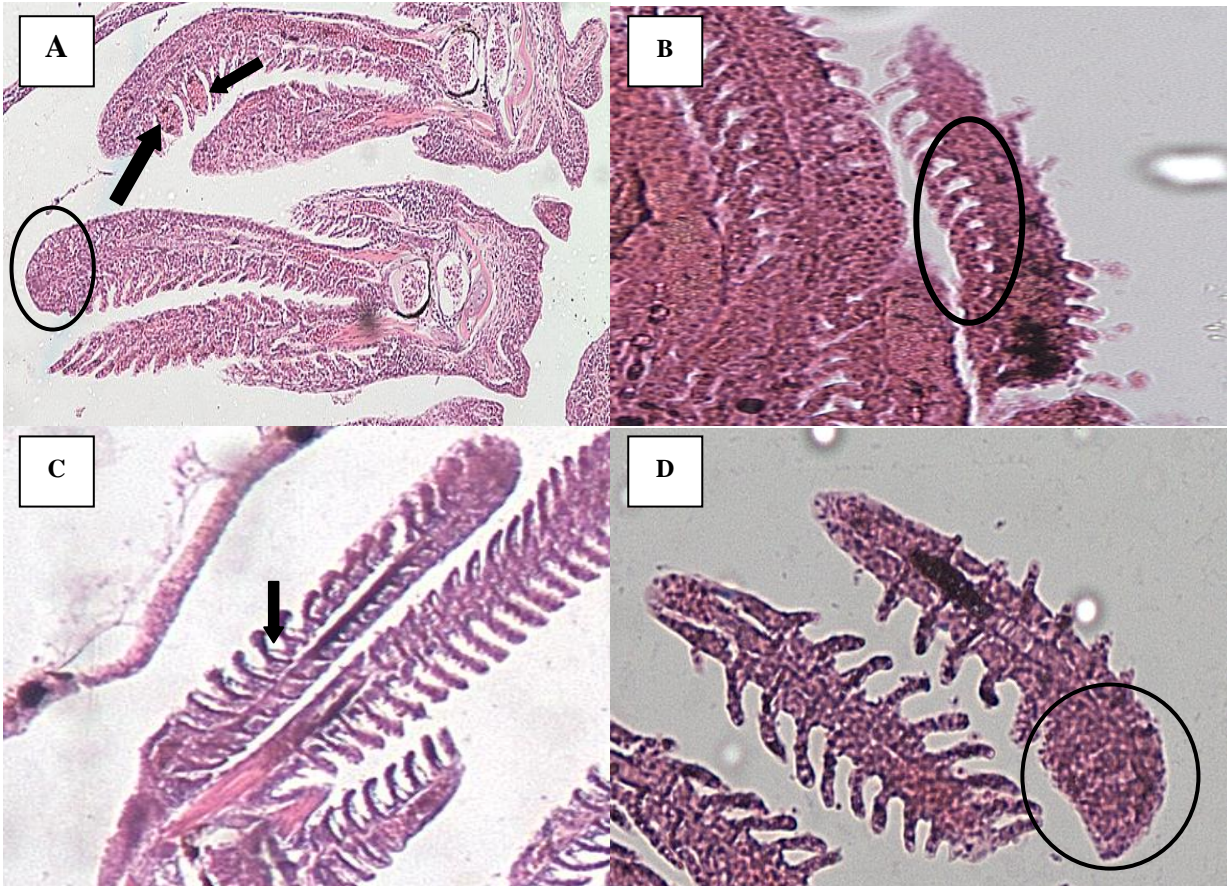


Fig.8. Imagem da histologia branquial de *G. holbrooki*. A- grupo controle com sinais de aneurismas (setas) e hiperplasia (círculo); B- fusão das lamelas secundárias (círculo) (40 µg/l); C- levantamento epitelial branquial (seta) (80 µg/l); D- hipertrofia e fusão lamelar (círculo) (160 µg/l)

A morfologia estrutural do tecido hepático nos animais do grupo controlo encontra-se com sinais de vacuolização (Fig.9A) e alargamento de sinusóides (Fig.9A). Quando os animais foram expostos às diversas concentrações testadas de piritionato de zinco, a vacuolização e o alargamento dos sinusóides mantiveram-se, tendo sido detetados alguns núcleos picnóticos (Fig.9B), necrose tecidular (Fig.9C), congestionamento sanguíneo e sinais inflamatórios (Fig.9D).

