

Joana Rita Mesquita Ribeiro Fernandes

Avaliação do efeito resultante da exposição crónica de truta arco-íris
(*Oncorhynchus mykiss*) a cloreto de benzalcónio ao nível das brânquias por
via de biomarcadores enzimáticos e nucleares

Universidade Fernando Pessoa
Faculdade de Ciências da Saúde

Porto, 2014

Joana Rita Mesquita Ribeiro Fernandes

Avaliação do efeito resultante da exposição crónica de truta arco-íris
(*Oncorhynchus mykiss*) a cloreto de benzalcónio ao nível das brânquias por
via de biomarcadores enzimáticos e nucleares



Universidade Fernando Pessoa
Faculdade de Ciências da Saúde

Porto, 2014

Joana Rita Mesquita Ribeiro Fernandes

**Avaliação do efeito resultante da exposição crónica de truta arco-íris
(*Oncorhynchus mykiss*) a cloreto de benzalcónio ao nível das brânquias
por via de biomarcadores enzimáticos e nucleares**

Discente

Joana Rita Mesquita Ribeiro Fernandes

Orientador

Prof. Doutor Alberto Teodorico Correia

Co-orientador

Prof. Doutora Sara C. Antunes

Projeto de Pós-Graduação/Dissertação apresentado à Universidade
Fernando Pessoa como parte dos requisitos para a obtenção do
grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Sumário

Atualmente o uso de detergentes tem originado maior preocupação, quer a nível científico, quer a nível do ecossistema, uma vez que afetam o meio aquático na medida em que este é o destinatário final destes compostos. Foram realizados vários estudos que demonstram os efeitos nefastos que estes compostos têm a nível do compartimento aquático. Estes efeitos, podem provocar alterações nos organismos que nele habitam, como sejam alterações a nível do stress oxidativo, dano no DNA, bem como alterações bioquímicas e morfológicas nos vários tecidos e órgãos. Este trabalho teve como objetivo principal avaliar os efeitos provocados nas brânquias de *Oncorhynchus mykiss* (n.v. truta arco-íris) decorrentes da exposição crónica (28 dias) a diferentes concentrações de cloreto de benzalcónio. Os biomarcadores utilizados para essa avaliação foram a quantificação da atividade da enzima catalase, e avaliação de efeitos genotóxicos através do ensaio dos cometas. Os resultados obtidos para a catalase nas concentrações [0,583] e [1,050] mg/L e as concentrações [0,100], [0,180], [0,324], [0,583] e [1,050] mg/L no ensaio dos cometas demonstraram que o cloreto de benzalcónio apresenta ser uma ameaça direta para o organismo teste utilizado. Foi possível observar que nas concentrações mais altas se registou indução de stress oxidativo e em todas as concentrações danos celulares ao nível do DNA. Com a realização deste estudo, foi possível demonstrar que o cloreto de benzalcónio representa uma ameaça direta para os organismos aquáticos principalmente no que diz respeito a efeitos genotóxicos.

Palavras-chave: *Salmonidae*, detergente, biomarcadores, cometas, catalase.

Abstract

At present the use of emerging compounds, such as detergents, has increased causing a growing concern in the public opinion and scientific community, since it affects the aquatic environment and the live-organisms that live here. Different studies have shown several adverse effects on aquatic species such as changes in oxidative stress levels, and DNA damage, as well as morphological and biochemical alterations in various tissues and organs. This study was designed to evaluate the effects in the gills of *Oncorhynchus mykiss* (rainbow truits) resulting from a chronic exposure (28 days) to different concentrations of benzalkonium chloride. The biomarkers used were catalase activity and the comet assay. The results for catalase concentrations [0.583] and [1.050] mg / L and concentrations [0.100] [0.180] [0.324] [0.583] and [1.050] mg / L in the comets test showed the benzalkonium chloride has to be a direct threat to the test organism used. The assessment of other hypothetical alterations should be assessed in the future using other set of biomarkers. With this study, we demonstrated that benzalkonium chloride is a direct threat to aquatic organisms, especially with respect to genotoxic effects.

Keywords: *Salmonidae*, detergent, biomarkers, comets, catalase.

Agradecimentos

Em primeiro lugar queria agradecer ao meu orientador, Professor Doutor Alberto Correia, por todo o empenho, dedicação, sabedoria, e por ter sido o grande impulsionador para a realização deste trabalho. Muito Obrigada. Serei eternamente grata.

À minha co-orientadora Professora Doutora Sara Antunes, pela sua disponibilidade, dedicação, apoio e incentivo ao longo de todo o trabalho.

Ao Laboratório de Ecofisiologia do Centro Interdisciplinar de Investigação Marinha e Ambiental (CIIMAR) por me ter disponibilizado todas as condições necessárias à boa prossecução deste trabalho, e por me proporcionado a aquisição de novas competências.

À Sara Rodrigues, por todas as horas cedidas a este trabalho, por todas as sugestões, conselhos e disponibilidade incondicional em todas as fases deste projeto. O meu sincero obrigado.

À Margarida Gama, por toda a boa disposição, ajuda, conselhos e incentivo nos momentos mais difíceis.

À minha avó e aos meus pais. Sem eles nada disto seria possível.

Aos meus amigos de sempre, Francisca Carvalho, Mariana Sá, Tomás Albuquerque e Tiago Semião, que estiveram presentes ao longo do meu percurso académico. Sempre me apoiaram e acreditaram em mim. Obrigada por tudo!

Ao Luís, mesmo longe, sempre foi o meu grande pilar. Obrigada por tudo o que fazes por mim!

Índice

I. Introdução.....	1
II. Objetivos.....	7
III. Material e Métodos.....	8
3.1 Organismos teste.....	8
3.2 Ensaio crónico com cloreto de benzalcónio.....	8
3.3 Processamento dos tecidos biológicos.....	9
3.4 Ensaio dos cometas.....	9
3.5 Catalase.....	11
3.6 Análise Estatística.....	11
IV. Resultados.....	12
V. Discussão.....	15
VI. Considerações finais.....	19
VII. Referências Bibliográficas.....	20

Índice de figuras

	Pág.
Figura 1. Esquema do ensaio padrão dos cometas	6
Figura 2. Decomposição de H ₂ O ₂ por ação da enzima catalase	7
Figura 3. Imagens observadas de cometas com a classe a que correspondem.	10
Figura 4. Resultados obtidos para a atividade da catalase após exposição crónica de <i>O. mykiss</i> a cloreto de benzalcónio.....	12
Figura 5. Resultados obtidos para o ensaio dos cometas após exposição crónica de <i>O. mykiss</i> a cloreto de benzalcónio.....	13

Índice de tabelas

	Pág.
Tabela1. Percentagem de dano para cada classe observada para todos os tratamentos controlo e cinco concentrações de cloreto de benzalcónio.....	15

I. Introdução

A presença de fármacos no meio ambiente e os seus potenciais efeitos adversos representam uma crescente preocupação, quer na população, quer na comunidade científica (Rodrigues *et al.* 2012). O crescente nível de resíduos de produtos farmacêuticos destinados ao uso humano e veterinário no meio ambiente tornou-se assim motivo de preocupação (Ikehata *et al.* 2006), uma vez que muitos destes compostos emergentes foram encontrados em concentrações preocupantes em águas superficiais, estações de tratamento de águas residuais (Schwaiger *et al.* 2004) e na água potável (Kümmerer, 2001) provenientes do uso continuado pela população humana (Nunes *et al.* 2008). Como resultado do crescimento da população humana, a produção e consumo de poluentes emergentes aumentou significativamente nos últimos anos. O ambiente aquático é na maioria das vezes o destinatário final destes poluentes, os quais podem ser potencialmente genotóxicos e carcinogénicos para a vida aquática (Claxton *et al.* 1998).

