

Annie da Silva Gonçalves

Avaliação ecotoxicológica e histopatológica dos efeitos do cloreto de benzalcónio no peixe mosquito (*Gambusia holbrooki*) após exposição aguda



Faculdade de Ciências da Saúde
Universidade Fernando Pessoa

Porto 2010

С. Е. А.
А. И. О. В. С.

Annie da Silva Gonçalves

Avaliação ecotoxicológica e histopatológica dos efeitos do cloreto de benzalcónio no peixe mosquito (*Gambusia holbrooki*) após exposição aguda



Faculdade de Ciências da Saúde
Universidade Fernando Pessoa

Porto 2010

Avaliação ecotoxicológica e histopatológica dos efeitos do cloreto de benzalcônio no peixe mosquito (*Gambusia holbrooki*) após exposição aguda

Monografia apresentada à Universidade Fernando Pessoa como parte dos requisitos para obtenção do grau de Licenciado em Ciências Farmacêuticas.

Sumário

A poluição antropogénica de natureza química tem vindo a aumentar de forma considerável. A acção mais importante que os poluentes poderão exercer serão contribuir para o desenvolvimento de efeitos tóxicos, que pode decorrer da sua capacidade de interagir de forma deletéria com os sistemas biológicos. Os detergentes são compostos de origem antropogénica amplamente disseminados a nível ambiental, o que conduz à possibilidade de exercer alterações fisiológicas em organismos expostos. De forma a avaliar os riscos que os xenobióticos de origem antropogénica poderão colocar às espécies aquáticas, têm-se recorrido a biomarcadores, já que a alteração de qualquer mecanismo ou via fisiológica/metabólica/comportamental de um organismo exposto pode indicar o modo e a extensão de actuação do contaminante ambiental. No presente estudo recorreu-se ao uso da acetilcolinesterase e marcadores histológicos como biomarcadores, de forma a fazer uma avaliação ecotoxicológica dos efeitos do cloreto de benzalcónio no peixe mosquito (*Gambusia holbrooki*) após exposição aguda. Não foram observadas alterações significativas a nível da actividade colinesterásica nem histopatológica após exposição aguda do peixe mosquito, o que leva a questionar a utilização destas ferramentas em estudos ecotoxicológicos envolvendo detergentes.

Abstract

Anthropogenic pollution of chemical nature has increased considerably. The most important action that pollutants may exert is related with their contribution to the development of toxic effects, which may derive from their ability to interact with biological systems. Detergents are anthropogenic compounds widely disseminated in the environment, a fact that leads to the possibility of exerting physiological changes in exposed organisms. To assess the risks that anthropogenic xenobiotics can pose to aquatic species, biomarkers have been commonly used. The modification of any pathway involved in physiological/metabolic/behavioural parameters may indicate the mode and extent of activity of a given environmental contaminant. The present study involved the use of acetylcholinesterase inhibition and histopathological alteration as biomarkers, to assess the ecotoxicologic effects of benzalkonium chloride in mosquitofish (*Gambusia holbrooki*), following acute exposure. Acetylcholinesterasic activity and histological features remained unchanged following acute exposure of the mentioned species. These observations lead us to question the use of these tools in ecotoxicologic studies for the assessment of effects caused by detergents.

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. Bruno Nunes, o meu orientador, por ter contribuído exaustivamente na execução da pesquisa, pela sua constante disponibilidade, pelo seu incentivo e sobretudo pelo seu voto de confiança.

Ao Prof. Dr. Alberto Correio, o meu co-orientador, pela colaboração ao longo da pesquisa e pelos seus conselhos.

Aos meus pais, Américo dias Gonçalves e Clementina da Silva José, pelo vosso amor, paciência, confiança e a quem serei eternamente grata por tudo o que fizeram e ainda fazem por mim.

Ao meu irmão, Michael, que me soube ouvir, que me apoiou em todos os momentos mais tensos e que me ensinou a encarar as coisas boas e menos boas que vão surgindo ao longo da vida.

Aos meus amigos e namorado, que sempre me foram fiéis, agradeço todos os momentos passados juntos, os conselhos, as confidências, as gargalhadas, as noites de estudo sem fim e o apoio incondicional. Agradeço o vosso amor e amizade.

Índice

Introdução	1
Poluição ambiental	1
Patologias derivadas da exposição a agentes tóxicos pelo ambiente	4
A poluição da água	5
Presença e efeitos de compostos antropogénicos	6
Contaminação e consumo da água	7
Efeitos biológicos dos detergentes	8
Ecotoxicidade de detergentes	9
Cloreto de benzalcónio – efeitos ecotoxicológicos	10
Ensaio ecotoxicológicos em ambiente aquático	11
Testes ecotoxicológicos padronizados	12
Modalidade de avaliação do impacto de compostos antropogénicos no ambiente -Biomarcadores	13
Actividade acetilcolinesterásica como biomarcador	14
A análise histopatológica como biomarcador	15

Material de estudo -----	17
Objectivos do trabalho -----	18
Material e Métodos -----	19
Captura dos organismos -----	19
Exposição ao tóxico -----	20
Determinação da actividade colinesterásica -----	21
Análise histológica -----	22
Tratamento dos dados e análise estatística -----	22
Resultados -----	22
Análise enzimática -----	22
Análise histopatológica -----	23
Discussão -----	25
Bibliografia -----	29

Índice de figuras

Figura 1 – Material biológico - *Gambusia holbrooki*

Figura 2 – A e B - Pateira de Fermentelos é uma lagoa natural, localizada no triângulo Águeda, Aveiro, Oliveira do Bairro, antes da confluência do Rio Cértima com o Rio Águeda, pertencendo na sua parte Sul ao Concelho de Águeda (freguesias de Ois da Ribeira, Espinhel e Fermentelos).

Figura 3 – Efeitos do cloreto de benzalcónio sobre a actividade da acetilcolinesterase a partir do homogeneizado da cabeça total do macho *G. holbrooki*.

Anexo 1 – Secção de filamentos brânquiais de *Gambusia holbrooki* do grupo controlo (40x)

Anexo 2 – Arquitectura de uma secção de fígado de *Gambusia holbrooki* do grupo controlo (40x)

Anexo 3 – Secção de filamentos brânquiais de *Gambusia holbrooki* do grupo exposto a uma concentração de cloreto de benzalcónio de 0.023 mg/l (10x)

Anexo 4 – Arquitectura de uma secção de fígado de *Gambusia holbrooki* do grupo exposto a uma concentração de cloreto de benzalcónio de 0.023 mg/l (40x)

Anexo 5 – Secção de filamentos brânquiais de *Gambusia holbrooki* do grupo exposto a uma concentração de cloreto de benzalcónio de 0.047 mg/l (40x)

Anexo 6 – Arquitectura de uma secção de fígado de *Gambusia holbrooki* do grupo exposto a uma concentração de cloreto de benzalcónio de 0.047 mg/l (40x)

Anexo 7 – Secção de filamentos brânquiais de *Gambusia holbrooki* do grupo exposto a uma concentração de cloreto de benzalcónio de 0.094 mg/l (10x)

Anexo 8 – Arquitectura de uma secção de fígado de *Gambusia holbrooki* do grupo exposto a uma concentração de cloreto de benzalcónio de 0.094 mg/l (40x)

Anexo 9 – Secção de filamentos brânquiais de *Gambusia holbrooki* do grupo exposto a uma concentração de cloreto de benzalcónio de 0.19 mg/l (40x)

Anexo 10 – Arquitectura de uma secção de fígado de *Gambusia holbrooki* do grupo exposto a uma concentração de cloreto de benzalcónio de 0.19 mg/l (40x)

Anexo 11 – Secção de filamentos brânquiais de *Gambusia holbrooki* do grupo exposto a uma concentração de cloreto de benzalcónio de 0.375 mg/l (40x)

Anexo 12 – Arquitectura de uma secção de fígado de *Gambusia holbrooki* do grupo exposto a uma concentração de cloreto de benzalcónio de 0.375 mg/l (40x)

Abreviaturas

AChE – acetilcolinesterase

ADN - ácido desoxirribonucleico

BChE - butirilcolinesterase

CDB - Cloreto de Benzalcónio

ChE - colinesterase

LC₅₀ - Dose letal a 50%

OCDE - Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Económico

ONU – Organização das Nações Unidas

SDS - sodium dodecyl sulfate (Dodecil sulfato de sódio)

US-EPA - United States Environmental Protection Agency (Agência de Protecção Ambiental dos Estados Unidos da América)

WHO - World Health Organization (Organização Mundial de Saúde)

Introdução

Poluição ambiental

“O que é o meio ambiente? Uma realidade científica, um tema de agitação, o objecto de um grande receio, uma diversão, uma especulação? Tudo ao mesmo tempo” (George, 1984). Na verdade, o meio ambiente consiste no conjunto dos sistemas naturais e dos seres vivos que os habitam, assim como na relação que estabelecem entre si. O meio ambiente inclui a luz, o ar, a água, o solo e os seres vivos que com ele coabitam (George, 1984). Assim, é possível introduzir em todas estas relações factores que perturbem a dinâmica de interacção, nomeadamente por mão Humana. Factores que causem alteração significativa neste equilíbrio decerto serão responsáveis por sobressaltos, com maior ou menor intensidade nos processos próprios do meio ambiente. Entre os factores que mais contribuem para esta alteração deletéria encontra-se genericamente, a poluição.

De uma forma geral, entende-se por poluição qualquer degradação, deterioração ou estrago das condições ambientais do habitat de uma colectividade humana, normalmente associada à diminuição da qualidade de vida devido a mudanças ambientais (George, 1984). Os agentes que provocam a poluição são chamados poluentes, e podem ter naturezas muito distintas: um ruído excessivo, um gás nocivo na atmosfera, detritos que sujam os rios ou ainda um cartaz publicitário que degrada o aspecto visual de uma paisagem (George, 1984). Para além destas formas, existem outros acontecimentos que constituem a poluição: a própria aglomeração urbana é, por si só, uma fonte de poluição, pois implica numerosos problemas ambientais tais como a acumulação de lixo, esgotos, congestionamento de tráfego, entre muitos outros. Quando se considera a poluição de natureza química, podemos referir que os poluentes podem ser de estrutura, origem, natureza e destino muito diversos. Os poluentes são subprodutos de processos industriais ou domésticos, e podem ter origem orgânica ou inorgânica. Assim, é impossível falar de poluição de forma simplista, sem referir exaustivamente as naturezas dos agentes poluidores, bem como os efeitos ambientais previstos ou esperados, devido à interacção desses mesmos agentes com as estruturas biológicas.

A poluição antropogénica de natureza química evoluiu desde os seus primórdios, tanto em termos de tipo como de intensidade. O grande marco temporal aqui a reter prende-se com o momento em que o Homem, de uma forma generalizada e sistemática, passou a alterar a Natureza, com vista à obtenção de produtos que satisfizessem as suas necessidades civilizacionais. A partir da Revolução Industrial, a poluição passou a constituir um problema para a humanidade, pois o grau de poluição cresceu acentuadamente e a sua escala deixou de ser apenas local para se tornar global. A “explosão” da actividade industrial contribuiu grandemente para a melhoria da qualidade de vida e do conforto humano, mas, por outro lado, fez disparar o grau de poluição (do ar, da água e dos solos) levando a graves danos ambientais. Poucas são as substâncias sintetizadas pelo homem e lançadas no meio ambiente que não tenham qualquer efeito sobre a biosfera, até porque dependendo das condições em que se encontram, podem transformar-se num poluente mais ou menos lesivo (George, 1984).

A contaminação do meio ambiente é causada pela presença de substâncias ou microrganismos nocivos à saúde mas sem no entanto causar desequilíbrio ecológico. Já a poluição promove o desequilíbrio ecológico, ou seja, comporta alterações ecológicas causadas pela emissão de substâncias tóxicas no ambiente que ultrapassam a capacidade de autodepuração do ambiente (McCarthy e Shugart, 1990).

A poluição da água ocorre quando esta é negativamente afectada pela adição de grandes quantidades de materiais na água. A água é considerada poluída quando é imprópria para uso Humano. Existem dois tipos distintos de poluentes aquáticos, os poluentes provenientes de fontes pontuais e os poluentes provenientes de fontes difusas. As fontes pontuais de poluição ocorrem quando substâncias nocivas são lançadas directamente na água (ex: derramamento de petróleo), enquanto que fontes difusas são poluentes introduzidos na água de forma indirecta, através de mudanças ambientais por exemplo. As fontes difusas são muito mais difíceis de controlar (Richman, 1997).