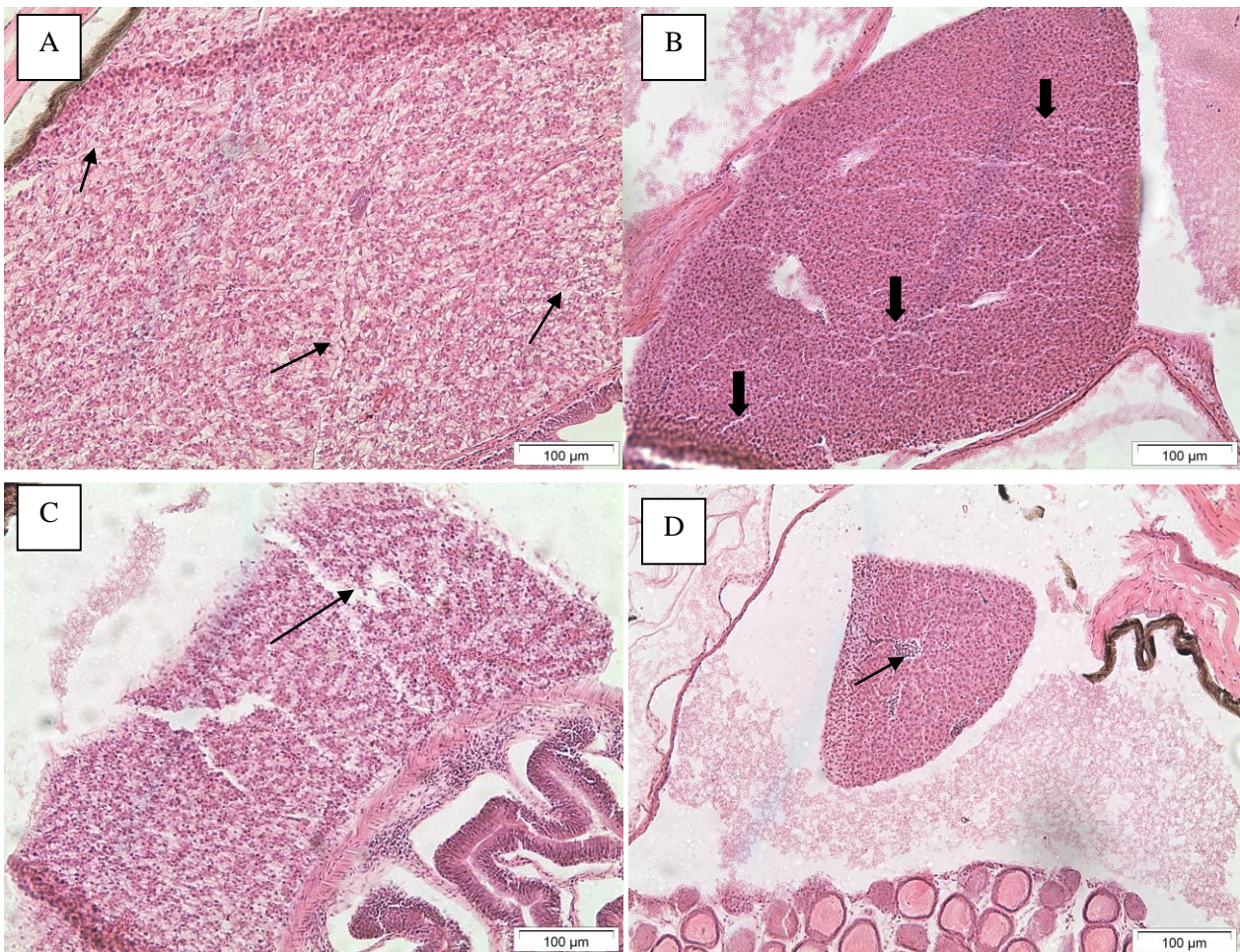


Fig.9. Imagem da histologia do fígado de *G. holbrooki*. A- grupo controlo com sinais de vacuolização (setas); B- presença de núcleos picnóticos e alargamento de sinusóides (setas) (80 µg/l); C- sinais de necrose (80 µg/l); D- sinais inflamatórios (40 µg/l)

VI.3. Determinação histopatológica

Não se obteve nenhum resultado significativamente diferente ao nível do índice patológico nas brânquias nos diferentes grupos experimentais (One-Way ANOVA: $F=1,95$; g.l.= 3,8; $p=0,201$) (Fig. 10).

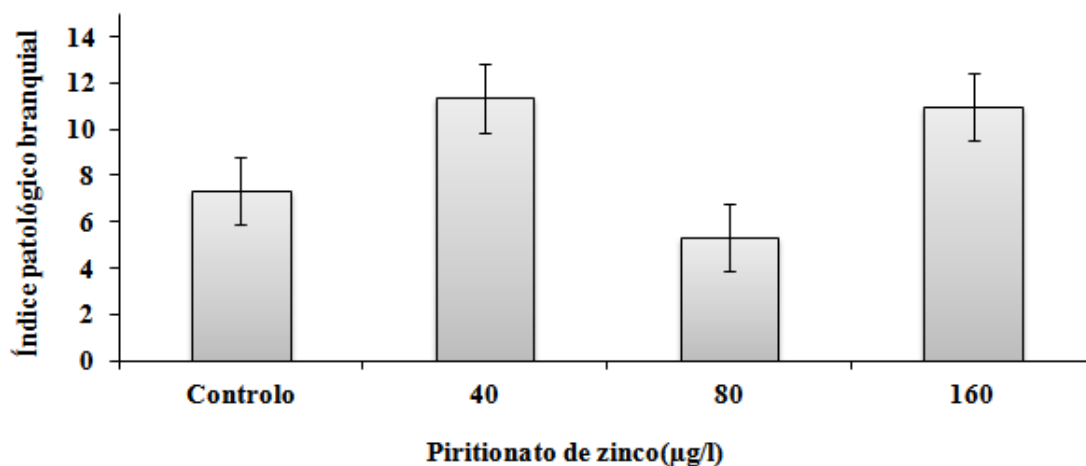


Fig.10. Índice patológico das brânquias. As barras correspondem à média de 3 animais, incluindo as respetivas barras do erro padrão

Também o índice patológico no fígado não evidenciou alterações significativas entre grupos experimentais (One-Way Anova: $F=0,74$; g.l.= 3,8; $p=0,553$) (Fig. 11).

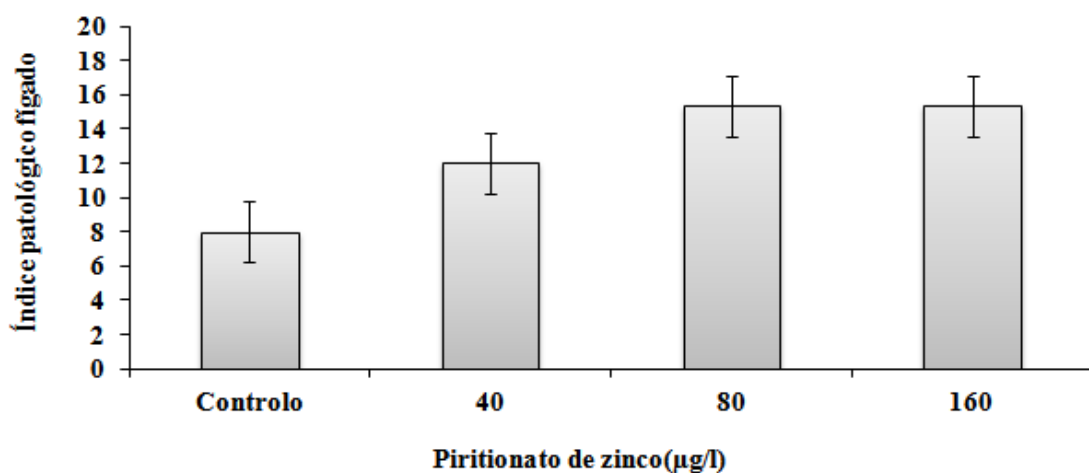


Fig.11. Índice patológico do fígado. As barras correspondem à média de 3 animais, incluindo as respetivas barras do erro padrão

VII. Discussão

VII.1. Neurotoxicidade

A AChE tem como principal função fisiológica a regulação da transmissão nervosa (Xuereb *et al.*, 2009; Gonçalves *et al.*, 2010), catalisando a hidrólise da acetilcolina (principal neurotransmissor nos sistemas sensoriais e neuromusculares na maioria dos animais) na fenda sináptica (Xuereb *et al.*, 2009), em ácido acético e colina (Garcia *et al.*, 2000; Leticia e Gerardo, 2008). Os resultados obtidos demonstram não ter havido qualquer inibição da atividade da acetilcolinesterase nas concentrações testadas.