A toxicidade dos produtos farmacêuticos e o impacto dos seus efeitos negativos no meio ambiente, em particular no compartimento aquático, está relacionado com a sua atividade biológica, persistência, baixa taxa de degradação, lipofília, capacidade elevada de absorção, formação de diversos metabolitos e de várias interações toxicológicas quando em contacto com outros fármacos e poluentes (Daughton e Ternes, 1999). As descargas de resíduos industriais, agrícolas e efluentes domésticos são as principais causas de poluição dos sistemas aquáticos. Os peixes são um exemplo em que frequentemente são expostos a águas altamente contaminadas, especialmente em locais onde o efeito de diluição é baixo. Geralmente, estes efeitos nefastos observam-se quando os contaminantes não apresentam sinais de degradação ambiental ou quando esta é apenas parcial, quando têm elevada eficácia biológica, quando se caracterizam por possuírem um elevado potencial para se acumular nos tecidos, e/ou mostram efeito aditivo ou sinérgico em contato com outros contaminantes existentes no ecossistema aquático (Bernet *et al.* 1999).

A classe dos detergentes está fortemente presente no compartimento aquático devido às suas finalidades, nomeadamente de limpeza, como é o caso dos agentes tensoativos (Scott e Jones, 2000). O estudo dos efeitos adversos destes agentes permitiu

constatar que os agentes tensioativos são severamente tóxicos para o ambiente aquático, principalmente para a flora da zona costeira (Cserhádi *et al.* 2002). Existem vários fatores que condicionam a presença de agentes tensioativos no compartimento aquático; como a distância dos cursos de água à zona habitacional e a alteração das condições ambientais (Cserhádi *et al.* 2002). Os agentes tensioativos são compostos por um grupo polar, solúvel em água e uma cadeia hidrocarbonada não polar que também apresenta grande solubilidade em água (Ivankovic e Hrenovic, 2010); compostos com estas características são designados de anfipáticos (Scott e Jones, 2000). O grupo polar pode ser carregado (aniônicos ou catiónicos), e inclui grupos como fosfatos e aminas. Pode ser neutro (resíduos de polietileno) ou pode ser também não carregado, onde estão inseridos os grupos hidroxilo e carbonilo. O grupo apolar dos detergentes é constituído por um grupo hidrofóbico, como cadeias alifáticas ou grupos aromáticos em geral, sendo que os hidrocarbonetos conferem baixa solubilidade em água. Este efeito deve-se principalmente à dificuldade que este grupo tem em romper as fortes interações entre as moléculas de água e não tanto pela atração entre os grupos apolares (Helenius e Simons, 1975). O grupo mais comum de agentes catiónicos são os compostos de amónio quaternário (Ivankovic e Hrenovic, 2010). O cloreto de benzalcônio é um tensioativo catiónico, pertencente ao grupo dos compostos quaternários (Sánchez-Fortún *et al.* 2005). Estas moléculas têm pelo menos uma cadeia hidrofóbica alquílica longa ligada a um átomo de azoto carregado positivamente (Garcia *et al.* 2001). A maioria dos grupos alquílicos substituintes são de cadeia curta, tais como o grupo metilo e benzilo. O destino e efeitos deste composto no ambiente, é determinado não apenas pelas características físicas e químicas do composto mas também pelo comprimento da sua cadeia alquílica (Ying, 2006). São produzidos essencialmente a partir de gordura e óleos naturais, e devido à sua carga positiva têm uma forte afinidade para superfícies carregadas negativamente. Estas características específicas permitem a utilização destes compostos como amaciadores de roupa, desinfetantes, germicidas, emulsionantes, desodorizantes e biocidas (Garcia *et al.* 2001).

O cloreto de benzalcônio é um agente antimicrobiano bactericida, frequentemente usado como desinfetante e conservante. Está presente em elevada quantidade em preparações farmacêuticas para uso oftálmico e *sprays* nasais. Contudo é considerado como um dos biocidas sintéticos mais seguros da atualidade e tem uma

longa história de uso e eficácia. É também muito usado como desinfetante em hospitais e centros de saúde (Gaber *et al.* 2012). Existem inúmeros mecanismos de toxicidade para os diferentes tipos de agentes tensoativos, e o mesmo composto pode provocar toxicidade através de diferentes mecanismos (Abel, 1974). A toxicidade dos agentes tensoativos é determinada principalmente pela sua capacidade em penetrar a membrana celular dos organismos aquáticos (Rosen *et al.* 2001). Sabe-se que a sua interação com as membranas lipídicas perturba a integridade da membrana, resultando daí os seus efeitos tóxicos (Abel, 1974). O rompimento da integridade da membrana é possivelmente causada pela interferência com as proteínas de permeabilidade da membrana. Um possível mecanismo que explica a rutura da integridade da membrana é a avaliação do stress oxidativo, que tem efeitos prejudiciais sobre a integridade da membrana. O stress oxidativo leva a uma perda de fluidez e ao aumento da permeabilidade iónica (Li, 2008).

Os peixes são considerados boas espécies sentinela para a monitorização da poluição aquática, uma vez que concentram poluentes nos seus tecidos, diretamente da água e através da sua alimentação (Boon *et al.* 2002; Fisk *et al.* 2001). *Oncorhynchus mykiss*, vulgarmente chamada de truta arco-íris, é um peixe de água doce largamente utilizado em aquaculturas pertencente à família *Salmonidae*. Os indivíduos podem pesar até 25 quilogramas e medir até 120 centímetros, mas geralmente não apresentam essas dimensões. Têm uma tonalidade escura e um sombreado branco-prateado na parte ventral e o seu corpo é intensamente salpicado com uma faixa rosa-vermelha na zona lateral. São organismos que podem viver até aos 11 anos de idade e atingem a maturidade sexual aos 2 - 3 anos. Enquanto jovens, alimentam-se de zooplâncton e na fase adulta a sua dieta alimentar baseia-se predominantemente em insetos aquáticos e terrestres, crustáceos, ovas e pequenos peixes (Bernstein e Montgomery, 2008). Devido à constante exposição a poluentes, por diversas vias (ex: exposição direta, ingestão) os peixes apresentam danos significativos em diversos órgãos (ex: pele, brânquias, tubo digestivo, fígado) (Ayas *et al.* 2007). Estes danos, devido a modificações nos células e tecidos, comprometem por vezes a funcionalidade dos órgãos (Ayas *et al.* 2007). Qualquer efeito adverso proveniente de um polente na água é facilmente observado nas brânquias do peixe, uma vez que estas entram em contacto direto com o meio aquático (Cengiz e Unlu, 2006). As brânquias de um peixe são o principal órgão onde ocorrem as

trocas gasosas, a regulação iónica, o equilíbrio ácido-base e a excreção de resíduos nitrogenados (Rodrigues *et al.* 2014). A multiplicidade de funções, a vasta área de superfície ocupada e a sua localização relativamente ao meio externo, fazem das brânquias um órgão chave para a ação dos poluentes existentes no meio aquático (Rodrigues *et al.* 2014). Deste modo, os estudos realizados em brânquias representam um método válido e eficaz para determinar os danos causados pela exposição a diferentes poluentes a que os peixes estão sujeitos (Garcia-Santos *et al.* 2007; Rodrigues *et al.* 2014).

É necessário perceber que a continuidade de uma população depende da sobrevivência a longo prazo das espécies que a constituem. A capacidade de crescer e reproduzir, é essencial para manter a estrutura da população em equilíbrio no seu nicho ecológico. Como tal, os ensaios ecotoxicológicos são ferramentas úteis pois podem funcionar como sistemas de alerta precoce de potenciais efeitos prejudiciais de vários contaminantes no ambiente (Jha, 2008). Os impactes ambientais sobre o ecossistema aquático são constantes e provenientes de diferentes fontes antropogénicas: descargas de químicos, agricultura, indústria, fossas, hospitais e veterinárias (Lopes *et al.* 2001; de la Torre *et al.* 2005; Mdegela *et al.* 2006; Minier *et al.* 2006). No entanto, apenas as análises químicas por si só não são suficientes para descrever os efeitos adversos sobre os organismos provocados pelas substâncias químicas encontradas em locais contaminados. A utilização de biomarcadores como ferramenta de avaliação de impacto ambiental tem recebido atenção crescente nos últimos anos para monitorizar a qualidade ambiental dos ecossistemas aquáticos bem como a saúde dos organismos que habitam nestes ecossistemas (Lopes *et al.* 2001; de la Torre *et al.* 2005; Mdegela *et al.* 2006; Minier *et al.* 2006).