Os factores que podem modificar o meio ambiente são essencialmente provocados pela actividade doméstica e económica/industrial/extractiva do Homem. A acção mais perigosa dos poluentes é o exercício de efeitos tóxicos, que pode decorrer da sua

capacidade de interagir de forma deletéria com os sistemas biológicos. Um dos aspectos mais importantes desta interacção reside no potencial que alguns poluentes demonstram de sofrer acumulação e conseqüente aumento da sua concentração nos animais e vegetais. Este fenómeno pode ficar a dever-se ao efeito de bioamplificação, em que se verifica um aumento da concentração do poluente ao longo dos níveis da cadeia trófica. Assim, predadores de topo, como o ser Humano, podem ser contaminados com concentrações suficientemente elevadas de determinados xenobióticos antropogénicos que podem conduzir à toxicidade (Miranda e Ribeiro, 2006). Compostos com características lipofílicas têm tendência a sofrer acumulação nos tecidos adiposos dos organismos, onde as suas concentrações ultrapassam as concentrações presentes no ambiente devido ao fenómeno de bioacumulação. Estes compostos podem ser transportados por via trófica ao longo da cadeia alimentar e atingir níveis consideráveis, até mesmo tóxicos, nos tecidos dos predadores situados no topo da cadeia alimentar, incluindo os humanos, durante o fenómeno de biomagnificação. Os efeitos indirectos de tal processo podem caracterizar-se por mudanças a vários níveis, como mudanças fisiológicas adaptativas ou até comportamentais. Os efeitos directos variam com a intensidade da impregnação a nível dos tecidos nos organismos, sendo esta determinada pelas propriedades da molécula do contaminante e pelas características dos indivíduos expostos (Miranda *et al.*, 2006).

Hoje em dia, proteger o Ambiente é uma das principais lutas do Homem moderno. Ao longo das décadas, inúmeras substâncias químicas foram lançadas para o meio ambiente, por intermédio das mais diversas formas de poluição. Sendo que esta poluição pode alterar de forma irreversível a harmonia e equilíbrio do meio ambiente, torna-se necessário desenvolver novas tecnologias que respeitem o ambiente. Devido aos vários problemas ambientais provocados pelas actividades humanas, tais como o aumento do buraco na camada do ozono, o aumento do efeito de estufa e conseqüente aquecimento global do planeta, vários efeitos graves foram sendo progressivamente observados, como a perda de biodiversidade e a redução da qualidade de vida (Gomes de Castro *et al.*, 2003).

Patologias derivadas da exposição a agentes tóxicos pelo ambiente

Segundo a organização Mundial de Saúde (WHO), aproximadamente 1/3 das doenças humanas à escala global pode ser atribuído a factores ambientais (WHO, 2002). A exposição a poluentes de origem ambiental, sobretudo durante as fases mais precoces do desenvolvimento, podem ter graves consequências na idade adulta. Segundo Dietert e Dietert (2008) a imunotoxicidade induzida por agentes xenobióticos, ou seja compostos químicos estranhos a um organismo ou sistema biológico, em fases precoces da vida são factores relevantes no aparecimento de doenças crónicas durante a infância e na idade adulta. A infância é uma fase de sensibilidade aumentada a agressões imunitárias devido ao sistema imunitário ser imaturo perante os agentes xenobióticos (Dietert, 2008). Os riscos resultantes das agressões tóxicas ao sistema imunológico das crianças incluem cancro, doenças infecciosas, doenças autoimunes, assim como patologias neurológicas, reprodutivas e endócrinas, que podem aparecer ainda durante a infância. Além dos riscos mencionados anteriormente, o autismo também é apresentado como uma deficiência que tende a estar, de forma exponencial, relacionada com factores ambientais, como poluentes, embora ainda não se saiba se os factores ambientais estão directamente ligados à patologia cerebral ou se representam apenas uma condição secundária (Dietert e Dietert 2008).

Por outro lado, Kvitko *et al.* (2008) descreve como a leucemia aguda pode estar relacionada com a combinação de factores genéticos e ambientais, sendo as influências ambientais derivadas da exposição ocupacional e por lazer. Produtos neurotóxicos tais como solventes orgânicos, pesticidas organofosforados e o monóxido de carbono estão presentes em muitos locais de trabalho. A superexposição a estes produtos pode levar a doenças como polineuropatia, encefalopatia e síndrome de Parkinson (Triebig, 2010). Assim, é hoje reconhecida como fundamental uma caracterização toxicológica profunda, com base em dados obtidos em animais de experiência, das diversas matrizes com as quais os Humanos poderão contactar, com vista à protecção da sua saúde e bem estar (Arias *et al.*, 2007).

A poluição da água

A questão da poluição aquática é particularmente importante no contexto global, pois a evolução dos processos de eliminação de resíduos de origem humana resulta frequentemente na contaminação da água. Devido ao facto da maioria dos resíduos ser libertada para o ambiente aquático, e este ser um processo contínuo, a dispersão de poluentes está facilitada. “Se se presta uma certa atenção para não poluir demasiadamente o ar que se respira, a água, em compensação, a dos oceanos como a dos rios, é tradicionalmente considerada como um meio de evacuação de uma parte dos detritos das sociedades humanas” (George, 1984). Os processos domésticos modernos conduzem inevitavelmente à contaminação da água, pois esta é considerada como um meio de escoamento apropriado dos nossos resíduos. Apesar do desenho, concepção e aperfeiçoamento de sistemas de tratamento de resíduos líquidos, os esforços não têm impedido a libertação continuada de substâncias tóxicas para o meio ambiente (Krishnan *et al.*, 1997).

As fontes de poluição aquática são diversas, e de múltipla natureza. As actividades humanas (consumo doméstico de águas e conseqüente envio para estações de tratamento de águas residuais, indústrias, agricultura, transportes, aquacultura, lançamento directo de resíduos...) são responsáveis pela alteração da qualidade e quantidade de água que pode ser aproveitada para o consumo humano (Ma *et al.*, 2009). São igualmente responsáveis por influenciar o ciclo da água, reduzindo a sua disponibilidade para consumo humano. Uma água considera-se poluída quando as concentrações de um elemento ou substância se encontram acima dos valores considerados adequados para um determinado fim (George, 1984). Os sinais que indicam que uma água está poluída são por exemplo o sabor desagradável da água de consumo humano, o crescimento exagerado de algas, o cheiro desagradável, o decréscimo da variedade e quantidade de espécies ou ainda o sabor desagradável do peixe (Cook *et al.*, 2004). No entanto, a contaminação da água pode não ser evidente, tanto do ponto de vista sensorial como instrumental, pois as concentrações nas quais se encontram os poluentes são reduzidas, embora possam ser suficientes para causar danos biológicos e ecológicos importantes (Cook *et al.*, 2004). De acordo com este princípio, torna-se importante fazer uma avaliação criteriosa da composição do meio aquático, e

por outro lado, estabelecer quais os efeitos que se podem esperar da presença dos contaminantes avaliados no passo anterior a diversos níveis organizacionais. O efeito pode não ser evidente a todos os níveis do ecossistema, mas o comprometimento do funcionamento do mesmo pode ocorrer em múltiplos níveis. Assim, é de fundamental importância determinar qual o efeito biológico que se pode esperar dos poluentes que se sabe estarem presentes, e em que organismos esses efeitos podem ser observados (George, 1984).

Presença e efeitos de compostos antropogénicos

Os meios hídricos por si só conseguem eliminar grande parte das contaminações (por autodepuração). Mesmo assim essa capacidade de renovação é limitada devido à crescente acumulação de poluentes não biodegradáveis e orgânicos. Essa crescente poluição coloca em risco a qualidade da água dos lagos, rios e mares colocando por sua vez a sobrevivência do Homem em causa, já que a água é um bem essencial. O uso de compostos antropogénicos pode levar ao seu aparecimento em todas as redes de abastecimento. O elevado grau de contaminação da água pode comprometer de forma séria o seu futuro uso para consumo Humano (quando sob a forma de água potável), já que grande parte do que rejeitamos (tudo não aparece, uma parte considerável é depurada) surge na água para consumo Humano. Todos os organismos são, inevitavelmente, expostos a xenobióticos que na maioria são de origem antropogénica (Thompson *et al.*, 2007).

Grande número de compostos antropogénicos têm propriedades lipofílicas, os que lhes permite serem facilmente absorvidos pelo organismo mas dificilmente eliminados (Ying, 2006). Para evitar os efeitos potencialmente tóxicos destes compostos no organismo, este último possui a capacidade de os tornar mais hidrossolúveis, através de enzimas que se localizam essencialmente no fígado, dando-se dessa forma a biotransformação de xenobióticos e sua conseqüente eliminação (Ying, 2006). No entanto, este processo que visa o aumento da hidrossolubilidade dos compostos nem sempre permite que eles sejam convenientemente eliminados, e alguns compostos veiculados pela água contaminada atingem concentrações no organismo capazes de conduzir a efeitos deletérios. Assim, torna-se imprescindível a quantificação não só das

concentrações em que estes resíduos se encontram, mas também a caracterização dos seus potenciais efeitos biológicos (Ying, 2006).

Contaminação e consumo da água

A problemática da contaminação da água para consumo humano é actual e requer atenção política. “Água contaminada mata 5 mil crianças por dia”. Esta estimativa resulta de um alerta feito pela Unicef. Segundo Ban Ki-moon, Secretário-Geral da ONU, o futuro da humanidade depende da gestão adequada do recurso hídrico (Araújo, 2009). Se por um lado a água doce é um recurso finito e limitado por outro é renovável. A poluição tende a dificultar o seu processo de renovação diminuindo a quantidade disponível. É muito importante uma gestão correcta não só da água superficial, mas também da água que está armazenada no subsolo. Isto porque, além das águas subterrâneas constituírem a maioria da água doce disponível no planeta Terra, também representam uma fonte mais económica e rentável, já que na sua maioria estas águas dispensam tratamento (Rivett *et al.*, 2008) Os Homens recorrem frequentemente às águas subterrâneas para diversas utilizações, o que resulta em que alguns dos maiores rios do planeta não possuem água suficiente para manter o seu curso normal (Rivett *et al.*, 2008).

As águas subterrâneas provêm a partir de um processo físico designado por infiltração onde existe um fluxo de água para o solo, pela que a água passa a constituir a humidade do solo e aquíferos. Esta água pode voltar à superfície ou ainda passar para os oceanos. A água subterrânea tem tendência a mover-se e a ser substituída lentamente, pelo que pode permanecer em aquíferos por milhares de anos (Datta *et al.*, 2009). O facto da água mover-se sobre e sob a terra tendo a capacidade de captar e dissolver terra, sedimentos, sais, compostos solúveis permite também que poluentes se infiltram e aí permaneçam durante muitos anos (Datta *et al.*, 2009). A capacidade de dissolver substâncias, tais como as acima descritas, por intermédio da água é igualmente válida para outras classes de substâncias, tais como xenobióticos hidrossolúveis. Entre esta classe, destacam-se os compostos detergentes, que são amplamente utilizados na formulação de produtos de higiene corporal, medicamentosos e de utilização industrial (Sirisattha *et al.*, 2004).

Efeitos biológicos dos detergentes

Entre os compostos de origem humana mais amplamente libertados para o meio aquático encontram-se os detergentes (Li, 2008). Estes são utilizados pelo facto de permitirem acções de limpeza, de desengorduramento e de lubrificação, sendo utilizados não só a nível doméstico como industrial (Sirisattha *et al.*, 2004). Assim, este amplo uso, resulta na sua presença nas águas residuais em grandes quantidades. Apesar de serem maioritariamente degradáveis, os detergentes podem surgir em elevadas quantidades no meio aquático, pois a capacidade degradativa do ambiente é excedida pelas quantidades que são colocadas por mão humana. Devido à maior parte dos detergentes possuírem propriedades lipofílicas, estes têm maior facilidade em penetrar nas membranas celulares. Em consequência, quanto maior for a lipossolubilidade do detergente maior será a sua absorção e a sua toxicidade no organismo (Cserhádi *et al.*, 2002). A presença dos detergentes em ambientes aquáticos pode assim conduzir a situações em que se evidenciem respostas toxicológicas importantes, que é necessário quantificar e monitorizar.