VII.2. Stress oxidativo

As GSTs correspondem a um conjunto de isoenzimas, com um papel muito importante no que diz respeito à eliminação de compostos eletrofílicos, pois quando estes compostos são conjugados com o tripéptido glutationa a sua eliminação encontra-se facilitada por aumento da hidrossolubilidade (Gulick e Fahl, 1995; Armstrong, 1997; Halliwell e Gutteridge, 1999). Estas enzimas participam na biotransformação de múltiplos compostos, incluindo poluentes, fármacos ou substâncias endógenas, por intermédio das reações de conjugação ou de fase II (Halliwell e Gutteridge, 1991). Possuem na sua constituição proteínas diméricas solúveis e multifuncionais que têm a capacidade de se conjugar com moléculas eletrofílicas, tornando-as menos tóxicas (Habig *et al.*, 1974). Segundo os estudos de Hayes *et al.* (1999, 2005), as GSTs pertencem a um grupo de enzimas consideradas como parte integrante de um mecanismo de defesa dinâmico e interativo que protege os organismos expostos a químicos citotóxicos e eletrofílicos, servindo como transportador para remover todos os conjugados de glutationa (Hayes *et al.*, 1999, 2005). Uma interpretação relativa ao aumento da atividade deste biomarcador observado no presente estudo prende-se com o seu papel como facilitador na excreção de compostos electrofílicos (Gulick e Fahl, 1995; Armstrong, 1997; Halliwell e Gutteridge, 1999). Nas duas primeiras concentrações, a atividade deste biomarcador teve tendência a aumentar, sendo que na concentração de 80 µg/l se constatou uma alteração significativamente diferente em relação ao controlo, sem uma associação evidente entre dose-efeito. Logo, é possível

sugerir que nos organismos expostos ao piritionato de zinco poderá ter-se iniciado um processo de destoxificação do mesmo por via da conjugação com glutathione, pelo que é possível que esta enzima tenha sofrido indução que resultou num aumento da sua atividade, com conseqüente aumento da eficácia do processo de conjugação com glutathione (Oyama *et al.*, 2012).

Apesar do zinco ser genericamente um composto com propriedades antioxidantes (Franco *et al.*, 2009), o piritionato de zinco, em concentrações baixas, evidenciou um comportamento contrário (Oyama *et al.*, 2012). Assim, é de supor que o aumento da atividade das GSTs possa, no presente caso, dever-se à necessidade de contrariar o stress oxidativo causado pelo piritionato de zinco. Embora os resultados aqui obtidos não sejam totalmente indicativos da ocorrência de stress oxidativo, tal facto não é de descartar. O estudo conduzido por Rudolf e Cervinka (2011) demonstrou que o piritionato de zinco tem uma capacidade de induzir stress oxidativo em fibroblastos da pele humana, e a probabilidade de tal ocorrer aumenta para concentrações mais altas. No entanto, na concentração de 160 µg/l a atividade enzimática teve tendência a diminuir, e voltar aos níveis reportados para o tratamento controlo; tal facto pode ser explicado, como uma conseqüência da inativação direta das enzimas GSTs pelas espécies reativas de oxigénio formadas após o metabolismo dos compostos poluentes (Martinez-Lara *et al.*, 1996) podendo a mesma situação ser reportada para o piritionato de zinco.

A catalase é uma enzima que atua no sentido de dismutar o peróxido de hidrogénio em água e oxigénio, para assim o eliminar (Nelson e Cox, 2005). No presente estudo não se obtiveram alterações significativas relativamente à atividade da enzima catalase, o que indicia que não houve incremento deste mecanismo de defesa em particular, ou que a produção de H₂O₂ não foi favorecida pela exposição ao piritionato de zinco. Embora não se tenham obtido diferenças significativas relativamente ao tratamento controlo, a atividade da catalase nas duas primeiras concentrações teve tendência a aumentar. O aumento da concentração de piritionato de zinco pode conduzir a um aumento da citotoxicidade do H₂O₂ (Oyama *et al.*, 2012); tal facto configura um indicativo de stress oxidativo sugerido pelos resultados obtidos pela GSTs, com o envolvimento da enzima catalase no sentido de o controlar.

Um dos efeitos deletérios decorrentes de quadros de stress oxidativo é a peroxidação lipídica, que ocorre por intermédio dos ROS na presença de lípidos insaturados membranares (Lima e Abdalla, 2001), em que como produto final se obtém malonildialdeído (MDA). Este é o produto quantificado para avaliação da extensão da peroxidação lipídica (Tarladgis *et al.*, 1960; Buege e Aust, 1978; Shahidi e Hong, 1991; Papastergiadis *et al.*, 2012) no ensaio dos TBARS. Nas três concentrações testadas não se obteve qualquer alteração significativa dos níveis de TBARS relativamente ao controlo. Tal facto está em linha com os resultados obtidos para o biomarcador catalase, que indicam não ter havido nenhum cenário evidente de stress oxidativo. Assim, é pouco provável que tenha ocorrido peroxidação lipídica, não havendo formação de uma quantidade suficiente de MDA para sustentar diferenças relativamente aos organismos controlo.