Em qualquer ramo da toxicologia é importante perceber os efeitos provocados na população quando exposta a um agente tóxico, qual a extensão da resposta tóxica e também prever uma resposta provável para esse efeito. Uma das ferramentas que nos permite ter respostas para todas estas variáveis são a determinação de alguns biomarcadores. Desta forma, os biomarcadores são essenciais para avaliar o risco para a saúde ambiental proveniente da exposição a produtos químicos potencialmente tóxicos (Timbrell, 1998). Assim, pode definir-se biomarcadores como uma mudança na resposta biológica relacionada com a exposição ou efeito tóxico de substâncias químicas

(Peakall, 1994). Os biomarcadores podem ser classificados em vários tipos: biomarcadores de exposição, biomarcadores de efeito ou biomarcadores de susceptibilidade (Timbrell, 1998). Os biomarcadores de exposição refletem a distribuição da substância química ou do seu metabolito através do organismo, e por isso são identificados como dose interna. Os biomarcadores de efeito são um parâmetro biológico, medido no organismo, o qual reflete a interação da substância química com os receptores biológicos. Por fim, os biomarcadores de susceptibilidade aferem a predisposição genética, para além dos fatores ambientais, assim como a idade e alimentação que podem afetar a suscetibilidade dos indivíduos expostos a substâncias químicas (Amorim, 2003). No entanto, não existe um biomarcador que possa medir de forma inequívoca os efeitos tóxicos provocados na população aquática. Como tal, este problema é resolvido através da utilização de um conjunto de biomarcadores complementares (Sanchez *et al.* 2008).

O ensaio dos cometas e a avaliação da atividade da enzima catalase são exemplos importantes de biomarcadores de efeito. O ensaio dos cometas é considerado um biomarcador de genotoxicidade, enquanto que a catalase representa um biomarcador de stress oxidativo. O caso do ensaio dos cometas, fundamenta-se na aplicação de uma eletroforese em células individualizadas, e é um método rápido e eficaz em ecotoxicologia uma vez que permite estudar o dano no DNA (inclusive o dano oxidativo), reparação e morte celular em diferentes tipos de células sem o conhecimento prévio dos seus cromossomas e taxa de renovação celular (Jha, 2008). Por outro lado, esta metodologia apresenta inúmeras vantagens na medida em que é um procedimento rápido, sensível e relativamente barato. Devido à sua sensibilidade e simplicidade, o ensaio dos cometas tem sido adotado para determinar o potencial genotóxico de produtos químicos (Jha, 2008). Este ensaio é vulgarmente usado em toxicologia ambiental, na medida em que os seus resultados se apresentam como um sinal precoce de dano ao nível do DNA, o qual poderá ser levar a uma ação atempada no processo de reparação (Lee e Steinert, 2003; Andrade *et al.* 2004). O ensaio dos cometas é constituído por uma suspensão celular de células recolhidas do material biológico que é posteriormente incorporada em agarose (Figura 1). As células são lisadas para remover membranas e componentes celulares solúveis, do qual se obtém um gel que será distribuído numa lâmina e observado ao microscópio de fluorescência. O resultado

observado é a “cauda de um cometa”, em que a percentagem de DNA na cauda indica a frequência de lesão no DNA (Azqueta e Collins, 2006).

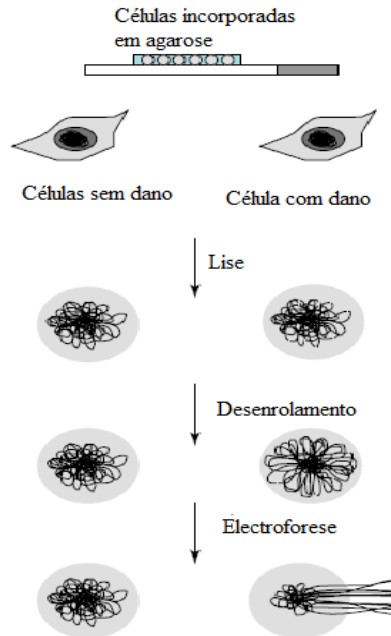


Figura 1. Esquema do ensaio padrão dos cometas (Azqueta e Collins, 2006).

Regra geral, os resíduos dos compostos farmacêuticos podem levar à produção de espécies reativas de oxigénio (ROS) provocando deste modo dano oxidativo, nomeadamente em espécies aquáticas (Nunes *et al.* 2008). Após exposição a um stress, os organismos podem desenvolver vários mecanismos antioxidantes. A catalase é uma das primeiras enzimas na linha de defesa celular contra ROS, em que a sua atividade é particularmente ativa na prevenção do aparecimento do stress oxidativo. A catalase é muito eficiente na captação e destoxificação celular uma vez que tem a capacidade de degradar o peróxido de hidrogénio resultante da degradação do anião superóxido pela enzima superóxido dismutase (Aebi, 1984) (Figura 2). A decomposição enzimática do peróxido de hidrogénio ocorre de acordo com uma reação de 1ª ordem, sendo a sua velocidade sempre proporcional à quantidade de peróxido presente. No entanto, as cinéticas da catalase não obedecem a um padrão normal. Não é possível saturar a enzima com o substrato dentro das concentrações possíveis (até 5M de H₂O₂), e por outro lado dá-se uma rápida inativação da catalase para concentrações de H₂O₂ acima de 0,1M, quando o complexo I activo enzima-H₂O₂ é convertido em complexos inativos II

ou III. Como tal, a catalase exerce uma dupla função: leva à decomposição de H_2O_2 , bem como à oxidação de dadores de hidrogénio (metanol, ácido fórmico e fenóis) com consumo de peróxido (atividade peroxidativa) (Aebi, 1984).



Figura 2. Decomposição de H_2O_2 por ação da enzima catalase

II. Objectivos

De acordo com a revisão feita anteriormente e sabendo do impacto de detergentes nos ecossistemas aquáticos, nomeadamente os compostos de amónio quaternário como é o caso do cloreto de benzalcónio, a presente dissertação teve como principal objetivo avaliar o efeito da exposição crónica da truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) a uma gama de concentrações de cloreto de benzalcónio. Esta avaliação foi centrada na avaliação de efeitos nas brânquias da truta arco-íris com recurso a biomarcadores enzimáticos (determinação da atividade da enzima catalase) e nucleares (ensaio de cometas).

III. Material e Métodos

3.1 Organismos teste

A truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) foi a espécie selecionada para este estudo. Os indivíduos foram adquiridos numa instalação de aquicultura (Posto Aquícola do Torno—Marão) situado no norte de Portugal. Os peixes foram transportados em sacos plásticos com aerificação contínua em água doce fria até às instalações do laboratório, onde estiveram sob quarentena (\approx 1 mês) em condições abióticas controladas (água doce isenta de cloro, temperatura de 15°C e fotoperíodo controlado de 12h luz e 12h escuro) antes de se iniciar o ensaio experimental. Durante este período, os peixes foram alimentados até a saciedade diariamente com ração comercial para peixe (Ramos *et al.*, 2014).

3.2 Ensaio crónico com cloreto de benzalcónio

No dia que se iniciou o ensaio os peixes apresentavam um comprimento total de $4,86 \pm 0,19$ cm e peso $1,76 \pm 0,23$ g. O ensaio crónico da exposição de *O. mykiss* a cloreto de benzalcónio foi realizado de acordo com os protocolos padronizados nº215 OECD (2000). Para a realização da exposição crónica foram utilizados 90 peixes, distribuídos em 18 aquários. Cada aquário tinha um volume final de 40 L de água desclorinada e continha 5 peixes. Os peixes estiveram expostos durante 28 dias (ensaio crónico) a diferentes concentrações nominais de cloreto de benzalcónio a partir de uma solução stock de 1 g/L. As concentrações foram escolhidas de acordo com estudos anteriores, em que o LC50 (96 horas) de cloreto de benzalcónio foi 1150 µg/L para a espécie em estudo (Mayer *et al.* 1986). Por outro lado, e de acordo com a literatura tentou-se abranger concentrações ecologicamente relevantes (Mayer *et al.* 1986). Assim as concentrações utilizadas para a exposição crónica de *O. mykiss* a cloreto de benzalcónio seguiram uma progressão geométrica de concentrações com um factor de diluição 1,8x (0,100 mg/L, 0,180 mg/L, 0,324 mg/L, 0,583 mg/L e 1,050 mg/L). Para cada concentração e controlo foram realizadas 3 réplicas (ou seja 3 aquários) distribuídas de forma aleatória pelo espaço laboratorial.