Em geral, os efeitos tóxicos dos tensoactivos são observados através de danos causados nas brânquias e na epiderme dos vertebrados aquáticos, mas também a nível da membrana celular dos invertebrados aquáticos (Li, 2008). A toxicidade dos tensoactivos foi inicialmente determinada pela capacidade que eles tinham em ser adsorvidos e penetrar através da membrana celular dos organismos (Li, 2008), no entanto, o mecanismo de toxicidade dos tensoactivos permanece inexplicável após a adsorção do tensoactivo pela superfície membranar. Apenas se sabe que existe uma interacção com a membrana lipídica que parece perturbar a integridade da membrana causando efeitos tóxicos (Li, 2008). Por outro lado, um outro tipo de interacção pode surgir. Effendy e Maibach (1996) afirmam que a capacidade dos tensoactivos solubilizarem membranas lipídicas deve-se à concentração existente e à proporção molar tensoactivo-lípidos. Em baixas concentrações, as membranas perdem a sua função de barreira, aumentando grandemente a permeabilidade, enquanto que em concentrações mais elevadas, em geral acima da concentração micelar crítica, ocorre lise das células. Foi demonstrado por Ying (2006) que os tensoactivos catiónicos eram mais tóxicos do que os tensoactivos aniónicos.

Devido aos detergentes possuírem propriedades que os tornam indispensáveis no dia-a-dia, a possibilidade de desenvolver detergentes menos irritantes é de grande interesse. A toxicidade dos detergentes limita o seu uso, na medida em que podem causar irritações a nível da pele, como já foi descrito anteriormente (Effendy e Maibach, 1996).

Ecotoxicidade de detergentes

Os compostos orgânicos sintéticos são poluentes que podem estar na origem dos distúrbios ambientais acima referidos. Principalmente após a Segunda Guerra Mundial a produção destes últimos cresceu de uma forma considerável, sendo que os compostos orgânicos sintéticos estão presentes, por exemplo, nos combustíveis, nos plásticos, nos solventes, nos pesticidas, nos detergentes, nas tintas, nos produtos farmacêuticos ou ainda nos aditivos alimentares (Prodanchuk *et al.*, 2004). A maior parte dos compostos orgânicos são biodegradáveis, ou seja, são decompostos por bactérias. No entanto, alguns compostos orgânicos sintetizados industrialmente, devido às suas estruturas químicas, são resistentes à acção bacteriana, persistem na água durante longos períodos de tempo atingindo concentrações tão altas que se tornam nocivos para os peixes e outras formas de vida aquática, mesmo quando presentes em concentrações mínimas, e conferem cheiros, cores e sabores desagradáveis à água. Estes compostos também podem ser chamados de recalcitrantes ou biologicamente resistentes (Prodanchuk *et al.*, 2004).

Entre os compostos orgânicos acima referidos, destaca-se a classe dos detergentes, quer pelo seu uso (enorme quantidade de utilização), quer pelos seus efeitos físicos, químicos e biológicos. Os detergentes são misturas usadas para limpeza que contêm na sua composição compostos tensioactivos sintéticos (Effendy e Maibach, 1996). Os tensioactivos são usados para baixar a tensão superficial da água de forma a facilitar a molhabilidade e remoção da sujidade. Estes compostos são tóxicos e geralmente biodegradáveis (Scott e Jones, 2000). A degradação dos tensioactivos faz-se genericamente através da actividade microbiana, sendo este um dos primeiros passos da sua transformação no meio ambiente. Entende-se por degradação primária quando a estrutura do detergente se altera de tal forma que a molécula perde as suas propriedades

tensioactivas (Scott e Jones, 2000). A biodegradação destes compostos é essencial para reduzir o seu impacto no meio ambiente (Ying, 2006). Após a sua utilização, os resíduos de tensioactivos e os metabolitos provenientes da sua degradação são lançados para as estações de tratamento de águas ou directamente para as águas de superfície, dispersando-se em vários compartimentos ambientais (Ying, 2006). As espumas provenientes de detergentes sintéticos são responsáveis pela inibição do crescimento dos microorganismos heterotróficos, tais como bactérias ou fungos, sendo estes responsáveis pela autodepuração da água (decomposição da matéria orgânica e diluição de poluentes tóxicos) ou pela eliminação de bactérias ou vírus quando utilizados em estações de depuração (Knud-Hansen, 1994). Alguns detergentes libertam fosfatos que constituem nutrientes e dessa forma permitem a hiperproliferação das algas, este fenómeno designa-se por eutrofização. A oxigenação da água dos rios é comprometida e consequentemente transforma-os em águas com qualidade muito deficiente (Knud-Hansen, 1994).

Cloreto de benzalcónio – efeitos ecotoxicológicos

O cloreto de benzalcónio é um composto catiónico e está inserido no grupo de compostos de amónio quaternário. Os compostos de amónio quaternário são moléculas compostas por, pelo menos, uma longa cadeia alquílica hidrofóbica e por um átomo de azoto com carga positiva (Nalecz-Jawecki *et al.*, 2003). Sendo um composto catiónico, apresenta uma superfície com propriedades específicas que permite a sua utilização como tensioactivo quando dissolvido em água. O cloreto de benzalcónio é uma mistura de diversas formas de cloreto de alquilbenzil dimetilamónio, conhecido por ser um agente tensioactivo assim como antimicrobiano (His *et al.*, 1996). Este agente é utilizado em produtos farmacêuticos maioritariamente como conservante, mas também, em solução diluída, pode ser usado na pele e mucosas na desinfecção de feridas por exemplo (Effendy e Maibach, 1996). Na pele os tensioactivos catiónicos são considerados irritativos e citotóxicos. O cloreto de benzalcónio também é amplamente usado como desinfectante de superfícies a nível hospitalar (Kummerer *et al.*, 1997).

Compostos tensioactivos, tal como o cloreto de benzalcónio, apresentam elevada actividade biológica, por um lado pela capacidade de ligação das macromoléculas

Avaliação ecotoxicológica e histopatológica dos efeitos do cloreto de benzalcónio no peixe mosquito (*Gambusia holbrooki*) após exposição aguda

bioactivas como o amido, proteínas, péptidos e ADN, por outro pela inserção em vários fragmentos celulares causando dessa forma desregulação (Cserháti et al., 2002). Foi demonstrada em vários estudos a ocorrência de ligação dos tensioactivos a proteínas e péptidos. Esta ligação pode causar uma alteração no entrelaçar da cadeia polipeptídica e alterar a carga de superfície da molécula podendo levar a uma modificação da função biológica (Cserháti et al., 2002).

Este composto pode exercer efeitos biológicos a outro nível. Segundo reportou Ciereszko e os seus colaboradores (2004) o cloreto de benzalcónio, dentro do intervalo de concentração de 0,002-0,015%, inibe a mobilidade do esperma das lampreias do mar ao aglutinar os espermatozóides. As propriedades espermicidas do cloreto de benzalcónio devem-se ao facto de ser um detergente cuja estrutura tem afinidade com as membranas lipídicas. O LC₅₀ do cloreto de benzalcónio em peixes situa-se entre 0.5 e 5.0 ppm (Nalecz-Jawecki *et al.*, 2003). O cloreto de benzalcónio é muito tóxico para os peixes a 100mg/L para uma duração de exposição de 15 minutos (Waller *et al.*, 1996).

Os tensioactivos catiónicos são considerados biologicamente degradáveis quando em condições aeróbias, embora a biodegradação varie de um tensioactivo para outro. Em contrapartida, sob condições anaeróbias os compostos de amónio quaternário apresentam nenhuma ou pouca biodegradabilidade (Ying, 2006).

Ensaio ecotoxicológicos em ambiente aquático

Uma das principais vertentes da ciência ambiental reside na realização de estudos ecotoxicológicos. Estes têm por objectivo conhecer e caracterizar a interacção entre os compostos tóxicos de origem natural e antropogénica e o Ambiente, de modo a proteger os sistemas ecológicos dos efeitos destes compostos, antecipando a sua via de distribuição no ambiente assim como os seus efeitos ecológicos. Os dados de ecotoxicidade são usados para definir a concentração aceitável de um dado poluente no ambiente assim como para fazer uma avaliação de risco (George, 1984). Estes estudos também informam acerca dos efeitos que os químicos podem provocar, a curto

(toxicidade aguda) e a longo prazo (toxicidade crónica), no ser humano e em organismos não alvo eventualmente expostos. É importante ter em conta as diferenças entre os sistemas biológicos estudados, principalmente quando são estudados em invertebrados e se pretende extrapolar para vertebrados. Esta preocupação é justificável de modo a permitir uma extrapolação dos resultados o mais próxima da realidade possível, e consequentemente mais fiável. Para esse efeito é fundamental determinar quais os biomarcadores mais adequados para avaliar os efeitos dos diferentes poluentes, mas também fazer a selecção de espécies-chave que funcionem como bioindicadores dos ecossistemas em estudo. A selecção criteriosa dos parâmetros de toxicidade a ser observados, após exposição a agentes veiculados pelo ambiente, garante a obtenção de respostas biológicas mensuráveis, que se relacionem com os potenciais efeitos que serão produzidos a diferentes níveis tróficos ou de organização biológica. A observação de uma alteração fisiológica é assim importante, pois garante que não ocorrerão sub-avaliações dos potenciais efeitos tóxicos (George, 1984).

Testes ecotoxicológicos padronizados

No sentido de uniformizar a realização e a interpretação dos ensaios ecotoxicológicos, facilitando a comunicação dos mesmos a nível internacional, surgiram várias organizações supra-governamentais. Assim, podemos recorrer a ensaios de toxicidade padronizados segundo normas emanadas de organizações, como a Organização de Cooperação e Desenvolvimento Económico (OCDE), a United States Environmental Protection Agency (US-EPA) ou até mesmo da União Europeia.

Os produtos químicos desempenham um papel importante na vida diária.

No sentido da salvaguarda da segurança do Homem e do meio ambiente, quando expostos a compostos de origem humana no seu dia-a-dia, torna-se necessário quantificar os seus potenciais efeitos toxicológicos, de forma cuidada e criteriosa. Assim, e visto pretendermos no presente projecto avaliar os efeitos decorrentes da exposição de um organismo aquático ao detergente cloreto de benzalcónio, utilizamos uma norma da OCDE. As normas da OCDE, relativamente aos ensaios de produtos químicos, são uma compilação dos mais relevantes métodos de ensaio, acordados internacionalmente, e são usados pelo governo, indústria e laboratórios independentes

com o objectivo de avaliar a segurança dos produtos químicos.

Modalidade de avaliação do impacto de compostos antropogénicos no ambiente - Biomarcadores

Como foi acima referido, é fundamental caracterizar a resposta tóxica que pode decorrer da exposição a agentes antropogénicos, e aos quais os diversos organismos possam estar expostos por via ambiental. Assim, existem parâmetros que se relacionam com efeitos a nível sub-individual que os agentes tóxicos veiculados pelo ambiente podem exercer. A alteração de qualquer mecanismo ou via fisiológica/metabólica/comportamental (biomarcador) de um organismo exposto pode fornecer-nos indicações importantes sobre a modalidade de actuação do contaminante ambiental. O uso de biomarcadores fornece assim indicações acerca dos riscos de exposição a agentes químicos. Os biomarcadores de toxicidade ou de efeitos adversos traduzem-se em qualquer resposta biológica, avaliada quando os organismos são expostos a um composto químico (Timbrell, 1996). Podemos verificar essas respostas a vários níveis: bioquímico, morfológico, fisiológico, imunológico, histológico e comportamental (Gomes de Castro *et al.*, 2003). Os biomarcadores permitem comparar se estes parâmetros diferem entre um indivíduo exposto a um dado químico e um indivíduo normal (Gomes de Castro *et al.*, 2003). Podemos classificar os biomarcadores em três grupos: biomarcadores de exposição, biomarcadores de efeito e biomarcadores de susceptibilidade. Os biomarcadores de exposição pouco ou nada nos informam acerca do significado biológico de uma dada exposição a um poluente. Os biomarcadores de efeito, além da exposição, também nos informam acerca da intensidade do efeito do poluente, mas sem no entanto indicar a causa desse efeito. Por último, os biomarcadores de susceptibilidade medem a capacidade induzida de um indivíduo apresentar uma resposta a um dado composto (Gomes de Castro *et al.*, 2003).