VII.3. Alterações histopatológicas

As brânquias e o fígado são responsáveis por funções vitais nos organismos vivos, visto serem responsáveis pela respiração, osmorregulação, excreção e acumulação ou biotransformação de compostos poluentes nos peixes (Campagna *et al.*, 2007; Carrola *et al.*, 2009). Ao utilizar biomarcadores histopatológicos, mais facilmente se procede a uma monitorização do meio ambiente (Camargo e Martinez, 2007), pois as alterações histológicas aparecem como uma resposta aos efeitos sub-letais dos xenobióticos aos quais os organismos estão expostos, tornando-se num método rápido para a sua quantificação (Bernet *et al.*, 1999). A avaliação histopatológica nos peixes apresenta algumas desvantagens, pois existe normalmente uma falta de especificidade das lesões e das alterações provocadas pelos compostos poluentes. Outra dificuldade apresentada é a terminologia e a identificação das lesões nos tecidos dos peixes, visto estes serem menos estudados que a espécie humana (Costa *et al.*, 2009). Existe contudo a possibilidade de usar escalas de valores para lesões específicas de acordo com o impacto do composto poluente no peixe exposto conseguindo desta forma efetuar uma abordagem semi-quantitativa (Costa *et al.*, 2009). A avaliação histopatológica é um biomarcador crucial em termos de exposição e efeito, e tal facto foi demonstrado por Cengiz e Ünlü (2003) pela avaliação histopatológica do dano causado pelo malatião no tecido branquial da *Gambusia affinis*.

A análise qualitativa das alterações histopatológicas permitiu verificar que os organismos expostos ao piritionato de zinco sofriam alterações tais como levantamento epitelial, fusão das lamelas secundárias, edemas e hiperplasias. Embora estas alterações não sejam específicas e possam ser induzidas por diversos contaminantes (Mallat *et al.*, 1985), são descritas como um mecanismo de proteção ou defesa, pois haverá uma diminuição da área de superfície das brânquias, havendo então uma redução do contacto com o agente poluente (Richmonds e Dotta, 1989).

Os resultados obtidos no nosso estudo também foram verificados por Coutinho e Gokhle (2000), num estudo efetuado em brânquias de carpas (*Cyprinus carpio*) e tipálias (*Oreochromis mykiss*) que foram expostas ao efluente de uma estação de tratamento de águas residuais; Camargo e Martinez (2007), também obtiveram levantamentos epiteliais em brânquias de peixes expostos a metais e a contaminantes orgânicos. Outro estudo em que se verificou fusão lamelar, edema e levantamento de camadas epiteliais foi o de Álvarez-Muñoz *et al.* (2009), pela exposição das brânquias de *Solea senegalensis*, a um tensioativo aniónico.

Relativamente ao índice patológico nas brânquias (análise semi-quantitativa) não se obteve nenhum resultado significativamente diferente entre os diferentes grupos experimentais.

O fígado é o órgão mais importante no processo de destoxificação, e tal facto deve-se à sua posição interposta na circulação porta-hepática, sendo como tal dos órgãos mais afetados pelos contaminantes que estejam presentes na água (Camargo e Martinez, 2007). Assim, o tecido hepático pode ser utilizado como biomarcador histopatológico (Lang *et al.*, 2006). Diversos estudos verificaram alterações histológicas no fígado em peixes, após exposição a compostos poluentes. Olurin *et al.* 2006 demonstrou que o tecido hepático do peixe africano *Clarias gariepinus* após exposição a um herbicida (glifosato) sofreu alterações como o aumento do tamanho dos hepatócitos, aumento do tamanho do núcleo e núcleos picnóticos, aumento da densidade do tecido conjuntivo e vacuolização. Zha *et al.* (2007), após ter exposto *Gabiocypris rarus* a compostos octilfenólicos e etinilestradiol também verificou a existência de acumulação lipídica no citoplasma, hipertrofia dos hepatócitos e um aumento do tamanho nuclear.

Nos animais expostos ao piritionato de zinco, foram detetadas algumas alterações como núcleos picnóticos, alargamento dos sinusóides, vacuolização, necrose e sinais de inflamação. No entanto, não se obteve nenhum resultado significativamente diferente na determinação do índice patológico do fígado entre grupos experimentais.

Importante será de referir que os peixes controlo apresentaram um parênquima hepático com algumas alterações como vacuolização e o tecido branquial com sinais de aneurismas e hiperplasia este tipo de alterações podem dever-se ao facto de a Pateira de Fermentelos (local de captura dos peixes) ser um local onde os peixes estão expostos a um número considerável de agentes poluentes, não sendo por vezes o tempo de quarentena suficiente para que o animal fique apto para responder ao ensaio a efetuar, influenciando assim os resultados obtidos.

VIII. Conclusão

Atualmente vivemos num momento de constante evolução da indústria química e farmacêutica, havendo cada vez mais o desenvolvimento de novos grupos de agentes biocidas com uma vasta multiplicidade de ações, sendo assim utilizados em diversas áreas, incluindo embarcações comerciais e de recreio, plataformas petrolíferas, tubulações submarinas, tanques destinados à aquicultura (Yebra *et al.*, 2004), bem como em champôs para o tratamento da caspa e seborreia (Schwartz *et al.*, 2011). Inevitavelmente a utilização destes compostos contribui para um aumento da sua dispersão pelo meio ambiente (Guardiola *et al.*, 2012), com aumento do número de organismos não-alvo expostos, e da duração e frequência dessa mesma exposição.

Assim, é de esperar que os efeitos ecotoxicológicos se tornem mais pronunciados, tornando-se necessário efetuar ensaios de toxicidade realizados em ambiente laboratorial com organismos aquáticos, para assim se proceder a uma avaliação de possíveis danos ambientais (Fent *et al.*, 2006).

Pela avaliação histológica conclui-se que as brânquias e o fígado são bons biomarcadores para serem utilizados na avaliação das alterações ao nível tecidual em peixes expostos ao piritionato de zinco, pois alterações histopatológicas foram

evidenciadas nas brânquias e no fígado dos organismos expostos. Geralmente, as brânquias e o fígado são os órgãos mais utilizados como marcadores primários para a avaliação da poluição aquática, pois as brânquias apresentam uma grande área de contacto com a água, notando-se obviamente um evidente contacto direto com o composto poluente (Wood e Soivio, 1991; Bernet *et al.*, 1999), e o fígado é o órgão responsável pela metabolização e excreção dos xenobióticos (Camargo e Martinez, 2007).