Parâmetros físicos da água como oxigénio, pH e temperatura foram medidos diariamente usando uma sonda multiparamétrica (YSI, 556 MPS).

Estes parâmetros foram medidos e resultados como: oxigénio $\geq 60\%$, pH compreendido entre 6,5 e 8,5, temperatura não variar mais de 2°C e dureza ser acima de 140 mg/L cumprem os critérios de validação de um ensaio crónico (OECD, 2000). Foram ainda medidas as concentrações de nitritos, a dureza da água e a amónia com a ajuda de um fotómetro (YSI, 9300 Photometer).

Não se registou mortalidade no grupo controlo e os parâmetros físicos e químicos medidos ao longo do ensaio estavam dentro dos valores recomendados (OECD, 2000).

3.3 Processamento dos tecidos biológicos

No fim dos 28 dias de exposição o ensaio foi terminado com a extração das brânquias. Os peixes foram anestesiados com gelo e água ($< 4^{\circ}\text{C}$) e de seguida realizou-se o sacrifício (Wilson *et al.* 2009). Em cada peixe foi retirado um arco branquial para a quantificação dos cometas, e o outro arco branquial foi preservado a -80°C para a posterior quantificação da atividade da enzima catalase.

3.4 Ensaio dos cometas

O ensaio dos cometas foi realizado de acordo com a metodologia modificada de Collins (2004). Imediatamente após a brânquia ter sido retirada do peixe, procedeu-se à recolha das células após cortes sucessivos da mesma em tampão fosfato (PBS). Após centrifugação (200 g, 5 minutos a 4°C) fez-se uma lavagem do pellet com PBS e voltou a centrifugar-se o conjunto. A 20 μl do sobrenadante, que contém a suspensão celular, adicionaram-se 140 μl de "*Low melting point agarose*" (LMPA) a 0,8%. Preencheram-se as lâminas de vidro previamente revestidas com "*Normal melting point agarose*" (NMPA) a 1%, com 2 mini-géis por peixe, em que cada mini-gel foi preenchido 6 μl da suspensão celular. Depois dos mini-géis secarem a 4°C (≈ 20 minutos) as lâminas foram

imersas numa solução de lise (0,2M NaOH, 100 mM Na₂.EDTA.2H₂O, 10 mM Tris e 2,5 M NaCl, pH =10; Triton X-100 a 1% e DMSO a 10%) durante no mínimo uma hora (máximo 24h) a 4°C. De seguida, as lâminas foram colocadas numa tina de electroforese que continha tampão de electroforese (0,3M NaOH, 1Mm Na₂.EDTA; pH>13) durante 20 minutos a 4°C. A migração do DNA foi realizada pela passagem de uma corrente eléctrica de 0,8 V e 300 mA durante 30 minutos. De seguida as lâminas foram neutralizadas, lavadas e desidratadas através de uma sucessão de passagens por PBS, água destilada, álcool a 70%, álcool a 100% e água destilada, respetivamente. Por fim as lâminas foram coradas com brometo de etídio (0,01 mg/mL), lavadas e secas à temperatura ambiente. O dano do DNA foi quantificado através da observação ao microscópio de fluorescência das lâminas por uma classificação visual de nucleóides. Estes foram separados em 5 classes de acordo com a intensidade e comprimento da cauda (Figura 3). As classes distribuem-se de 0 a 4, em que 0 não apresenta cauda visível, ou seja sem dano, e 4 corresponde a todo o DNA na cauda e a zona da cabeça com uma dimensão insignificante (Azqueta *et al.* 2009). A pontuação total expressa um indicador de danos genéticos (GDI).

$$GDI = [(\% \text{ classe } 0 \text{ nucleóides}) \times 0] + [(\% \text{ classe } 1 \text{ nucleóides}) \times 1] \\ + [(\% \text{ classe } 2 \text{ nucleóides}) \times 2] + [(\% \text{ classe } 3 \text{ nucleóides}) \times 3] \\ + [(\% \text{ classe } 4 \text{ nucleóides}) \times 4]$$

Os resultados foram expressos em unidades arbitrárias numa escala de 0 – 400. Em cada amostra foram observados e classificados 100 nucleóides (Azqueta *et al.* 2009).

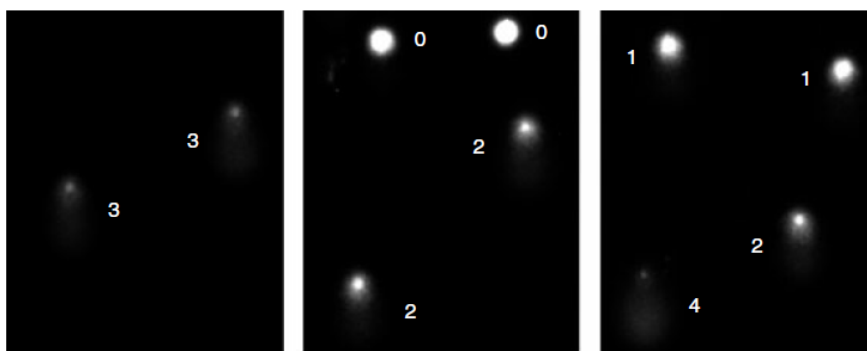


Figura 3. Imagens observadas de cometas com a classe a que correspondem. (Azqueta e Collins, 2006).

3.5 Catalase

Para a avaliação do potencial stress oxidativo provocado pelo cloreto de benzalcónio à truta arco-íris procedeu-se à quantificação da atividade da enzima catalase (CAT). A atividade da CAT foi determinada por espectrofotometria, medindo a diminuição da absorvância a 240 nm durante 30 segundos (descrito por Aebi, 1984) devido à decomposição do H_2O_2 em H_2O e O_2 . A atividade é expressa em $\mu Lmol$ de H_2O_2 consumido por minuto/mg de proteína. A diferença em absorvância (Δ 240 nm) por unidade de tempo é uma medida da atividade da catalase (Aebi, 1984).

As brânquias foram homogeneizadas com 1,0 mL de tampão de homogeneização (50mM, pH=7,0 com Triton X-100) e posteriormente centrifugadas a 14000 rpm durante 10 minutos a 4°C, sendo que os sobrenadantes foram utilizados para a determinação enzimática (Aebi, 1984). A técnica foi realizada em microplaca e cada poço preenchido com 200 μL de amostra diluída (1:80) com 100 μL de solução de reação (H_2O_2). A fim de expressar a actividade enzimática em função do teor de proteína da amostra, esta foi quantificada segundo o método descrito por Bradford (1976).

3.6 Análise Estatística

Para a avaliação de cada parâmetro estudado foi executado uma análise de variância unifatorial, seguida de um teste de Dunnett. Isto permitiu discriminar diferenças significativas entre os peixes expostos ao detergente comparativamente com o grupo controlo. Precedentemente à análise estatística, foram logaritmizados [$\log(x+1)$] os valores para cumprir os pressupostos de normalidade dos dados e homogeneidade de variâncias. Toda a análise estatística foi realizada utilizando SigmaPlot V11.0. O nível de significância estatística foi de 0,05. Os dados são apresentados como valores médios \pm erros padrão.

IV. Resultados

O ensaio crónico com *O. mykiss* exposto a cloreto de benzalcónio cumpriu os critérios de validação do ensaio, não se registando mortalidade nos organismos controlo.

Os resultados dos parâmetros físicos e químicos medidos ao longo do ensaio também cumpriram os critérios de validação do ensaio registando-se os valores de oxigénio de $58,72 \pm 6,57$ %, pH $6,98 \pm 0,43$, temperatura $15,05 \pm 0,35$ °C, nitritos $0,02 \pm 0,01$ mg/L, dureza $109,74 \pm 21,50$ mg/L e a amónia $0,68 \pm 0,34$ mg/L.