O uso de biomarcadores na Ecotoxicologia tem vindo a ser uma rotina muito útil, sendo uma ferramenta valiosa para avaliar os efeitos de agentes químicos no ambiente (Nunes *et al.*, 2005). Um dos biomarcadores mais utilizados prende-se com a inibição das colinesterases por alguns agentes químicos presentes no ambiente. Estas formas enzimáticas são fisiologicamente fundamentais, pelo que constituem mecanismos-chave

cuja alteração pode induzir perturbações na fisiologia e comportamento dos organismos expostos.

Actividade acetilcolinesterásica como biomarcador

As colinesterases (ChE) são membros de uma família de enzimas chamadas esterases, uma vez que apresentam a capacidade de hidrolisar ligações do tipo éster de uma grande variedade de substratos (Jaganathan e Boopathy, 2000). Existem dois tipos de colinesterases: i) as que têm alta afinidade pela acetilcolina (acetilcolinesterase – AChE) e ii) as de baixa afinidade pela mesma (butirilcolinesterase – BChE). Os peixes vertebrados normalmente possuem AChE no cérebro, embora nos músculos ambas estejam presentes (Sturm *et al.*, 2000). A acetilcolinesterase (AChE) é responsável pela hidrólise rápida e efectiva do neurotransmissor acetilcolina. Esta enzima participa no processo de transmissão do impulso nervoso nas fendas sinápticas. A inibição da AChE traduz-se numa acumulação de acetilcolina nas sinapses, provocando uma estimulação colinérgica contínua que pode desencadear, dependendo do grau de acumulação, efeitos agudos causando a morte dos organismos expostos aos agentes anticolinesterásicos. Alguns dos sintomas nos animais intoxicados são tremores, convulsões, paralisia e bradicardia (Rickwood e Galloway, 2004).

A inibição de colinesterases (ChE) é amplamente usada como um biomarcador de exposição a pesticidas, tais como carbamatos e organofosforados (Nunes *et al.*, 2008). O mecanismo tóxico que explica a actuação destes compostos prende-se com a inibição selectiva das colinesterases dos organismos expostos. Assim, a inibição colinesterásica constitui-se como um biomarcador altamente específico que evidencia a exposição de organismos a agentes anticolinesterásicos (Nunes *et al.*, 2008).

No entanto, e apesar desta suposta especificidade, alguns estudos referem a possibilidade de ser uma ferramenta útil na avaliação da exposição ambiental a outros compostos, tais como detergentes. Alguns estudos recentes indicam que alguns tensoactivos podem inibir a actividade de colinesterases nos animais aquáticos (Li, 2008; Pandey *et al.*, 2003; Almeida *et al.*, 2002). No entanto, a maior parte das inibições de colinesterases foram observadas em experiências *in vitro* (Li, 2008) e muito

poucas foram observadas em experiências *in vivo* (Li, 2008; Nunes *et al.*, 2008). Devido a ser comum a existência de detergentes no meio aquático, é de grande relevo examinar o efeito de diferentes tipos de detergentes na potencial inibição de colinesterases dos animais aquáticos (Li, 2008). De acordo com este objectivo, o presente trabalho envolveu a determinação e a caracterização dos efeitos tóxicos decorrentes da exposição de um organismo aquático, ao detergente cloreto de benzalcónio. Tal facto justifica-se pela presença de cloreto de benzalcónio em preparações farmacêuticas e dermocosméticas, pelo que é potencialmente um agente contaminante do meio aquático (Jaganathan e Boopathy, 2000).

A carga positiva da molécula do cloreto de benzalcónio interage com várias proteínas, com alta afinidade e de uma forma muito específica, influenciando as suas funções. Nas junções neuromusculares, o cloreto de benzalcónio bloqueia a transmissão do impulso nervoso actuando como agonista da acetilcolina já que é inibidor da acetilcolinesterase (Jaganathan e Boopathy, 2000). Dado que o cloreto de benzalcónio tem um grupo de amónio quaternário similar a muitos outros inibidores reversíveis de colinesterases, é de grande interesse analisar os efeitos produzidos por ele a nível das funções catalisadoras de colinesterases (Jaganathan e Boopathy, 2000).

A análise histopatológica como biomarcador

As alterações a nível estrutural das células, tecidos e órgãos constituem um parâmetro fundamental a ser considerado na avaliação do potencial tóxico de contaminantes sobre os organismos vivos. Os dados histopatológicos de órgãos-alvos específicos podem expressar condições ambientais assim como podem representar o tempo de exposição aos quais os organismos foram submetidos (Stentiford *et al.*, 2003). É possível identificar os órgãos-alvos mais afectados pela exposição a um contaminante, bem como detectar a sensibilidade do organismo relativamente à intensidade tóxica de um dado contaminante através da alteração morfológica dos tecidos, podendo-se inclusive quantificar essa alteração. A histopatologia permite simultaneamente diferenciar lesões causadas por doenças de danos induzidos pela exposição a factores ambientais, como poluentes. As respostas oxidativas e histopatológicas dos peixes são variáveis diferem dependendo da espécie, do habitat e dos hábitos alimentares, sendo que, todos os

biomarcadores têm a vantagem de medir respostas quantitativamente com informações fundamentais de relevância ecológica nos efeitos agudos e crónicos da poluição aquática (Stentiford *et al.*, 2003).

Os órgãos e tecidos mais seleccionados com o intuito de aferir as respostas de um organismo aquático, em particular os peixes, à exposição a um poluente e/ou contaminante, são as brânquias e o fígado (Clemente *et al.*, 2010; Costa *et al.*, 2009; Pichardo *et al.*, 2006).

As brânquias são um importante órgão nos peixes já que estão em contacto directo e constante com a água do meio. As brânquias são os órgãos respiratórios típicos do meio aquático a partir das quais se realizam as trocas gasosas. As trocas gasosas realizam-se através de um sistema de capilares que está em contacto directo com o meio ambiente, pelo que daí podem ocorrer lesões prejudiciais provocadas, por exemplo, por sedimentos, parasitas e/ou xenobióticos. As brânquias são estruturas vitais para a saúde dos peixes, pois além de serem o principal ponto de trocas gasosas, estão também envolvidas nos processos de osmorregulação, equilíbrio ácido-básico e excreção de compostos nitrogenados (Cengiz e Unlu, 2003 ;Ballesteros *et al.*, 2009; Costa *et al.*, 2009).

Foi demonstrado através de vários estudos histopatológicos, em que peixes eram expostos a poluentes, que as brânquias eram tecidos primários para a poluição aquática. Este facto explica-se pelo facto das brânquias serem uma das principais vias de entrada dos poluentes no organismo. Danos a nível das brânquias podem ser prejudiciais à saúde dos peixes e por isso são consideradas um óptimo indicador dos níveis de poluição da água (Cengiz e Unlu, 2006).

O fígado é o principal órgão com potencial de biotransformação, bioactivação e excreção de xenobióticos sendo por isso, um dos principais órgãos alvo que pode reflectir a exposição a contaminantes (Clemente *et al.*, 2010). Este órgão exerce uma função básica na conversão dos alimentos, armazenamento de compostos de reserva, biotransformação e desintoxicação quando em presença de compostos tóxicos antropogénicos; por isso, qualquer disfunção a nível deste órgão pode alterar de forma significativa a saúde do peixe (Velmurugan *et al.*, 2007). As células hepáticas têm um

papel fundamental em diversas funções essenciais para a sobrevivência da espécie tais como no metabolismo de proteínas, lípidos e hidratos de carbono. Servem, também, de local de armazenamento para muitos nutrientes tais como a glucose. Além disso, estão envolvidas no processo da hematopoiese, durante a vida larvar do peixe, na produção de anticorpos e na secreção biliar (Velmurugan *et al.*, 2007).

Material de estudo

A captura, aclimação e utilização de organismos para ensaios de ecotoxicidade, em geral é realizada de acordo com as normas da Organização de Cooperação e Desenvolvimento Económico (OCDE), sob condições controladas. Estes organismos são expostos a diferentes factores de stress tais como a sua captura, o seu transporte e a sua adaptação às condições laboratoriais (Quintaneiro *et al.*, 2008), com consequências na qualidade dos resultados. Devido a este facto, é muito importante escolher a espécie de peixe mais adaptável às condições laboratoriais de forma aos resultados serem os mais rigorosos possíveis. Algumas das características requisitadas são por exemplo o fácil manejo dos peixes, uma óptima reprodutibilidade dos ensaios e resultados, disponibilidade durante todo o ano, sensibilidade aos tóxicos e pequenas dimensões.

O presente estudo envolveu a utilização de indivíduos da espécie de peixe dulçaquícola *Gambusia holbrooki* (*n.v. gambusia*), capturados na região centro de Portugal continental, na Pateira de Fermentelos, Aveiro.

Gambusia holbrooki pertence à família dos Poeciliidae e é vulgarmente conhecido como peixe mosquito ou gambusia devido ao facto de se alimentar de larvas de mosquito. Parece ter sido introduzido em Portugal no século XIX, na bacia do rio Sado, para controlar ou eliminar os mosquitos veículos da malária (Cabral *et al.*, 1998). É encontrado em condições de clima temperado, incluindo estuários e rios portugueses. É geralmente abundante, pois tem uma fecundidade muito elevada, fácil de capturar e pode ser mantido sob condições controladas em laboratório. É capaz de se adaptar facilmente a variadas condições ambientais. Adapta-se melhor a águas temperadas de fluxo lento ou paradas, com alguma vegetação aquática. O peixe mosquito é um

Avaliação ecotoxicológica e histopatológica dos efeitos do cloreto de benzalcónio no peixe mosquito
(*Gambusia holbrooki*) após exposição aguda

omnívero oportunista já que se alimenta de insectos terrestres que caem na superfície da água, bem como invertebrados aquáticos (algas filamentosas, zooplâncton e besouros por exemplo) (Cabral *et al.*, 1998).

A manutenção desta espécie em laboratório é relativamente fácil já que podem ser mantidos em aquários de pequenas dimensões devido ao seu pequeno tamanho (machos medem entre 2 a 2,5 cm e as fêmeas entre 5 a 6 cm) apresentando dimorfismo sexual (Nunes *et al.*, 2008). O facto de se adaptar a águas salobras e possuir as características intrínsecas enunciadas anteriormente, torna *Gambusia holbrooki* uma espécie adequada a testes de ecotoxicidade em condições estuarinas (Nunes *et al.*, 2008).



Figura 1 – Material biológico - *Gambusia holbrooki* (adaptado a partir de <http://www.bretagne-environnement.org>).

Objectivos do trabalho

O presente trabalho destina-se a avaliar os efeitos agudos causados por diversas concentrações do tensioactivo catiónico cloreto de benzalcónio, sobre a actividade das colinesterases (ChE) presentes na totalidade da cabeça de gambusia (*Gambusia holbrooki*) e em parâmetros histopatológicos nos tecidos hepático e branquial.

Material e Métodos

Captura dos organismos

Os peixes foram capturados na Pateira de Fermentelos com uma rede de camaroeiro (2007). Após a captura dos peixes, as fêmeas foram rejeitadas e libertadas e os machos adultos foram mantidos sob condições controladas em laboratório (água desclorada, temperatura a 20°C, fotoperíodo correspondente a 16 horas de luz e 8 horas de escuridão e arejamento contínuo), durante um período de um mês antes de efectuar os testes de toxicidade. A diferenciação entre os machos e as fêmeas foi feita a partir da visualização da morfologia externa, nomeadamente da barbatana anal. Este período visou proporcionar uma quarentena (um mês) durante a qual os animais doentes ou feridos foram eliminados. Os peixes foram alimentados diariamente com comida de peixe disponível no comércio (Sera Vipán®).



A

Avaliação ecotoxicológica e histopatológica dos efeitos do cloreto de benzalcónio no peixe mosquito (*Gambusia holbrooki*) após exposição aguda



B

Figura 2 – A e B - Pateira de Fermentelos é uma lagoa natural, localizada no triângulo Águeda, Aveiro, Oliveira do Bairro, antes da confluência do Rio Cértima com o Rio Águeda, pertencendo na sua parte Sul ao Concelho de Águeda (freguesias de Ois da Ribeira, Espinhel e Fermentelos) (adaptado a partir de <http://i.olhares.com> e <http://media.photobucket.com>).