Relativamente à avaliação enzimática, só a atividade das GSTs nos indicou a ocorrência de alguma alteração de carácter oxidativo provocado pelo piritionato de zinco visto que, para os outros parâmetros utilizados não se obtiveram resultados significativamente diferentes relativamente aos animais controlo.

No entanto, é necessário ter em conta que a utilização de um ensaio agudo não é o ideal para a obtenção de resultados precisos sobre os efeitos de contaminantes nas espécies em estudo. As exposições crónicas são mais representativas do tempo de exposição dos peixes aos compostos poluentes em situações reais. Assim, será mais provável que no habitat natural ocorram exposições crónicas a compostos poluentes (Nunes *et al.*, 2008).

IX. Bibliografia

Aebi, H. (1984). Catalase in vitro. *Methods in Enzymology*, 6, pp. 105-121.

Ahmad, I., Pacheco, M., Santos, M. (2006). *Anguilla anguilla* L. oxidative stress biomarkers: an in situ study of freshwater wetland ecosystem (Pateira de Fermentelos, Portugal), *Chemosphere*, 65, pp. 952-962.

Álvarez- Muñoz, D., Gómez-Pana, A., Blasco, J., Sarasquete, C., González-Mazo, E. (2009). Oxidative stress and histopathology damage related to the metabolism of dodecylbenzene sulfonate in Senegalese, *Chemosphere*, 74, pp. 1216-1223.

Armstrong, N. (1997). Structure, catalytic mechanism, and evolution of the glutathione transferases, *Chemical Research in Toxicology*, 10, pp. 2-18.

Ayas, Z., Ekmekci, G., Ozmen, M., Yerli, V. (2007). Histopathological changes in the livers and kidneys of fish in Sariyar Reservoir, Turkey, *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 23, pp. 242-249.

Ballesteros M. L., Durando P. E., Nores M. L., Días M. P., Bistoni M. A., Wunderlin D. A. (2009). Endosulfan induces changes in spontaneous swimming activity and acetylcholinesterase activity of *Jenynsia multidentata* (Anablepidae, Cyprinodontiformes), *Environmental Pollution*, 157, pp. 1573-1580.

Beaudouin, R. (2007). Modélisation individu-centrée pour aider à la détection et à l'interprétation des effets des polluants chimiques sur la dynamique de population d'un poisson, la gambusie, en écosystème expérimental. [Em linha]. Disponível em <<http://www.remy-beaudouin.net/uploads/Pdf/ManuscritThesis.pdf>> [Consultado em 11/11/2012].

Benzie, I. F. F. (1996). Lipid peroxidation: a review of causes, consequences, measurements and dietary influences, *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 47, pp. 233-261.

Bernet, D., Schmidt, H., Meier, W., Burkhardt-Holm, P., Wahli, T. (1999). Histopathology in fish: proposal for a protocol to assess aquatic pollution, *Journal of Fish Diseases*, 22, pp. 25-34.

Bhagwant, S., Elahee, K. B. (2007). Hematological and gill histopathological parameters of three tropical fish species from a polluted lagoon on the west coast of Mauritius, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 68(3), pp. 361-371.

Bianchi, M.L.P., Antunes, L. M. G. (1999). Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta, *Revista de Nutrição de Campinas*, 12(2), pp. 123-130.

Bolis, L., Piccolella, M., Valle, D., Rankin, C. (2001). Fish as model in pharmacological and biological research, *Pharmacological Research*, 44, pp. 265-277.

Bradford, M. M. (1976). A Rapid and Sensitive Method for the Quantification of Microorganism Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding, *Analytical Biochemistry*, 72, pp. 248-254.

Brandão, F.P., Nunes, B., Gonçalves, F., Pereira, J.L. (2011). The impact of paracetamol on selected biomarkers of the mollusc species *Corbicula Fluminea* [Em linha]. Disponível em <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21956867?dopt=Citation>> [Consultado em 21/11/2012].

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

Cabral, A., Marques, C. (1999). Life history, population dynamics and production of eastern mosquitofish, *Gambusia holbrooki*, in rice fields of the lower Mondego River Valley, Western Portugal, *Acta Oecologica*, 20, pp. 607-620.

Camargo, M., Martinez, C. (2007). Histopathology of gills, kidney and liver of a neotropical fish caged in an urban stream, *Neotropical. Ichthyology*, 5, pp. 327-336.

Campagna, A. F., Eler, M. N., Fracácio, A., Rodrigues, B. K., Verani, N. F. (2009). The toxic potential of aldrin and heptachlor on *Denio rerio* juveniles (*Cypiniformes cyprinidae*), *Ecotoxicology*, 16, pp. 289-298.

Carrola, J., Fontainhas-Fernandes, A., Matos, P., Rocha, E. (2009). Liver Histopathology in Brown Trout (*Salmo trutta* f. *fario*) from the Tinhela River, Subjected to Mine Drainage from the Abandoned Jales Mine (Portugal), *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 83, pp. 35-41.

Cengiz, E., Ünlü, E. (2003). Histopathological of gills in Mosquitofish, *Gambusia affinis* After Long-Term Exposure to Sublethal Concentrations of Malathion, *Journal of Environmental Science and Health*, 38, pp. 581-589.

Chapman, P.M. (2000). Whole effluent toxicity testing-usefulness, level of protection and risk assessment, *Environmental Toxicology and chemistry*, 19(1), pp.3-13.

Cleuvers, M. (2003). Aquatic ecotoxicity of pharmaceuticals including the assessment of combination effects, *Toxicology Letters*, 142(3), pp. 185-194.

Coad, B. W. (2012). Fish. Freshwater Fishes [Em linha]. Disponível em <<http://www.iranicaonline.org/articles/fish-i>> [Consultado em 15/05/2013].

Costa, P. M., Diniz, M. S., Caeiro, S., Lobo, J., Martins, M., Ferreira, A. M., Caetano, M., Vale, C., Angel DelValls, C., Costa, M. T. (2009). Histological biomarkers in liver and gills of juvenile *Solea senegalensis* exposed to contaminated estuarine sediments: A weighted indices approach, *Aquatic Toxicology*, 92, pp. 202-212.