Relativamente à determinação da atividade da catalase nas brânquias, esta revelou uma diminuição ao longo de todas as concentrações testadas. No entanto, este decréscimo só apresentou valores estatisticamente significativos na diminuição da atividade desta enzima nas duas concentrações mais elevadas de cloreto de benzalcónio ($0,583$ mg/L e $1,050$ mg/L) [$F_{[5, 83]} = 3,275$; $P = 0,010$] (Fig.4).

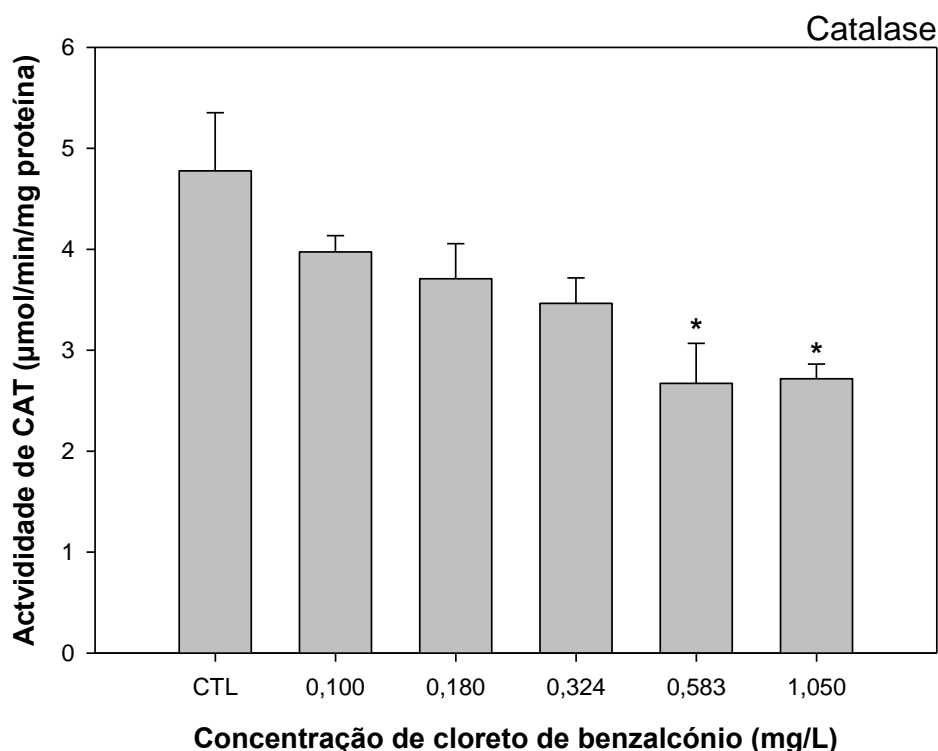


Figura 4. Resultados obtidos para a atividade da catalase após exposição crónica de *O. mykiss* a cloreto de benzalcónio. Os dados estão expressos como média \pm erro padrão. *Assinala as diferenças significativas entre concentrações e o grupo controlo (Teste de Dunnett, $P < 0,05$).

Os resultados obtidos no ensaio dos cometas, ao nível das brânquias de *O. mykiss* após exposição crónica a cloreto de benzalcónio, estão representados na figura 5 e tabela 1. Todas as concentrações testadas revelaram um aumento significativo no índice de dano genético ($F_{[1, 80]} = 51,776$; $P < 0,001$).

Os resultados obtidos revelam que houve um efeito dose-resposta, uma vez que à medida que a concentração de cloreto de benzalcónio aumentou observou-se também um aumento do dano genético total. Relativamente à percentagem relativa de cada classe de dano foi possível também observar uma tendência de aumento significativo da gravidade do dano em função do aumento da concentração de cloreto de benzalcónio (tabela 1). Ou seja, no grupo controlo a classe predominante de dano observada foi a classe 1, na concentração intermédia (0,324 mg/L) a classe predominante foi a classe 2 e na concentração mais elevada (1,050 mg/L) a classe mais observada foi a de maior dano genotóxico classe 4 (ver tabela 1).

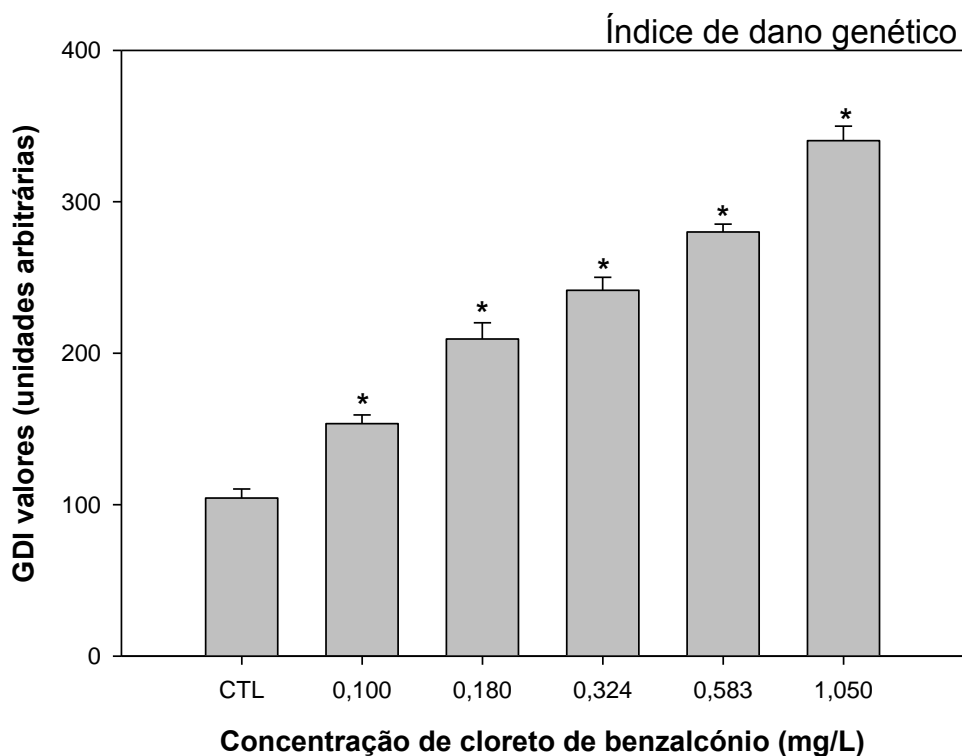


Figura 5. Resultados obtidos para o ensaio dos cometas após exposição crónica de *O. mykiss* a cloreto de benzalcónio. Os dados estão expressos como média \pm erro padrão. *Assinala as diferenças significativas entre concentrações e o grupo controlo (Teste de Dunnett, $P < 0,05$).

Tabela 1. Percentagem de dano para cada classe observada para todos os tratamentos (controlo e cinco concentrações de cloreto de benzalcónio).

As diferentes letras representam as diferenças significativas entre a percentagem de dano de cada classe entre as concentrações estudadas e o grupo controlo (Teste de Dunnett, $P < 0,05$).

PERCENTAGEM DO TIPO DE COMETA					
Concentrações (mg/L)	Classe 0	Classe 1	Classe 2	Classe 3	Classe 4
Controlo	9,2	77,8 ^a	12,3 ^a	0,7 ^a	0 ^a
0,100	0	58,9 ^b	28,7 ^b	12,4 ^b	0 ^a
0,180	0	36,8 ^b	27,7 ^b	24,7 ^b	11,8 ^b
0,324	0	18,2 ^b	35,9 ^b	32,0 ^b	13,9 ^b
0,583	0	8,8 ^b	31,5 ^b	37,1 ^b	24,8 ^b
1,050	0	0	18,8 ^a	43,0 ^b	48,7 ^b

V. Discussão

O sistema respiratório dos peixes proporciona a interface mais extensa entre o peixe e o meio aquático. As brânquias, órgão responsável pelas trocas com o meio, são as primeiras a sofrer alterações aquando da exposição dos organismos aos xenobióticos, porque são reconhecidas como a primeira linha do stress oxidativo e eliminação de agentes nocivos em peixes (Evans *et al.* 2005).