Exposição ao tóxico

A fase de exposição foi realizada segundo a norma 203 (OECD, 1992), que diz respeito aos ensaios de toxicidade aguda aquática com peixes. Segundo o que é preconizado nesta norma, os peixes foram expostos à substância em estudo durante um período de 96h. O ensaio foi validado já que a mortalidade dos peixes que serviram de controlo não excedeu os 10 por cento, no final do ensaio. As condições mantiveram-se constantes ao longo do ensaio: a concentração de oxigénio dissolvido foi monitorizada (de modo a garantir que não se encontraria abaixo de 60 por cento de percentagem de saturação em oxigénio ao longo de todo o ensaio).

Os intervalos de concentrações foram escolhidos tendo em conta o valor do LC₅₀ calculado para espécies muito similares à *Gambusia holbrooki*, sendo o Goldfish (*Tanichthys albonubes*) e o Zebrafish (*Danio rerio*) (em termos de dimensões, habitat e

condições biológicas) (Intorre *et al.* 2007). As concentrações de cloreto de benzalcónio foram as seguintes: 0.024, 0.047, 0.0938, 0.1875 e 0.375 mg/l. Este ensaio também teve um controlo (peixes não expostos). Os machos adultos foram expostos individualmente em 200 ml de água da torneira previamente desclorinada. Para cada concentração foram usadas 10 réplicas (10 peixes machos expostos individualmente). Mantiveram-se as condições abióticas constantes ao longo do ensaio (fotoperíodo correspondente a 16 horas de luz e 8 horas de escuridão, temperatura de $20\pm 1^{\circ}\text{C}$ e arejamento contínuo). Ao longo da exposição não foi fornecido qualquer alimento aos peixes. O material usado para este ensaio foi constituído por recipientes de plástico, lavados com água destilada. O meio, em que estavam inseridos os peixes, foi renovado 48 horas após o início da exposição. Parâmetros como a mortalidade, o pH, a temperatura e o oxigénio dissolvido foram monitorizados ao longo do período de exposição, de forma a validar o método. Após a exposição, os peixes foram processados de modo a proceder à determinação da actividade colinesterásica e da quantificação das alterações histopatológicas.

Determinação da actividade colinesterásica

Os machos foram sacrificados por decapitação, tendo de seguida homogeneizado os tecidos da cabeça, em tampão fosfato gelado (0.1 M, pH = 7.2). Os tecidos homogeneizados foram centrifugados a 3300 rpm durante 3 minutos e os sobrenadantes foram utilizados para proceder à determinação enzimática. A actividade colinesterásica foi determinada pelo método de Ellman *et al.* (1961) adaptado a microplaca, conforme descreveu Guilhermino *et al.* (1996), mas usando 0,050 ml de tecidos homogeneizados e 0,250 ml de solução de reacção. A concentração da proteína presente nas amostras foi determinada de acordo com o método de Bradford (1976) adaptado a microplaca, de forma a expressar a actividade enzimática em função do teor proteico das amostras analisadas. Foi determinado que a forma colinesterásica predominante presente na cabeça da *Gambusia holbrooki* era a acetilcolinesterase, que usualmente se apresenta sob forma globular ancorada às membranas pós-sinápticas (Nunes *et al.*, 2005). De acordo com os resultados obtidos por Nunes *et al.* (2005) a acetilcolinesterase é a enzima predominante no homogeneizado da cabeça total dos peixes *Gambusia holbrooki*.

Análise histológica

Após o sacrifício dos animais, procedeu-se ao isolamento dos tecidos hepático e branquial. O tratamento ao qual foram sujeitas as 10 réplicas de peixes para cada concentração, inclusive as 10 réplicas do grupo controlo, foi por ordem de execução a fixação química em solução Bouin, a descalcificação, seguida da desidratação numa série de soluções de álcool, com graduações crescentes de 70 a 100%. A seguir realizou-se a fixação em parafina (56-58°C) e os respectivos cortes num micrótopo rotativo (5-7 µm). Os cortes em finas lamelas foram fixados em lâminas e corados com hemotoxilina-eosina. Observaram-se as lâminas ao microscópio óptico em diferentes ampliações (10x e 40x) e por fim procedeu-se à análise qualitativa de alterações estruturais ao nível das brânquias e do fígado.

Tratamento dos dados e análise estatística

Após terem sido verificados os pressupostos associados à realização de testes estatísticos paramétricos (distribuição normal e homogeneidade de variâncias), a detecção de eventuais diferenças entre grupos foi feita com recurso a uma análise de variância unifactorial (ANOVA), seguida pelo teste de Dunnett. O nível de significância (α) foi de 0,05.

Resultados

Análise enzimática

O cloreto de benzalcónio não provocou nenhuma resposta a nível da actividade colinesterásica ($F = 1.89$; d.f. 5,49; $p > 0.05$), após exposição aguda. Embora se observe uma pequena diminuição da actividade colinesterásica esta não foi considerada significativa.

Avaliação ecotoxicológica e histopatológica dos efeitos do cloreto de benzalcónio no peixe mosquito (*Gambusia holbrooki*) após exposição aguda

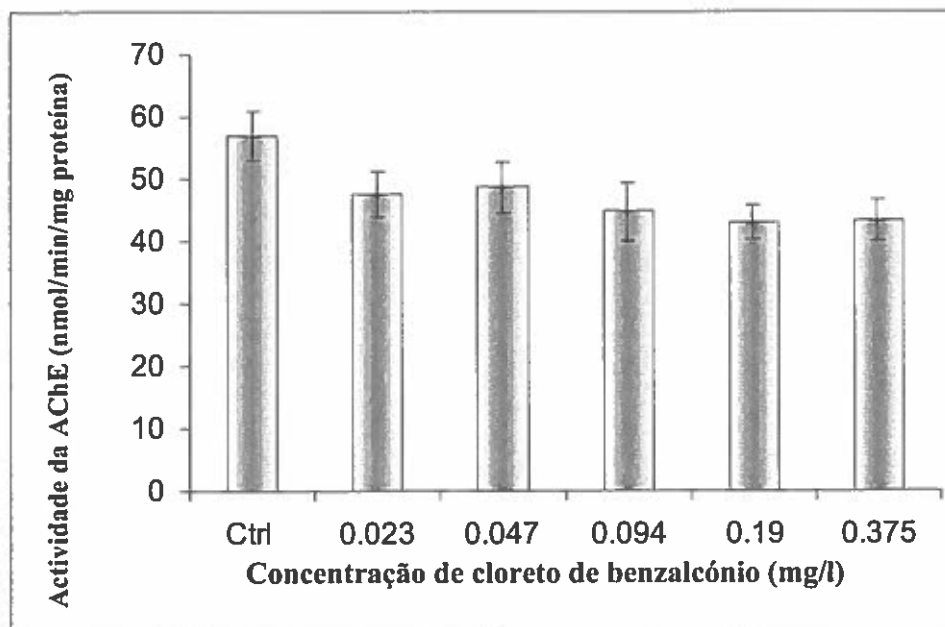


Figura 3 – Efeitos do cloreto de benzalcónio sobre a actividade da acetilcolinesterase a partir do homogeneizado da cabeça total do macho *G. holbrooki*. Os valores correspondem à media das dez réplicas em ensaio com as correspondentes barras de erro padrão.

Análise histopatológica

Após 96h de exposição ao cloreto de benzalcónio, nas condições laboratoriais acima enunciadas, observaram-se algumas lesões a nível das brânquias, nas diferentes concentrações assim como no controlo (anexo 1), nomeadamente fusão das lamelas secundárias, levantamento epitelial e edema intra-epitelial.

Relativamente ao fígado, este apresentou um aspecto normal, sem quaisquer indícios de alteração tecidular (anexo 2).

Comparando qualitativamente o controlo relativamente aos grupos expostos às diferentes concentrações de cloreto de benzalcónio não se observam diferenças

Avaliação ecotoxicológica e histopatológica dos efeitos do cloreto de benzalcónio no peixe mosquito
(*Gambusia holbrooki*) após exposição aguda

significativas. Ou seja, apesar de se ter efectuado apenas uma análise qualitativa, verificou-se que a distribuição das diferentes lesões foi regular em todos os grupos.

Discussão

Uma das principais observações que se podem tirar deste trabalho foi uma ausência de resposta significativa da actividade da AChE após exposição ao cloreto de benzalcónio. Em teoria, os resíduos provenientes de detergentes têm a capacidade de interagir com as formas colinesterásicas ancoradas às membranas pós-sinápticas, inibindo dessa forma a sua actividade fisiológica hidrolítica (Rickwood e Galloway, 2004). No entanto, o cloreto de benzalcónio não causou uma inibição significativa da actividade da AChE *in vivo*. Estudos anteriores foram realizados a fim de demonstrar que ocorria inibição colinesterásica após exposição a detergentes (Guilhermino *et al.*, 1996; Guilhermino, *et al.*, 2000). A exposição de machos de *Gambusia holbrooki* ao cloreto de benzalcónio não suscitou qualquer modificação mensurável significativa na actividade da AChE. Sugere-se então que sob condições *in vivo*, o cloreto de benzalcónio pode não atingir uma concentração suficientemente significativa no sistema nervoso do organismo para sustentar o rompimento da estrutura da membrana celular ou uma interacção com a enzima e portanto dessa forma não causar nenhum efeito evidente sobre a actividade da AChE. Este facto pode dever-se à extrema dificuldade em absorver grandes quantidades de detergente a partir do meio exterior e/ou à extensa degradação biológica devida à metabolização (Nunes *et al.*, 2005). O facto deste tipo de composto ser pouco absorvido/extensivamente degradado e eliminado no tracto gastrointestinal dos peixes pode questionar a utilização da inibição da actividade da AChE em programas de biomonitorização. A exposição a detergentes pode não ser convenientemente avaliada utilizando como biomarcador a actividade da AChE. As diferenças entre os resultados da literatura e os obtidos neste trabalho também sugerem diferenças inter-específicas nos mecanismos de toxicidade, que devem ser bem entendidas antes da utilização de modelos animais em Ecotoxicologia e ensaios de biomonitorização (Nunes *et al.*, 2005).

Segundo Cserhádi *et al.* (2002) as bases moleculares da actividade biológica e toxicológica dos detergentes aniónicos ainda não está inteiramente entendida. Sabe-se que os detergentes aniónicos conseguem ligar-se às proteínas e modificar a actividade de várias enzimas, ou outro tipo de células, resultando numa disfunção. Mesmo assim, a relação quantitativa entre parâmetros moleculares, biológicos e actividades ambientais ainda não foi elucidada em detalhes. Outro trabalho realizado por Nunes *et al.* (2006)

demonstrou que após exposição de *A. parthenogenetica* a um agente aniónico, SDS, a inibição da actividade da ChE não foi significativa. O SDS causou *in vitro* uma inibição significativa da actividade da AChE, embora em exposição *in vivo* não tenha desencadeado nenhuma resposta a nível deste biomarcador. Estas diferenças sugerem que o mecanismo de actividade do SDS sobre a AChE depende da capacidade de este exercer um efeito inibitório directo (Nunes *et al.*, 2005) por formação de micelas que aprisionam a AChE membranar no seu interior e impedem a hidrólise do substrato utilizado na determinação por intermédio do método de Ellman. Ao utilizar um agente capaz de destabilizar emulsões (alterando a constante dielétrica do meio), tal como o etanol, foi possível causar um aumento na actividade da AChE total, até valores normais e mesmo na presença de elevadas concentrações deste detergente. Esta conclusão aponta para o envolvimento e capacidade do detergente SDS no comprometimento da actividade acetilcolinesterásica, mas somente em altas concentrações e em exposição *in vitro* (Nunes *et al.*, 2005). A ausência de efeitos decorrentes do ensaio *in vivo* pode ser consequência de uma menor absorção de SDS, proveniente do meio externo, devido provavelmente às barreiras fisiológicas, do organismo, que impediram a entrada do detergente e, conseqüentemente, impossibilitaram a visualização de efeitos directos (Nunes *et al.*, 2005).

Os diferentes grupos do presente estudo, apresentaram todos lesões similares, que podem ter ocorrido devido ao facto das concentrações, ou ainda o tempo de exposição, não terem sido suficientemente elevados para causar modificações estruturais a nível do órgão. Os diferentes danos histopatológicos causados a nível das brânquias podem ter sido respostas a curto prazo, devido ao stress induzido pelo tensioactivo, mas que após algum tempo as respectivas células teriam a capacidade de recuperar (Álvarez-Muñoz *et al.* 2009). Dessa forma podemos afirmar que não houve correlação entre efeito/dose.