Coutinho, C., Gokhale, K. S. (2000). Selected oxidative enzymes and histopathological changes in the gills of *Cyprinus carpio* and *Oreochromis mossambicus* cultured in secondary sewage effluent, *Water Research*, 34, pp. 2997-3004.

Daughton, C. G., Ternes, T. A. (1999). Pharmaceuticals and personal care products in the environment: agents of subtle change?, *Environmental Health Perspect*, 107, pp. 907-938.

Davies, A. (1995). Oxidative stress: the paradox of aerobic life, *Biochemical society symposium*, 61, pp. 1-31.

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

Droge, W. (2002). Free radicals in the Physiological Control of Cell Function, *Physiological Reviews*, 82, pp. 47-95.

Edwards, T. M., Miller, H. D., Guillette, L. J. (2006). Water quality influences reproduction in female mosquitofish (*Gambusia holbrooki*) from eight Florida springs, *Environmental Health perspectives*, 114 Suppl 1, pp. 69-75.

Ellman, G., Courtney, D. K., Andres, J. V., Feather-Stone, R. M. (1961). A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity, *Biochemical Pharmacology*, 7, pp. 88-95.

European Chemicals Agency (2013). Tipos de produtos. [Em linha]. Disponível em <<http://echa.europa.eu/pt/regulations/biocidal-products-regulation/product-types>> [Consultado em 16/02/2013].

Feng, T., Li, Z. B., Guo, X. Q., Guo, J. P. (2008). Effects of trichlorfon and sodium dodecyl sulfhate on antioxidant defense system and acetylcholinesterase of *Tilapia nilotica* in vitro, *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 92, pp. 107-113.

Fent, K., Weston, A., Caminada, D. (2006). Ecotoxicology of Human Pharmaceuticals, *Aquatic Toxicology*, 76, pp. 112-159.

Ferreira, G., Simas, T., Nobre, A., Silva, C., Shifferegg, K., Lencart-Silva, J. (2003). Identification of sensitive areas and vulnerable zones in transitional and coastal Portuguese systems – Application of the United States National estuarine eutrophication assessment to the Minho, Lima, Douro, Ria de Aveiro, Mondego, Tagus, Sado, Mira, Ria Formosa and Guadiana Systems. Edited by Instituto da Água and Institute of Marine Research, Portugal.

Fossi, M. C., Marsili, L. (1997). The use of non-destructive biomarkers in the study of marine mammals, *Biomarkers*, 2, pp. 205-216.

Franco, J. L., Posser, T., Mattos, J. J., Trevisan, R., Brocardo, P. S., Rodrigues, A. L. S., Leal, R. B., Farina, M., Marques, M. R. F., Bainy, A. C. D., Dafre, A. L. (2009). Zinc reverses malathion – induced impairment in antioxidant defenses, *Toxicology Letters*, 187, pp. 137-143.

Garcia, L.M., Castro, B., Ribeiro, R., Guilhermino, L. (2000). Characterization of cholinesterase from guppy (*Poecilia reticulata*) muscle and its *in vitro* inhibition by environmental contaminants, *Biomarkers*, 5, pp. 274-284.

Gomes, A. S., Palma, J. J. C. & Silva, C. G. (2000). Causas e consequências do impacto ambiental da exploração dos recursos minerais, *Revista Brasileira de Geofísica*, 18(3), pp. 447-454.

Gonçalves, A., Padrão, J., Gonçalves, F., Nunes, B. (2010). *In vivo* acute effects of several pharmaceuticals drugs (Diazepam, clofibrate, clofibric acid) and detergents (sodium dodecyl-sulphate and benzalkonium chloride) on cholinesterases from *Gambusia holbrooki*, *Fresenius Environmental Bulletin*, 19(4a), pp. 628-634.

Guardiola, F.A., Cuesta A., Mesequer, A., Esteban, M.A. (2012). Risks of using antifouling biocides in aquaculture, *International Journal of molecular sciences*, 13(2), pp. 1541-1560.

Guimarães, S., Moura, D., Silva, P. (2006). *Terapêutica Medicamentosa e Suas Bases Farmacológicas*. Porto Editora, Porto.

Gulick, A., Fahl, W. (1995). Forced evolution of glutathione-S- transferase to create a more efficient drug detoxication enzyme, *Pharmacology*, 92, pp. 8140-8144.

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

Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C. (1989). *Free radicals in Biology and Medicine*, 3^aEd. Oxford University Press. Oxford.

Hayes, J. D., McLellan, L. I. (1999). Glutathione and glutathione-dependent enzymes represent a co-ordinately regulated defense against oxidative stress, *Free Radical Research*, 31, pp. 273-300.

Hayes, J., Flanagan, J., Jowsey, I. (2005). Glutathione Transferases, *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 45, pp. 51-88.

Heberer, T. (2002). Occurrence, fate and removal of pharmaceutical residues on the aquatic environment; a review of recent research data, *Toxicology Letters*, 131, pp. 5-17.

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

Hensley, K., Floyd, R.A. (2002). Reactive Oxygen Species and Protein Oxidation in aging: A Look Back, A Look Ahead, *Archives Biochemistry and Biophysics*, 397, pp. 377-383.

Lang, T., Wosniok, W., Barsiene, J., Broeg, K., Kopecka, J., Parkkonen, J. (2006). Liver histopathology in Baltic flounder (*Platichthys flesus*) as indicator of biological effects of contaminants, *Marine Pollution Bulletin*, 53, pp. 488-496.

Les autorités fédérales de la Confédération Suisse (2012). Types de produits. [Em linha]. Disponível em <http://www.admin.ch/ch/f/rs/813_12/app11.html> [Consultado em 18/01/2013].

Leticia, A.G., Gerardo, G.B. (2008). Determination of esterase activity and characterization of cholinesterases in the reef fish *Haemulon pulmier*, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 71, pp. 787-797.

Lima, E. S., Abdalla, D. S. P. (2001). Peroxidação lipídica: mecanismo e avaliação em amostras biológicas [Em linha]. Disponível em <<http://www.rbcf.usp.br/edicoes/Volumes/V37N3/PDF/v37n3p293-303.pdf>> [Consultado em 09/04/2013].

Livingstone, R. (1991). Organic xenobiotic metabolism in marine invertebrates, *Comparative Biochemistry and Physiology*, 7, pp. 5-185.