É mundialmente reconhecido que o cloreto de benzalcónio chega facilmente aos ecossistemas aquáticos (Li, 2008). Embora não se saiba claramente o seu mecanismo de toxicidade, sabe-se que interage com os lípidos membranares, levando à perturbação da integridade da membrana, causando efeitos tóxicos. A rutura da integridade membranares pode ter origem através da interferência na permeabilidade das proteínas membranares (Li, 2008). O stress oxidativo é um possível mecanismo que leva à rutura da integridade da membrana e, pode levar a uma diminuição da fluidez e aumento da permeabilidade a certos iões na membrana (Li, 2008). Deste modo, a sua afinidade com as estruturas biológicas membranares constitui um dos principais fatores da sua toxicidade (Eleftheriadis *et al.* 2002).

A catalase é uma enzima que contém o grupo heme que decompõe o peróxido de hidrogénio em água e oxigénio molecular, estando localizada principalmente nos peroxissomas. Segundo os cenários de stress oxidativo, a formação de um excesso de peróxido de hidrogénio, pode ocorrer pela dismutação de radicais superóxido, pela atividade da forma enzimática de superóxido (SOD) (Sohal e Weindruch, 1996). Os resultados obtidos neste estudo, indicam uma diminuição da atividade da catalase para duas das concentrações de cloreto de benzalcónio testadas ([0,583] e [1,050] mg/L). Para concentrações mais baixas ([0,100], [0,180] e [0,324] mg/L) a exposição da truta *Oncorhynchus mykiss* a cloreto de benzalcónio não causou alterações significativas na atividade da catalase das brânquias. Isto sugere que a formação de peróxido de hidrogénio não foi favorecido pela exposição a cloreto de benzalcónio a estas concentrações. Além disso, podemos supor que mesmo havendo formação de peróxido de hidrogénio, a sua degradação catalítica não foi acompanhada pelo aumento da atividade da catalase. No entanto, para os resultados obtidos para as concentrações mais altas ([0,583] e [1,050] mg/L) registou-se uma diminuição da produção de peróxido de

hidrogénio, através da diminuição da atividade da catalase que poderá ser justificado pelas condições oxidativas que os organismos expostos enfrentaram criadas pelo metabolismo do cloreto de benzalcónio.

Um estudo semelhante ao nosso foi desenvolvido por Messina *et al.* (2014) avaliou os efeitos provocados pela exposição de *Mytilus galloprovincialis* ao detergente lauril-sufato de sódio. No entanto, este estudo observou um aumento da atividade da catalase, que pode ser justificado pela rutura do equilíbrio osmótico e, como tal existe uma significativa indução de stress oxidativo que leva a que a atividade desta enzima aumente. O efeito da atividade da catalase foi estudada também por Yu *et al.* (2006) após a exposição do detergente sulfato de alquibenzeno linear em *Salix babylonica*. Apesar de se tratar de uma planta, observam-se resultados similares aos do presente estudo com a diminuição da atividade da catalase, promovida pela maior susceptibilidade desta planta às variações de dose do detergente em estudo. Um estudo feito por Li, (2008) revelou que após exposição de *Dugesia japonica* ao detergente lauril-sulfato, não se verificaram alterações na atividade da catalase. No entanto, e como o autor refere, este resultado pode ser devido às baixas concentrações de detergente usadas no ensaio. O Tween 80, foi também estudado para avaliar o seu efeito na catalase no peixe Curimatá por Da Silva e Meirelles, (2004), onde se observou uma diminuição da atividade enzimática da catalase e do citocromo P450. A presença de Tween 80 sugere uma inibição da atividade da catalase e uma acumulação de peróxido de hidrogénio, o que pode agravar o stress oxidativo.

No entanto, com outros produtos farmacêuticos testados em *O. mykiss* observaram-se resultados semelhantes ao do presente estudo, onde verificaram a diminuição da atividade da catalase, como é o caso de Yonar e Yonar (2010) que demonstram uma diminuição da atividade da catalase pela exposição de *O. mykiss* a verde malaquite (composto orgânico). Este estudo demonstrou que o verde malaquite tem um efeito negativo sobre o sistema oxidante devido à diminuição da capacidade antioxidante dos tecidos examinados. Este resultado pode ser possível devido ao aumento da acumulação em tecidos de verde malaquite.

O ensaio dos cometas apresenta diversas características que o torna uma opção prática para medir possíveis danos no DNA. Através de uma única célula é possível

avaliar a resposta de agentes potencialmente tóxicos a nível do DNA para determinada população em estudo. Este ensaio pode ser usado para processos que envolvam danos do DNA em várias áreas, como é o caso da toxicologia ambiental, biologia, estudos nutricionais bem como para a biomonitorização do cancro (Gyori *et al.* 2014). Analisando os resultados dos cometas, o cloreto de benzalcónio é capaz de induzir quebra no DNA das células de brânquias. Ferik *et al.* (2007) realizaram estudos para avaliar os efeitos genotóxicos de compostos de amónio quaternário em células de mamíferos e plantas. Os resultados obtidos mostraram danos significativos no DNA induzidos pelo cloreto de benzalcónio, e é possível observar mutações significativas em concentrações mais elevadas. O cloreto de benzalcónio pode causar danos no DNA da planta e tem impacto sobre a sua fertilidade. A exposição de *Danio rerio* a alquil-sulfatos, apresentaram diferenças significativas no ensaio dos cometas em estudos realizados por Sobrino-Figueroa, (2013). A avaliação apresentou diferenças significativas no número de células com quebras no DNA (formação de cometas). Células respiratórias humanas foram também expostas a cloreto de benzalcónio, e mais uma vez o ensaio dos cometas revelou um aumento de dano de DNA de forma dependente da dose utilizada (Deutschle *et al.* 2006). Este estudo permitiu a deteção de quebras de DNA de cadeia simples e outras lesões. Outros tipo de dano no DNA tais como mutações pontuais e cromossómicas não são detetadas. Em outros estudos realizados com *O. mykiss*, após exposição a inseticidas foram observadas alterações significativas na integridade do DNA das células como é o caso do estudo onde *O. mykiss* exposta a dimetoato foi capaz de induzir quebra no DNA das células recolhidas das brânquias, nos resultados reportados por Dogan *et al.* (2011). Observou DNA na cauda e concluiu que a quantidade de DNA que migrou para fora do núcleo induzia dano considerável. Outro estudo similar é de Altinok *et al.* (2012) que, confirmou a genotoxicidade de carbusolfan pela exposição crónica de *O. mykiss* a este inseticida através do ensaio dos cometas. O dano de DNA detetado neste ensaio pode ser considerado como mutagénico. Pode ter sido originado a partir de uma quebra de cadeia simples ou quebras de cadeia duplas ou ligações cruzadas, resultante da interação do pesticida ou dos seus metabolitos com o DNA.

Vários fatores exógenos podem induzir diversos tipos de lesões a nível do DNA: quebras simples e quebras duplas, bases oxidadas que são causadas por ação de

radiações ionizantes e espécies reativas de oxigénio, modificações nas bases, e ligações cruzadas inter e intracadeias do DNA (Azqueta e Collins, 2006). Danos no DNA podem levar a efeitos perturbadores sobre a transição, replicação, bem como a nível cromossómico do DNA (Azqueta e Collins, 2006). Um elevado nível de dano tende a desencadear a apoptose, enquanto níveis mais baixos são corrigidos através das vias de reparação de DNA (Azqueta e Collins, 2006). Quebras no DNA ocorrem maioritariamente aquando a sua replicação, dando assim origem às caudas formadas (cometas) associadas ao núcleo celular (Collins, 2004). O aparecimento de um cometa reflete dano a nível do DNA celular total. O uso de fluorescência *in situ*, sondas de DNA ou oligonucleotidos seriam extremamente úteis para localizar os cromossomas específicos, regiões de cromossomas, classes de DNA ou genes específicos dentro do cometa (Collins, 2004). Os danos a nível do DNA funcionam como um biomarcador quantitativo importante de estabilidade genética, na medida em que tem uma aplicação direta no estudo de genotoxicidade dos poluentes a nível ambiental e aquático (Azqueta e Collins, 2006). Como tal, o ensaio do cometa pode ser aplicado como um biomarcador sensível, económico e relativamente rápido para a deteção de dano. (Jha, 2008).