Segundo os estudos conduzidos por intermédio de Li (2008), os efeitos tóxicos genéricos dos detergentes podem ser observados através de danos a nível das brânquias e epiderme dos vertebrados aquáticos, pelo que estes tecidos específicos são geralmente bons indicadores de danos tóxicos.

A toxicidade genérica do cloreto de benzalcónio tem sido amplamente estudada na sequência de intoxicações nos humanos por este composto Riechelmann *et al.*, (2004).

Avaliação ecotoxicológica e histopatológica dos efeitos do cloreto de benzalcónio no peixe mosquito (*Gambusia holbrooki*) após exposição aguda

Um dos principais aspectos da toxicidade do cloreto de benzalcónio é a sua afinidade com estruturas biológicas, tais como cílios. Segundo o trabalho de Riechelmann *et al.* (2004) a exposição da mucosa nasal humana a preparações farmacêuticas que contenham cloreto de benzalcónio pode causar ciliotoxicidade devido ao aumento do teor em mieloperoxidase e uma inflamação geral. Este composto também foi considerado tóxico quando utilizado em preparações intra-oculares, usadas em operações cirúrgicas para tratar cataratas, por terem sido observadas várias alterações histológicas (Eleftheriadis *et al.*, 2002). Estes estudos sugerem que a análise histopatológica pode servir como metodologia alternativa valiosa para estudar os efeitos causados pelo cloreto de benzalcónio, em vez de quantificar a actividade da AChE. Em termos de ecotoxicidade, outros autores realizaram previamente a avaliação dos riscos decorrentes da exposição ao cloreto de benzalcónio. Como demonstrou Intorre *et al.* (2007) este composto é moderadamente tóxico (em termos de mortalidade) para pimpão (*Carassius auratus*) quando comparado com vários outros compostos utilizados nos processos de aquicultura, tais como a formalina, o verde malaquite e o permanganato de potássio.

Segundo Cengiz e Unlu (2003), cujo trabalho incidiu na avaliação histológica de danos a nível do tecido branquial de *Gambusia affinis* após exposição a um insecticida (malatião), as brânquias constituem um óptimo bioindicador de exposição e efeito. Álvarez-Muñoz *et al.* (2009) também apresentaram um estudo onde se destacaram danos a nível branquial tais como fusão lamelar, edema intraepitelial e levantamento de camadas epiteliais, após exposição de *Solea senegalensis* a um tensioactivo aniónico.

Danos a nível das brânquias tais como proliferação tecidual, fusão da lamela secundária e deslocamento do epitélio branquial revelaram forte correlação com formas de contaminação aguda. Por outro lado, danos do tipo aneurisma podem estar associados ao stress causado durante o sacrifício. Devido às modificações observada nas brânquias serem pouco específicas, já que também foram observadas no grupo controlo, estas podem ser meramente um reflexo a adaptações fisiológicas devido a um possível estado de stress (Álvarez-Muñoz *et al.* 2009).

Avaliação ecotoxicológica e histopatológica dos efeitos do cloreto de benzalcónio no peixe mosquito (*Gambusia holbrooki*) após exposição aguda

Relativamente ao tecido hepático como biomarcador histopatológico, este também é uma ferramenta útil na avaliação do papel dos contaminantes aquáticos nos ecossistemas (Lang *et al.*, 2006). Na espécie piscícola *Gobiocypris rarus* este tecido demonstrou sofrer alterações tais como acumulação lipídica no citoplasma, hipertrofia dos hepatócitos, aumento do tamanho nuclear após exposição a compostos octilfenólicos e etinilestradiol (Zha *et al.*, 2007). No peixe africano *Clarias gariepinus* o tecido hepático, após exposição a um herbicida (glifosato), sofreu as seguintes alterações: aumento do tamanho dos hepatócitos, aumento do tamanho do núcleo e núcleos picnóticos, aumento da densidade do tecido conjuntivo, vacuolização, isto após exposição a um herbicida (glifosato) (Olurin *et al.*, 2006). Foram detectados sinais de vacuolização hepática, que provavelmente pode ser causada por acumulação de glicogénio, lípidos ou água nos hepatócitos. No entanto, a vacuolização é uma resposta comum a diversos compostos químicos (Liao *et al.*, 2006).

Juntamente com a poluição, outras condições exógenas podem influenciar a análise histopatológica característica de um órgão. Para minimizar as alterações histológicas que são causadas por outras variáveis que não as causadas pelo contaminante em estudo, uma selecção padronizada da amostra deve ser tida em conta (Bernet *et al.*, 1999). Para tal, idealmente tem de se ter em conta o tamanho da amostra, a espécie, a idade, o sexo e estágio de maturidade sexual, a estação do ano da amostragem e das possíveis migrações da amostra (Bernet *et al.*, 1999).

Bibliografia

Almeida, J.A., Diniz, Y.S., Marques, S.F.G., Faine, L.A., Ribas, B.O., Burneiko, R.C., Novelli, E.L.B. (2002). The use of the oxidative stress responses as biomarkers in Nili tilapia (*Oreochromis niloticus*) exposed to in vivo cadmium contamination. *Environ. Int.* 27, pp. 673-679.

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

Araújo, C. (2009). Rádio ONU em Nova York. Disponível em « <http://www.unmultimedia.org/radio/portuguese/detail/161273.html> ». [Consultado em 07.10.2009].

Arias, A.R.L., Buss, D.F., Albuquerque, C., Inácio, A.F., Freire, M.M., Egler, M., Mugnai, R., Baptista, D.F. (2007). Use of bioindicators for assessing and monitoring pesticides contamination in streams and rivers. *Ciênc. Saúde coletiva*, 12(1).

Ballesteros, M.L., Wunderlin, D.A., Bistoni, M.A. (2009). Oxidative stress responses in different organs of *Jenynsia multidentata* exposed to endosulfan. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 72(1), pp. 199-205.

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.

Bradford, M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, pp. 248-254.

Cabral, J., Mieiro, C. & Marques, J. (1998). Environmental and biological factors influence the relationship between a predator fish, *Gambusia holbrooki*, and its main

Avaliação ecotoxicológica e histopatológica dos efeitos do cloreto de benzalcônio no peixe mosquito (*Gambusia holbrooki*) após exposição aguda

prey in rice fields of the Lower Mondego River Valley (Portugal). *Hydrobiologia*, 382, pp. 41-51.

Cengiz, E.I., Unlu, E. (2003). Histopathology of Gills in Mosquitofish, *Gambusia affinis* after Long-ter, exposure to Sublethal concentrations of Malathion. *Journal of environmental science and health, Part B*, 38(5), pp. 581-589.

Cengiz, E.I., 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. *Environ. Toxicol. and Pharmacol.*, 21, pp. 246-253.

Ciereszko, A., Babiak, I. & Dabrowski, K. (2004). Efficacy of animal anti-fertility compounds against sea lamprey (*Petromyzon marinus*) spermatozoa. *Theriogenol.*, 61, pp. 1039-1050.

Clemente, Z., Busato, R.H., Oliveira, C.A., Cestari, M.M., Ramsdorf, W.A., Magalhães, V.F., Wosiack, A.C., Silva de Assis, H.C. (2010). Analyses of paralytic shellfish toxins and biomarkers in a southern Brazilian reservoir. *Toxicol*, 55(2-3), pp. 396-406.

Cook, J.L., Baumann, P., Jackman, J.A., Stevenson, Doug. (2004). Pesticide characteristics that affect water quality. Texas A&M University, College Station.

Costa, P.M., Diniz, M.S., Caeiro, S., Lobo, J., Martins, M., Ferreira, A.M., Caetano, M., Vale, C., DelValls, T.Á., Costa, M.H. (2009). Histological biomarkers in liver and gills of juvenile *Solea senegalensis* exposed to contaminated estuarine sediments: A weighted indices approach. *Aquatic Toxicology*, 92(3), pp. 202-212.

Avaliação ecotoxicológica e histopatológica dos efeitos do cloreto de benzalcônio no peixe mosquito (*Gambusia holbrooki*) após exposição aguda

Cserhádi, T., Forgács, E. & Oros, G. (2002). Biological activity and environmental impact of anionic surfactants. *Environment International*, 28, pp. 337-348.

Datta, B., Chakrabarty, D., Dhar, A. (2009). Simultaneous identification of unknown groundwater pollution sources and estimation of aquifer parameters. *Journal of Hydrology*, 376(1-2), pp. 48-57.

Dietert, R.R. (2008). Development Immunotoxicity (DIT) in Drug Safety Testing : Matching DIT Testing to adverse Outcomes and Childhood Disease Risk. *Current Drug Safety*, 3(3), pp. 216-226.

Dietert, R.R., Dietert, J.M. (2008). Potential for early-life immune insult including developmental immunotoxicity in autism and autism spectrum disorders: focus on critical windows of immune vulnerability. *J. Toxicol. Environ. Health B Crit Rev.*, 11(8): pp. 660-80.

Effendy, I. & Maibach, H. I. (1996). Detergent and skin irritation. *Clinics in Dermatology*, 14, pp. 15-21.

Eleftheriadis, H., Cheong, M., Sandeman, S., Syamm, P.P., Brittain, P., Klintworth, G.K., Lloyd, A. and Liu, C. (2002). Corneal Toxicity Secondary to Inadvertent Use of Benzalkonium Chloride Preserved Viscoelastic Material in Cataract Surgery. *British Journal of Ophthalmology*, 86(3), pp. 299-305.

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

EPA home page. Disponível em “<http://www.epa.gov>” . [Consultado em 15.11.2010].

Avaliação ecotoxicológica e histopatológica dos efeitos do cloreto de benzalcónio no peixe mosquito (*Gambusia holbrooki*) após exposição aguda

George, P. (1984). *O meio ambiente*. Edições 70. Lisboa, Biblioteca Básica de Ciência.

Guilhermino, L., Barros, P., Silva, M.C. and Soares, A.M.V.M. (1996). Should the use of inhibition of cholinesterases as a specific biomarker for organophosphate and carbamate pesticides be questioned? *Biomarkers*, 3, pp. 157–163.

Gomes de Castro, A., Duarte, A., Santos, T.R. (2003). *O Ambiente e a Saúde*. Instituto Piaget. Lisboa, Medicina e saúde.

Guilhermino, L., Lacerda, M.N., Nogueira, A.J.A. and Soares, A.M.V.M. (2000). In vitro and in vivo inhibition of *Daphnia magna* acetylcholinesterase by surfactant agents: possible implications for contamination biomonitoring. *The Science of the Total Environment*, 247, pp. 137-141.

His, E., Beiras, R., Quiniou, F., Parr, A. C. S., Smith, M. J., Cowling, M. J., Hodgkiess, T. (1996). The non-toxic effects of a novel antifouling material on oyster culture. *Water Resource*, 30(11), pp. 2822-2825.

Intorre, L., Meucci, V., Di Bello, D., Monni, G., Soldani, G. and Pretti, C. (2007). Tolerance of Benzalkonium Chloride, Formalin, Malachite Green, and Potassium Permanganate in Goldfish and Zebrafish. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 4, pp. 590 – 595.

Jaganathan, L. & Boopathy, R. (2000). Distinct Effect of Benzalkonium Chloride on the Esterase and Aryl Acylamidase Activities of Butyrylcholinesterase. *Bioorganic Chemistry*, 28, pp. 242-251.

Knud-Hansen, C. (1994). Historical perspective of the phosphate detergent conflict. *Conflict Research Consortium*, Working Paper 94-54.

Krishnan, K., Paterson, J., Williams, D.T. (1997). Health risk assessment of drinking

Avaliação ecotoxicológica e histopatológica dos efeitos do cloreto de benzalcônio no peixe mosquito (*Gambusia holbrooki*) após exposição aguda

water contaminants assessment methods in Canada: the applicability of mixture risk.

Regul Toxicol Pharmacol, 26(2), pp. 179-187.

Kummerer, K., Eitel, A., Braun, U., Hubner, P., Daschner, F., Mascart, G., Milandri, M., Reinthaler, F., Verhoef, J. (1997). Analysis of benzalkonium chloride in the effluent from European hospitals by solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography with post-column ion-pairing and fluorescence detection. *Journal of Chromatography A*, 774, pp. 281-286.

Kvitko, K., Rohr, P., Zucchetti, G., Mariano, L., Silla, L. (2008). Aspectos Ambientais e Genéticos no Desenvolvimento de Leucemias. *Revista Brasileira de Biociências*, 6(4).

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.