Lombardi, J. V. (2004). Fundamentos de toxicologia aquática. Organização Livraria Varela, São Paulo.

Lourenço, J., Castro, B., Machado, R., Nunes, B., Mendo S., Gonçalves, F., Pereira, R. (2010). Genetic, Biochemical, and Individual Responses of the Teleost Fish *Carassius auratus* to Uranium, *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 58, pp. 1023-1031.

Magalhães, D. P. & Filho, A. S. F. (2008). A Ecotoxicologia com Ferramenta no Biomonitoramento de Ecossistemas Aquáticos, *Oecologia Brasiliensis*, 12(3), pp. 355-381.

Mallat, J. (1985). Fish gill structural changes induced by toxicants and other irritants: a statistical review, *Canadian Journal of Fish and Aquatic Sciences*, 42, pp. 630-648.

Maraldo, K., Dahllöf, I. (2004). Indirect estimation of degradation time for zinc pyrithione and copper pyrithione in seawater, *Marine Pollution Bulletin*, 48, pp. 894-901.

Marcheselli, M., Azzoni, P., Mauri, M. (2010). Novel antifouling agent-zinc pyrithione: stress induction and genotoxicity to the marine mussel *Mytilus galloprovincialis*, *Aquatic Toxicology*, 102, pp. 39-47.

Marschner, A. (1999). Biologisch Bodensanierung und ihre Erfolgskontrolle durch Biomonitoring. Ecomed, Landsbery.

Martinez-Lara, E., Toribio, F., López-Barea, J., Bárcena, J. (1996). Glutathione –S-transferase isoenzyme patterns in the gilthead seabream (*Sparus aurata*) exposed to environmental contaminants, *Comparative Biochemistry and Physiology*, 113, pp. 215-220.

McCarthy, F., Halbrook, R., Shugart, R. (1991). Conceptual strategy for design, implementation, and validation of a biomarker based biomonitoring capability, *Environmental Sciences Division*, Oak Ridge National Laboratory, Tennessee, USA.

Monteiro, M., Quintaneiro, C., Morgado, F., Soares, A.M.V.M., Guilhermino, L. (2005). Characterization of the cholinesterases present in head tissues of the estuarine fish *Pomatoschistus microps*: Application to biomonitoring, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 62, pp. 341-347.

Mora, P., Fournier, D., Narbonne, J.F. (1999). Cholinesterases from the marine neussels *Mytilus galloprovincialis* Lmk. and *M. edulis* L. and from the freshwater bivalve *Corbicula fluminea* Müller, *Comparative Biochemistry and Physiology Part C.*, 122, pp. 353-361.

Morgan, J., Sturzenbaum, S., Kille, P. (1999). A short overview of molecular biomarker strategies with particular regard to recent developments in earth worms, *Pedobiologia*, 43, pp. 574-584.

Nelson, L., Cox, M. (2005). *Lehninger Principles of Biochemistry*. 4^a Ed, Freeman, Nova Iorque.

Nico, L. e Fuller, P. (2013). *Gambusia holbrooki*. USGS Nonindigenous Aquatic Species Database, Gainesville, Fl. [Em linha]. Disponível em <<http://nas.er.usgs.gov/queries/Factsheet.aspx?speciesID=849>> [Consultado em 05/04/2013].

Nunes, B., Carvalho, F., Guilhimermino, L. (2003). Characterization of total head cholinesterases of *Gambusia holbrooki* (mosquitofish), and the assessment of effects induced by two environmental contaminants, *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 26(1), pp.260-261.

Nunes, B., Carvalho, F., Guilhermino, L. (2004). Acute and chronic effects of clofibrate and clofibric acid on the enzymes acetylcholinesterase, lactate dehydrogenase and catalase of the mosquitofish, *Gambusia holbrooki*, *Chemosphere*, 57, pp. 1581-1589.

Nunes, B., Carvalho, F., Guilhermino, L. (2005). Acute toxicity of widely used pharmaceuticals in aquatic species: *Gambusia holbrooki*, *Artemia parthenogenetica* and *Tetraselmis chuii*, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 61, pp. 413-419.

Nunes, B., Carvalho, F., Guilhermino, L. (2005). Characterization and use of the total head soluble cholinesterases from mosquitofish (*Gambusia holbrooki*) for screening of anticholinesterase activity, *Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry*, 20(4), pp. 369-376.

Nunes, B., Carvalho, F., Guilhermino, L. (2006). Effects of widely used pharmaceuticals and a detergent on oxidative stress biomarkers of the crustacean *Artemia parthenogenetica*, *Chemosphere*, 62, pp.581-594.

Nunes, B., Gaio, A. Carvalho, F., Guilhermino, L. (2008). Behaviour and biomarkers of oxidative stress in *Gambusia holbrooki* after acute exposure to widely used pharmaceuticals and a detergent, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 71, pp. 341-354.

OECD (1984). OECD Guideline for the testing of chemicals. Test 204: Fish, Prolonged Toxicity test: 14-day study.

OECD (1992). OECD Guideline for the testing of chemicals. Test 203: Fish, Acute Toxicity Test.

OECD (2000). OECD Guideline for the testing of chemicals. Test 215: Fish, Juvenile Growth Test.

Olurin, K. B., Olojo, E. A. A., Mbaka, G. O., Akindele, A. T. (2006). Histopathological responses of the gill and liver tissues of *Clarias gariepinus* fingerlinys to the herbicide, glyphosate, *African Journal of Biotechnology*, 5, pp. 2480-2487.

Oost, R., Beyer, J., Vermerler, N. (2003). Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review, *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 13, pp. 57-149.

Oyama, T.M., Saito, M., Yonezama, T., Okano, Y., Oyama, Y. (2012). Nanomolecular concentrations of zinc pyrithione increase cell susceptibility to oxidative stress induced by hydrogen peroxide in rat thymocytes, *Chemosphere*, 87, pp.1316-1322.

Papastergiadis, A., Mubiru, E., Van Laugenhove, H., De Meulenaer, B. (2012). Malondialdehyde measurement in oxidized foods: evaluation of the spectrophotometric thiobarboturic acid reactive substances (TBARS) test in various food, *Journal of agricultural and food chemistry*, 60 (38), pp. 9589-9594.