VI. Considerações finais

Os resultados dos estudos ecotoxicológicos aqui apresentados aparentam indicar que os níveis de cloreto de benzalcónio testados, ao nível do compartimento aquático representam uma ameaça direta para os organismos aquáticos, nomeadamente no que toca a efeitos genotóxicos. Os resultados obtidos através do ensaio dos cometas demonstram uma proporcionalidade direta com o aumento da concentração usada de cloreto de benzalcónio.

Com os resultados obtidos no presente estudo é possível concluir que o organismo teste utilizado apresenta elevada sensibilidade ao cloreto de benzalcónio, uma vez que mesmo em concentrações baixas (0,180mg/L) provoca dano significativo ao nível da integridade DNA, o qual revela características genotóxicas para este composto.

Poderá apresentar stress oxidativo em concentrações mais elevada (0,583 mg/L e 1,050 mg/L).

Como perspetiva futura deve incluir-se a possibilidade do estudo noutros órgãos como os olhos e o fígado que também são severamente afetados pela presença de substâncias em elevadas quantidades no meio ambiente. Estudos como este são cada vez mais importantes para se perceber o mecanismo de toxicidade e o impacto dos produtos farmacêuticos a nível aquático.

VII. Referências Bibliográficas

- Abel, P. D. (1974). Toxicity of synthetic detergents to fish and aquatic invertebrates. *Journal of Fish Biology*, 279-298.
- Aebi, H., (1984). Catalase in vitro. *Methods Enzymol.* 6, 105–121.
- Altinok, I., Capkin, E. e Boran, H. (2012). Mutagenic, genotoxic and enzyme inhibitory effects of carbosulfan in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 102, pp. 61-67.
- Amorim, L. C. A. (2003). Os biomarcadores e a sua aplicação na avaliação da exposição aos agentes químicos ambientais. *Rev. Bras. Epidemiol.* Vol.6.
- Andrade, V. M., Silva, J., Silva, F. R., Heuser, V. D., Dias, J. F., Yoneama, M. L. e Freitas, T. R. (2004). Fish as bioindicators to assess the effects of pollution in two southern Brazilian rivers using the Comet assay and micronucleus test. *Environ Mol Mutagen*, 44, 459-468.
- Ayas, Z., Ekmekci, G., Ozmen, M. e Yerli, S. V. (2007). Histopathological changes in the livers and kidneys of fish in Sariyar Reservoir, Turkey. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 23, 242-249.
- Azqueta, A. e Collins, A. R. (2006). The Comet Assay: A Sensitive and Quantitative Method for Analysis of DNA Damage. *Encyclopedia of Analytical Chemistry*. John Wiley & Sons, Ltd.
- Azqueta, A., Shaposhnikov, S. e Collins, A. R. (2009). DNA oxidation: investigating its key role in environmental mutagenesis with the comet assay. *Mutat Res*, 674, 101-108.
- Bernet, D., Schmidt, H., Meier, W., Burkhardt-Holm, P. e Wahli, T. (1999). Histopathology in fish: proposal for a protocol to assess aquatic pollution. *Journal of Fish Diseases*, 22, 25-34.
- Bernstein, Y. e Montgomery, W. L. (2008) Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*; Walbaum, 1792): a technical conservation assessment. [Em linha]. Disponível em <<http://www.fs.fed.us/r2/projects/scp/assessments/rainbowtrout.pdf>> [Consultado em 21/10/2014].
- Boon, J. P., Lewis, W. E., Tjoen, A. C. M. R., Allchin, C. R., Law, R. J., De Boer, J., Ten Hallers-Tjabbes, C. C. e Zegers, B. N. (2002). Levels of polybrominated diphenyl ether (PBDE) flame retardants in animals representing different trophic levels of the North Sea food Web. *Environ Sci Technol*, 36, 4025-4032.

- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 72, 248-254.
- Cengiz, E. I. e Unlu, E. (2006). Sublethal effects of commercial deltamethrin on the structure of the gill, liver and gut tissues of mosquitofish, *Gambusia affinis*: A microscopic study. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 21, 246-253.
- Claxton, L. D., Houk, V. S. e Hughes, T. J. (1998). Genotoxicity of industrial wastes and effluents. *Mutat Res*, 410, 237-243.
- Collins, A. R. (2004). The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations. *Mol Biotechnol*, 26, 249-261.
- Cserháti, T., Forgács, E. e Oros, G. (2002). Biological activity and environmental impact of anionic surfactants. *Environment International*, 28, 337-348.
- Da Silva, M. E. e Meirelles, N. C. (2004). Interaction of non-ionic surfactants with hepatic CYP in *Prochilodus scrofa*. *Toxicol In Vitro*, 18, 859-867.
- Daughton, C. G. e Ternes, T. A. (1999). Pharmaceuticals and personal care products in the environment: agents of subtle change? *Environ Health Perspect*, 107 (6), 907-938.
- De La Torre, F. R., Ferrari, L. e Salibian, A. (2005). Biomarkers of a native fish species (*Cnesterodon decemmaculatus*) application to the water toxicity assessment of a peri-urban polluted river of Argentina. *Chemosphere*, 59, 577-583.
- Deutschle, T., Porkert, U., Reiter, R., Keck, T. e Riechelmann, H. (2006). In vitro genotoxicity and cytotoxicity of benzalkonium chloride. *Toxicol In Vitro*, 20, 1472-1477.
- Dogan, D., Can, C., Kocyigit, A., Dikilitas, M., Taskin, A. e Bilinc, H. (2011). Dimethoate-induced oxidative stress and DNA damage in *Oncorhynchus mykiss*. *Chemosphere*, 84, pp. 39-46.
- Eleftheriadis, H., Cheong, M., Sandeman, S., Syam, P. P., Brittain, P., Klintworth, G.K., Lloyd, A. e Liu, C. (2002). Corneal toxicity secondary to inadvertent use of benzalkonium chloride preserved viscoelastic material in cataract surgery. *Br J Ophthalmol*, 86, 299-305.
- Evans, D. H., Piermarini, P. M. e Choe, K. P. (2005). The multifunctional fish gill: dominant site of gas exchange, osmoregulation, acid-base regulation, and excretion of nitrogenous waste. *Physiol Rev*, 85, 97-177.
- Ferk, F., Misik, M., Hoelzl, C., Uhl, M., Fuerhacker, M., Grillitsch, B., Parzefall, W., Nersesyan, A., Micieta, K., Grummt, T., Ehrlich, V. e Knasmuller, S. (2007).