Li, M.,H. (2008). Effects of nonionic and ionic surfactants on survival, oxidative stress, and cholinesterase activity of planarian. *Chemosphere*, 70, pp. 1796-1803.

Liao, C.Y., Fu, J.J., Shi, J.B., Zhou, Q.F., Yuan, C.C., Jiang, G.B. (2006). Methylmercury accumulation, histopathology effects and cholinesterase activity alterations in medaka (*Oryzias latipes*) following sublethal exposure to methylmercury chloride. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 22, pp. 225-233.

Ma, J., Ding, Z., Wei, G., Zhao, H., Huang, T. (2009). Sources of water pollution and evolution of water quality in the Wuwei basin of Shiyang river, Northwest China. *J. Environ. Manage.*, 90(2), pp. 1168-77.

Avaliação ecotoxicológica e histopatológica dos efeitos do cloreto de benzalcônio no peixe mosquito (*Gambusia holbrooki*) após exposição aguda

McCarthy, J.F., Shugart, L.R. (1990). *Biomarkers of environmental contamination*. Chelsea, MI (US); Lewis Publishers.

Nalecz-Jawecki, G., Grabinska-Sota, E., Narkiewicz, P. (2003). The toxicity of cationic surfactants in four bioassays. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 54, pp. 87-91.

Noyes, P.D., McElwee, M.K., Miller, H.D., Clark B.W., Van Tiem, L.A., Walcott, K.C., Erwin, K.N., Levin, E.D. (2009). The toxicology of climate change: environmental contaminants in a warming world. *Environ Int.*, 35(6), pp. 971-86.

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. R., Carvalho, F. & Guilhermino, L. (2008). Behaviour and biomarkers of oxidative stress in *Gambusia holbrooki* after acute exposure to widely used pharmaceuticals and a detergent. *Ecotoxicol. and Environ. Saf.*, 71, pp. 341-354.

OCDE (1992) Test No. 203: Fish, Acute Toxicity Test. *OECD Guidelines for the Testing of Chemicals*.

Avaliação ecotoxicológica e histopatológica dos efeitos do cloreto de benzalcônio no peixe mosquito
(*Gambusia holbrooki*) após exposição aguda

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* fingerlings to the herbicide, glyphosate. *African Journal of Biotechnology*, 5.

Pandey, S., Parvez, S., Sayeed, I., Haque, R., Bin-Hafeez, B., Raisuddin, S. (2003). Biomarkers of oxidative stress: a comparative study of river Yamuna fish *Wallago attu* (Bl. & Schn.). *Sci. Total Environ.*, 309, pp. 105-115.

Pichardo, S., Moreno, I.M., Molina, R., Jos, A.M., Moyano, R., Ferrer-Dufolt, A., Cameán, A.M. (2006). Pathological and membrane biomarkers alteration induced by microcystins in liver, kidney and gills in tilapia fish (*Oreochromis* spp.). *Toxicology Letters*, 164(1), p. 233.

Prodanchuk, N.G., Mudryl, I.V., Kravchuk, A.P., Velikii, V.I., Medvedev, V.I., Zedopitanskaia, N.N., Sergeev, S.G., Chaika, L.G., Lyshavskii, V.G., Kolontaeva, N.V. (2004). Combined effect of detergents and priority pollutants on the body and quality of environment. *Gig Sanit*; 2, pp. 24-8.

Quintaneiro, C., Querido, D., Monteiro, M., Guilhermino L., Morgado, F., Soares, A.M. (2008). Transport and acclimation conditions for the use of an estuarine fish (*Pomatoschistus microps*) in ecotoxicity bioassays: effects on enzymatic biomarkers. *Chemosphere*, 71(10), pp. 1903-1808.

Richman, M. (1997). Water Pollution. *Wastewater*, 5(2), pp. 24-29.

Rickwood, C.J. and Galloway, T.S. (2004). Acetylcholinesterase inhibition as a biomarker of adverse effect: A study of *Mytilus edulis* exposed to the priority pollutant chlorfenvinphos. *Aquatic Toxicology*, 67(1): pp. 45-56.

Avaliação ecotoxicológica e histopatológica dos efeitos do cloreto de benzalcônio no peixe mosquito (*Gambusia holbrooki*) após exposição aguda

Riechelmann, H., Deutschle, T., Stuhmiller, A., Gronau, S. and Harald, B. (2004). Nasal Toxicity of Benzalkonium Chloride. *American Journal of Rhinology*, 18(5), pp. 291-299.

Rivett, M.O., Buss, S.R., Morgan, P., Smith, J.W.N., Bemment, C.D. (2008). Nitrate attenuation in groundwater: A review of biogeochemical controlling processes. *Water Research*, 42(16), pp. 4215-4232.

Scott, M. J. & Jones, M. N. (2000). The biodegradation of surfactants in the environment. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes*, 1508, pp. 235-251.

Sirisattha, S., Momose, Y., Kitagawa, E. & Iwahashi, H. (2004). Toxicity of anionic detergents determined by *Saccharomyces cerevisiae* microarray analysis. *Water Research*, 38, pp. 61-70.

Stentiford, G.D., Longshaw, M., Lyons, B.P., Jones, G., Green, M., Feist, S.W. (2003). Histopathological biomarkers in estuarine fish species for the assessment of biological effects of contaminants. *Mar Environ Res.*, 55(2), pp. 137-59.

Sturm, A., Wogram, J., Segner, H., Liess, M. (2000). Different sensitivity to organophosphates of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase from three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus*): application in biomonitoring. *Environmental toxicology and chemistry*, 19, pp. 1607-1615.

Timbrell, J. (1996). *Principles of Biochemical Toxicology*. Fourth Edition. Informa Healthcare.

Thompson, B., Adelsbach, T., Brown, C., Hunt, J., Kuwabara, J., Neale, J., Ohlendorf, H., Schwarzbach, S., Sples, R., Taberski, K. (2007). Biological effects of anthropogenic

Avaliação ecotoxicológica e histopatológica dos efeitos do cloreto de benzalcônio no peixe mosquito (*Gambusia holbrooki*) após exposição aguda

contaminants in the San Francisco Estuary. *Environment Research*; 105(1), pp. 156-174.

Triebig, G. (2010). Implications of latency period between benzene exposure and development of leukemia - A synopsis of literature. *Chemico-Biological Interactions*, 184(1-2), pp. 26-29.

Triebkorn, R., Telcean, I., Casper, H., Farkas, A., Sandu, C., Stan, G., Colărescu, O., Dori, T., Köhler, H. R. (2008). Monitoring pollution in River Mureş, Romania, part II: metal accumulation and histopathology in fish. *Environ Monit Assess*, 141 (1-3), pp. 177-88.

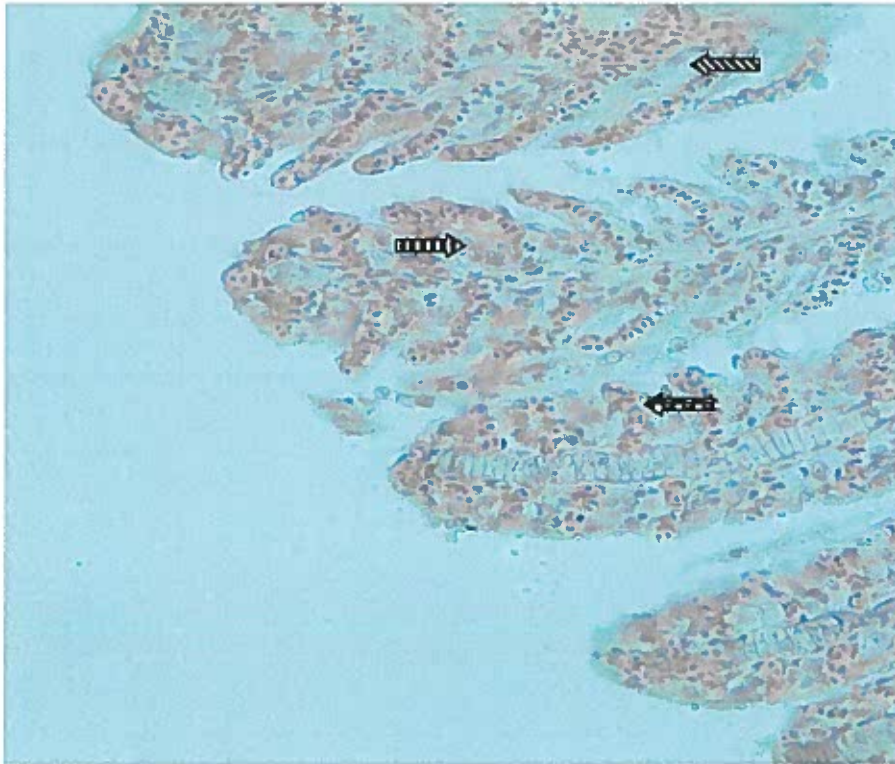
Velmurugan, B., Selvanayagam, M., Cengiz, E.I., Unlu, E. (2007). Histopathology of lambda-cyhalothrin on tissues (gill, kidney, liver and intestine) of *Cirrhinus mrigala*. *Environ. Toxicol. and Pharmacol.*, 24, pp. 286-291.

Waller, C.L., Oprea, T.I., Chae, K., Park, H.K., Korach, K.S., Laws, S.C., Wiese, T.E., Kelce, W.R., Gray, L.E. (1996). Ligand-based identification of environmental estrogens. *Chem. Res. Toxicol.*, 9, pp. 1240-1248.

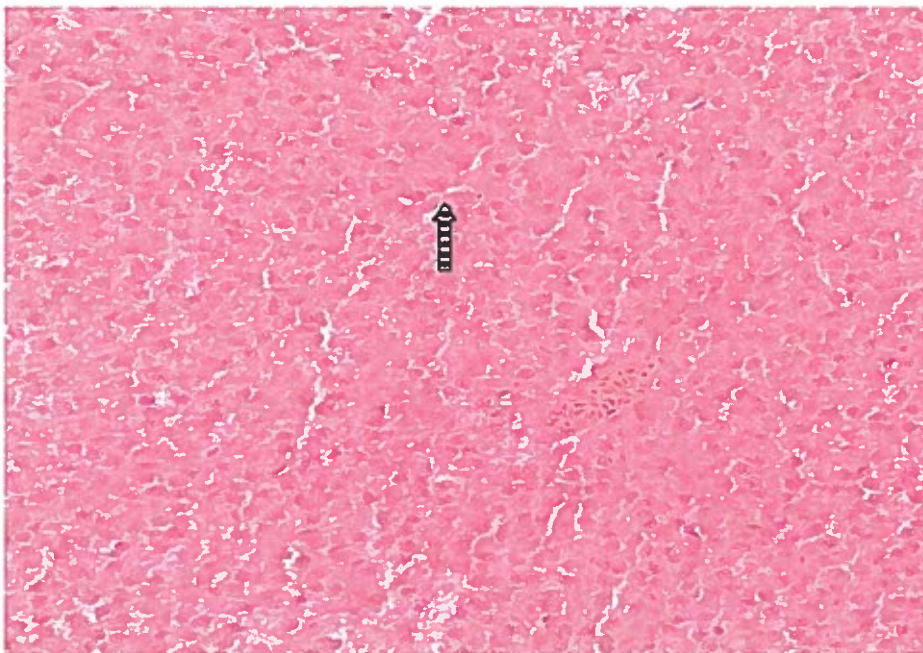
Ying, G. G. (2006). Fate, behavior and effects of surfactants and their degradation products in the environment. *Environment International*, 32, pp. 417-431.