Peakall, D. W. (1992). Animal biomarkers as pollution indicators. Chapman & Hall, London.

Piao, M.J., Yoo, E.S., Koh, Y.S., Kang, H.K., Kim, J., Kim, Y.J., Kang, H.H., Hyun, J.W. (2011). Antioxidant Effects of the Ethanol Extract from Flower of *Camellia japonica* via Scavenging of Reactive Oxygen Species and Induction of Antioxidant Enzymes, *International Journal of Molecular Sciences*, 12(4), pp. 2618-2630.

Ramade, F. (1977). Écotoxicologie. Masson, Paris, France.

Reeder, N.L., Kaplan, J., Xu, J., Youngquist, R.S., Wallace, J., Hu, P., Juhlin, K.D., Schwartz, J.R., Grant, R.A., Fieno, A., Nerneth, S., Reichling, T., Tiesman, J.P., Mills, T., Steinke, M., Wang, S.L., Saunders, C.W. (2011). Zinc Pyrithione Inhibits Yeast Growth through Copper Influx and Inactivation of Iron- Sulfer Proteins, *Antimicrobial Agents and chemotherapy*, 55(12), pp. 5753-5760.

Reeder, N.L., Xu, J., Youngquist, R.S., Schwartz, J.R., Rust, R.C., Saunders, C.W. (2011). The antifungal mechanism of action of zinc pyrithione, *British Journal of Dermatology*, 165 (Suppl.2), pp. 9-12.

Regoli, F., Gorbi, S., Frenzilli, G., Nigro, M., Corsi, I., Focardi, S., Winston, G. (2002). Oxidative Stress in ecotoxicology: from the analysis of individual antioxidants to a more integrated approach, *Marine Environmental Research*, 54, pp. 419-423.

Richmonds, C., Dutta, H. (1989). Histopathological changes induced by malathion in the gills of bluegill *Lepomis macrochirus*, *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 43, pp. 123-130.

Rudolf, E., Cervinka, M. (2011). Stress responses of human dermal fibroblasts exposed to zinc pyrithione, *Toxicology Letters*, 204, pp. 164-173.

Schvartsman, S. (1991). Intoxicações agudas. 4ª Ed, Sarvier, São Paulo.

Schwartz, J. R., Shah, R., Krigbaum, H., Sacha, J., Vogt, A., Blume-Peytavi, U. (2011). New insights on dandruff/seborrheic dermatitis: the role of the scalp follicular infundibulum in effective treatment strategies, *British Journal of Dermatology*, 165 Suppl 2, pp. 18-23.

Scott, G. R., Sloman, K. A. (2004). The effects of environmental pollutants on complex fish behavior: integrating behavioural and physiological indicators of toxicity, *Aquatic Toxicology*, 68, pp. 369-392.

Shahidi, F., Hong, C. (1991). Evaluation of malonaldehyde as a marker of oxidative rancidity in meat products, *Journal and Food Biochemistry*, 15 (2), pp. 97-105.

Sismeiro-Vivas, J., Abrantes, N., Pereira, J. L., Castro, B. B., Gonçalves, F. (2007). Short-Term Effects of Quirlan ® (Chlorfenvinphos) on the Behavior and Acetylcholinesterase Activity of *Gambusia holbrooki*, *Environmental Toxicology*, 22, pp. 194-202.

Sturm, A., Silva de Assis, H.C., Hausen, P.D. (1999). Cholinesterases of marine teleosts: Enzymological characterization and potential use in the monitoring of neurotoxic contamination, *Marine Environmental Research*, 47, pp. 389-398.

Tarladgis, B. G., Watts, B. M., Younathan, M. T., Dugan. L. (1960). A distillation method for the quantitative determination of malonaldehyde in rancid foods, *Journal of the American Oil chemists' Society*, 37 (1), pp. 44-48.

Tatara, C. P., Mulvey, M., Newman, M. C. (2002). Genetic and demographic responses of mercury- exposed mosquitofish (*Gambusia holbrooki*) populations: temporal stability and reproductive components of fitness, *Environmental Toxicology and chemistry*, 21(10), pp. 2191-2197.

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

Truhaut, R. (1977). Ecotoxicology: objectives, principles and perspectives, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 1, pp. 151-173.

Turley, P. A., Fenn, R. J., Ritter, J. C., (2000). Pyrithiones as antifoulants: Environmental chemistry and preliminary risk assessment, *Biofouling*, 15(1-3), pp. 175-182.

Turley, P. A., Fenn, R. J., Ritter, J. C., (2005). Pyrithiones as antifoulants: environmental fate and loss of toxicity, *Biofouling*, 21(1), pp. 31-40.

Vargas, M.J. e Sostoa, A. (1996). Life history of *Gambusia holbrooki* (Pisces, Poeciliidae) in the Ebro delta (NE Iberian peninsula), *Hydrobiologia*, 341, pp. 215-224.

Walker, C., Hopkin, S., Sibly, R., Peakall, D. (2001). Principles of ecotoxicology Taylor and Francis. 2ª Ed, Boca Raton, Nova Iorque.

Wood, C. M., Soivio, A. (1991). Environmental effects on gill function: an introduction, *Physiologic Zoology*, Vol. 64 (1), pp. 1-3.

Xuereb, B., Lefèvre, E., Garric, J., Geffard, O. (2009). Acetylcholinesterase activity in *Gammanus fossarum* (Crustacea Amphipoda): Linking AChE inhibition and behavioural alteration, *Aquatic Toxicology*, 94, pp. 114-122.

Yebra, D.M., Kiil, S. Dam, J. K. (2004). Antifouling technology-past, present and future steps towards efficient and environmentally friendly antifouling coatings, *Progress in Organic Coatings*, 50, pp. 75–104.

Zha, J., Wang, N., Ingersoll, C. (2007). Histological alternation of vitellogenin induction in adult rare minnow (*Gobiocypris rarus*) after exposure to ethynylestradiol and nonylphenol, *Chemosphere*, 66, pp. 488-495.

Zhou Q., Zhang J., Fu J., Shi J., Jiang G. (2008). Biomonitoring: An appealing tool for assessment of metal pollution in the aquatic ecosystem, *Analytica Chimica Acta*, 606, pp. 135-150.