- Benzalkonium chloride (BAC) and dimethyldioctadecyl-ammonium bromide (DDAB), two common quaternary ammonium compounds, cause genotoxic effects in mammalian and plant cells at environmentally relevant concentrations. *Mutagenesis*, 22, 363-370.
- Fisk, A. T., Hobson, K. A. e Norstrom, R. J. (2001). Influence of chemical and biological factors on trophic transfer of persistent organic pollutants in the northwater polynya marine food web. *Environ Sci Technol*, 35, 732-738.
- Gaber, M., Abu Shawish, H. M., Khedr, A. M. e Abed-Almonem, K. I. (2012). Determination of benzalkonium chloride preservative in pharmaceutical formulation of eye and ear drops using new potentiometric sensors. *Materials Science and Engineering: C*, 32, 2299-2305.
- Garcia, M. T., Ribosa, I., Guindulain, T., Sanchez-Leal, J. e Vives-Rego, J. (2001). Fate and effect of monoalkyl quaternary ammonium surfactants in the aquatic environment. *Environ Pollut*, 111, 169-175.
- Garcia-Santos S, Monteiro S. M., Carrola J., Fontainhas-Fernandes A. (2007). Alterações histológicas em brânquias de tilápia nilótica *Oreochromis niloticus* causadas pelo cádmio. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 59:376-381.
- Guilherme, S., Santos, M. A., Barroso, C., Gaivao, I. e Pacheco, M. (2012). Differential genotoxicity of Roundup((R)) formulation and its constituents in blood cells of fish (*Anguilla anguilla*): considerations on chemical interactions and DNA damaging mechanisms. *Ecotoxicology*, 21, 1381-1390.
- Gyori, B. M., Venkatachalam, G., Thiagarajan, P. S., Hsu, D. e Clement, M.-V. (2014). OpenComet: An automated tool for comet assay image analysis. *Redox Biology*, 2, 457-465.
- Helenius, A. e Simons, K. (1975). Solubilization of membranes by detergents. *Biochim Biophys Acta*, 415, 29-79.
- Ikehata, K., Jodeiri Naghashkar, N. e Gamal El-Din, M. (2006). Degradation of Aqueous Pharmaceuticals by Ozonation and Advanced Oxidation Processes: A Review. *Ozone: Science & Engineering*, 28, 353-414.
- Ivankovic, T. e Hrenovic, J. (2010). Surfactants in the environment. *Arh Hig Rada Toksikol*, 61, 95-110.
- Jha, A. N. (2008). Ecotoxicological applications and significance of the comet assay. *Mutagenesis*, 23, 207-221.
- Kümmerer, K. (2001). Introduction: Pharmaceuticals in the Environment. *In:*

- Kümmerer, K. (Ed.) *Pharmaceuticals in the Environment*. Springer Berlin Heidelberg, 1-8.
- Lee, R. F. e Steinert, S. (2003). Use of the single cell gel electrophoresis/comet assay for detecting DNA damage in aquatic (marine and freshwater) animals. *Mutat Res*, 544, 43-64.
- Li, M. H. (2008). Effects of nonionic and ionic surfactants on survival, oxidative stress, and cholinesterase activity of planarian. *Chemosphere*, 70, 1796-1803.
- Lopes, P. A., Pinheiro, T., Santos, M. C., Da Luz Mathias, M., Collares-Pereira, M. J. e Viegas-Crespo, A. M. (2001). Response of antioxidant enzymes in freshwater fish populations (*Leuciscus alburnoides* complex) to inorganic pollutants exposure. *Sci Total Environ*, 280, 153-163.
- Mayer, F. L., Ellersieck, M. R., Fish, U. S. e Service, W. (1986). *Manual of acute toxicity: interpretation and data base for 410 chemicals and 66 species of freshwater animals*. U.S. Dept. of the Interior, Fish and Wildlife Service.
- Mdegela, R., Myburgh, J., Correia, D., Braathen, M., Ejobi, F., Botha, C., Sandvik, M. e Skaare, J. U. (2006). Evaluation of the gill filament-based EROD assay in African sharptooth catfish (*Clarias gariepinus*) as a monitoring tool for waterborne PAH-type contaminants. *Ecotoxicology*, 15, 51-59.
- Messina, C. M., Faggio, C., Laudicella, V. A., Sanfilippo, M., Trischitta, F. e Santulli, A. (2014). Effect of sodium dodecyl sulfate (SDS) on stress response in the Mediterranean mussel (*Mytilus Galloprovincialis*): Regulatory volume decrease (Rvd) and modulation of biochemical markers related to oxidative stress. *Aquatic Toxicology*, 157, 94-100.
- Minier, C., Abarnou, A., Jaouen-Madoulet, A., Le Guellec, A. M., Tutundjian, R., Bocquene, G. e Le Boulenger, F. (2006). A pollution-monitoring pilot study involving contaminant and biomarker measurements in the Seine Estuary, France, using zebra mussels (*Dreissena polymorpha*). *Environ Toxicol Chem*, 25, 112-119.
- Nunes, B., Gaio, A. R., Carvalho, F. e Guilhermino, L. (2008). Behaviour and biomarkers of oxidative stress in *Gambusia holbrooki* after acute exposure to widely used pharmaceuticals and a detergent. *Ecotoxicol Environ Saf*, 71, 341-354.
- OECD (2000) - Fish, Juvenile Growth Test. OECD/ODCE Guideline for Testing Chemicals. nº 215. [Em linha]. Disponível em < <http://www.cerc.usgs.gov/data/acute/qryboth.asp?Chemical=BENZALKONIUM+CHLORIDE&logic=and&Species=RAINBOW+TROUT&sortby=Species> >. [Consultado em 14/08/2014].

- Parolini, M., Binelli, A., Cogni, D. e Provini, A. (2010). Multi-biomarker approach for the evaluation of the cyto-genotoxicity of paracetamol on the zebra mussel (*Dreissena polymorpha*). *Chemosphere*, 79, 489-498.
- Peakall, D. (1994). The role of biomarkers in environmental assessment (1). Introduction. *Ecotoxicology*, 3, 157-160.
- Ramos, A. S., Correia, A. T., Antunes, S. C., Gonçalves, F. e Nunes, B. (2014). Effect of acetaminophen exposure in *Oncorhynchus mykiss* gills and liver: Detoxification mechanisms, oxidative defence system and peroxidative damage. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 37, 1221-1228.
- Rodrigues, S., Antunes, S. C., Brandao, F. P., Castro, B. B., Goncalves, F. e Nunes, B. (2012). Effects of anticholinesterase drugs on biomarkers and behavior of pumpkinseed, *Lepomis gibbosus* (Linnaeus, 1758). *J Environ Monit*, 14, 1638-1644.
- Rodrigues, S., Correia, A. T., Antunes, S. C. e Nunes, B. (2014). Alterations in gills of *Lepomis gibbosus*, after acute exposure to several xenobiotics (pesticide, detergent and pharmaceuticals): morphometric and biochemical evaluation. *Drug Chem Toxicol*, 1-7.
- Rosen, M. J., Li, F., Morrall, S. W. e Versteeg, D. J. (2001). The relationship between the interfacial properties of surfactants and their toxicity to aquatic organisms. *Environ Sci Technol*, 35, 954-959.
- Sanchez, W., Piccini, B., Ditché, J.-M. e Porcher, J.-M. (2008). Assessment of seasonal variability of biomarkers in three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus* L.) from a low contaminated stream: Implication for environmental biomonitoring. *Environment International*, 34, 791-798.
- Sánchez-Fortún, S., Llorente, M. T. e Castaño, A. (2005). Genotoxic effects of selected biocides on RTG-2 fish cells by means of a modified Fast Micromethod Assay. *Aquatic Toxicology*, 73, 55-64.
- Schwaiger, J., Ferling, H., Mallow, U., Wintermayr, H. e Negele, R. D. (2004). Toxic effects of the non-steroidal anti-inflammatory drug diclofenac: Part I: histopathological alterations and bioaccumulation in rainbow trout. *Aquatic Toxicology*, 68, 141-150.
- Scott, M. J. e Jones, M. N. (2000). The biodegradation of surfactants in the environment. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1508, 235-251.
- Sobrino-Figueroa, A. S. (2013). Evaluation of oxidative stress and genetic damage caused by detergents in the zebrafish *Danio rerio* (Cyprinidae). *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 165, 528-532.

- Sohal, R. S. e Weindruch, R. (1996). Oxidative stress, caloric restriction, and aging. *Science*, 273, 59-63.
- Timbrell, J. A. (1998). Biomarkers in toxicology. *Toxicology*, 129, 1-12.
- Wilson, J. M., Bunte, R. M. e Carty, A. J. (2009). Evaluation of rapid cooling and tricaine methanesulfonate (MS222) as methods of euthanasia in zebrafish (*Danio rerio*). *J Am Assoc Lab Anim Sci*, 48, 785-789.
- Ying, G. G. (2006). Fate, behavior and effects of surfactants and their degradation products in the environment. *Environ Int*, 32, 417-431.
- Yonar, M. E. e Yonar, S. M. (2010). Changes in selected immunological parameters and antioxidant status of rainbow trout exposed to malachite green (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum, 1792). *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 97, 19-23.
- Yu, X., Trapp, S., Zhou, P., Peng, X. e Cao, X. (2006). Response of weeping willows to linear alkylbenzene sulfonate. *Chemosphere*, 64, 43-48.