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

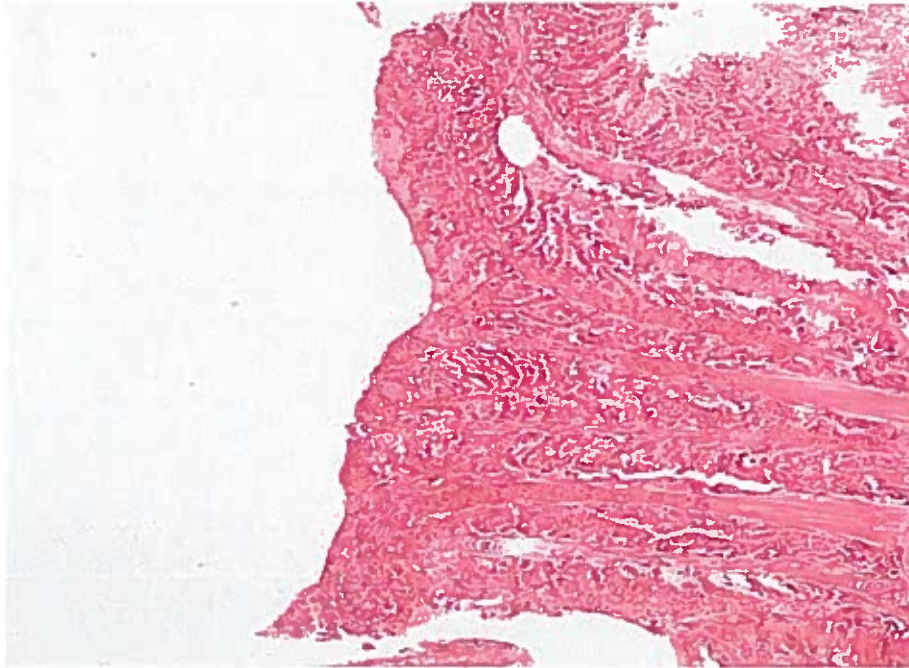
Anexos



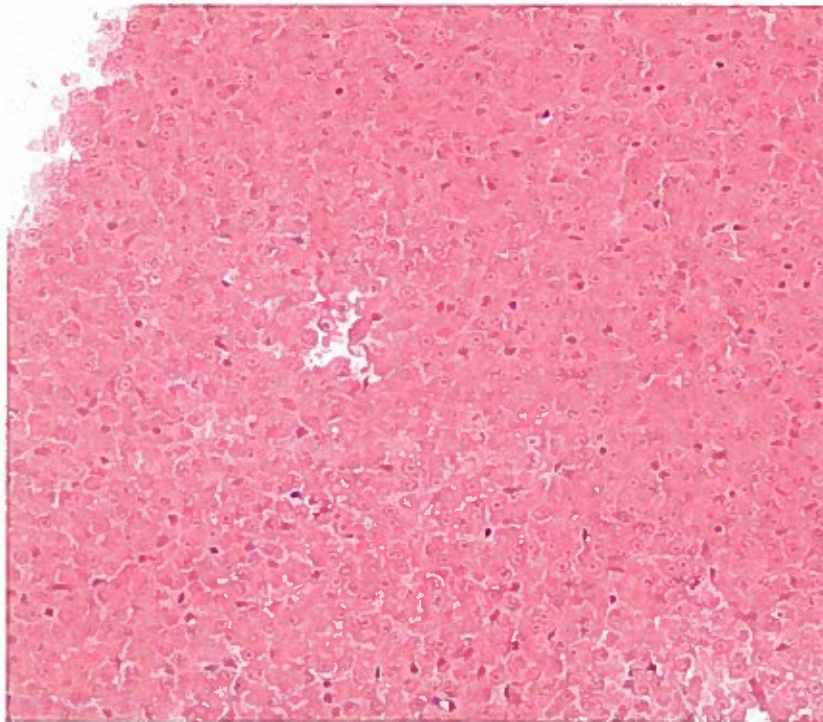
Anexo 1 – Secção de filamentos brânquiais de *Gambusia holbrooki* do grupo controlo (40x). ▨ Levantamento da camada epitelial ▤ Fusão das lamelas secundária
 ▧ Edema intraepitelial.



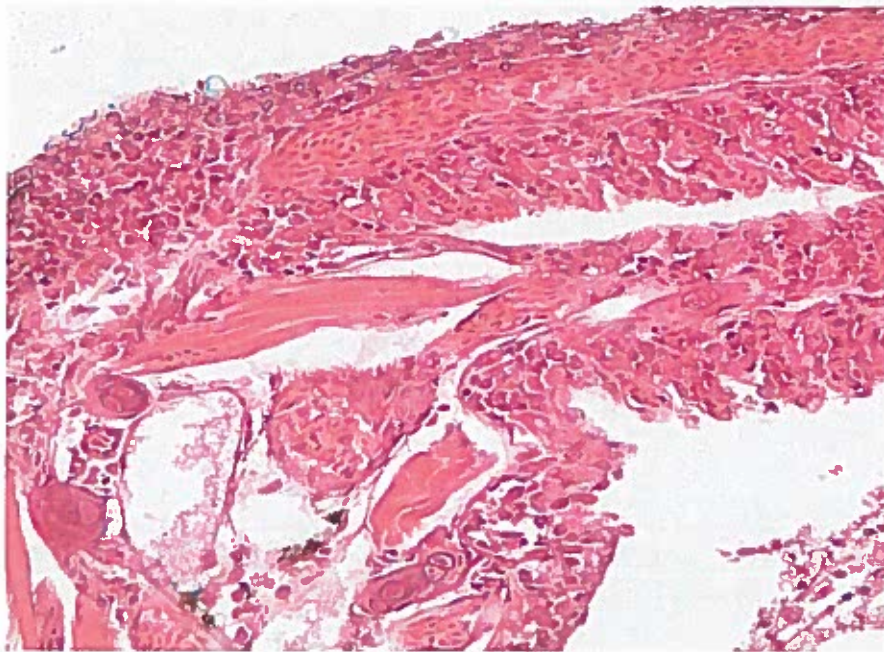
Anexo 2 – Arquitectura de uma secção de fígado de *Gambusia holbrooki* do grupo controlo (40x). ≡ Hepatócito



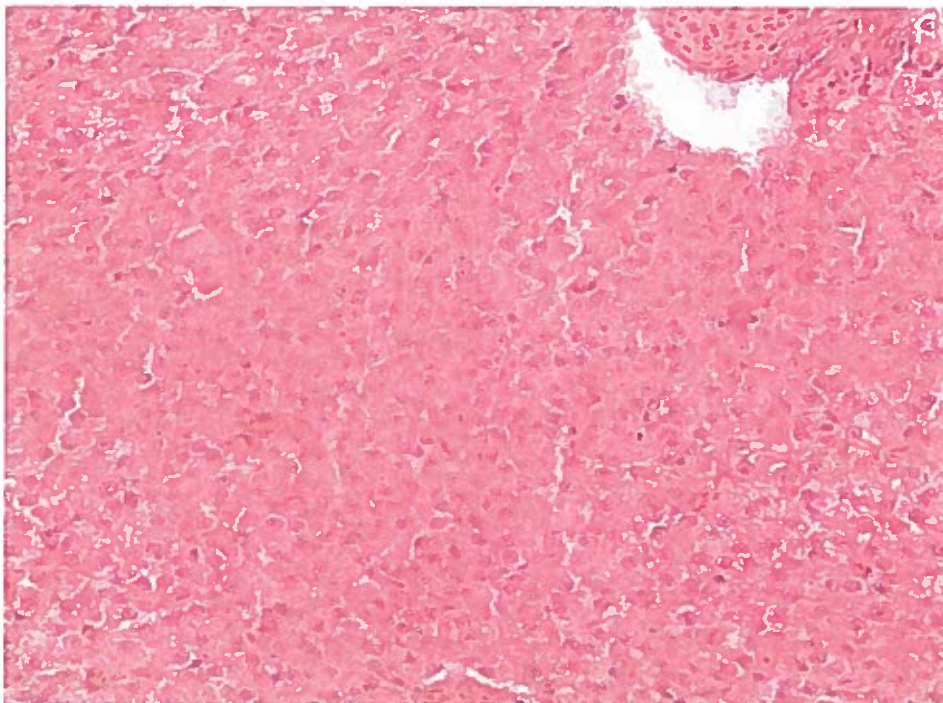
Anexo 3 – Secção de filamentos brânquiais de *Gambusia holbrooki* do grupo exposto a uma concentração de cloreto de benzalcónio de 0.023 mg/L (10x)



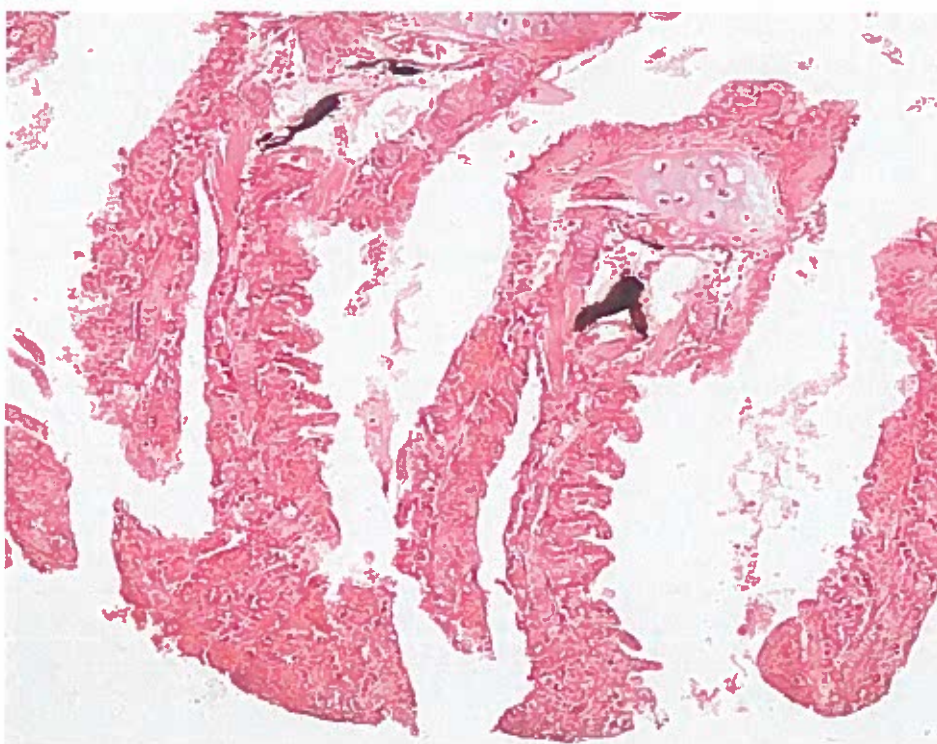
Anexo 4 – Arquitectura de uma secção de fígado de *Gambusia holbrooki* do grupo exposto a uma concentração de cloreto de benzalcónio de 0.023 mg/L (40x)



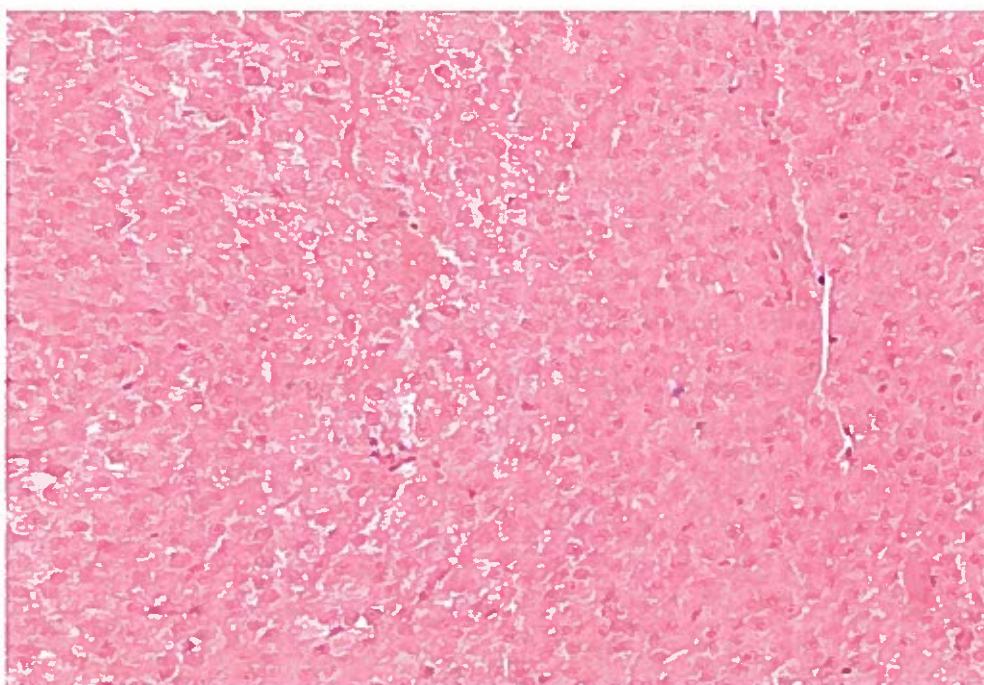
Anexo 5 – Secção de filamentos brânquiais de *Gambusia holbrooki* do grupo exposto a uma concentração de cloreto de benzalcónio de 0.047 mg/L (40x)



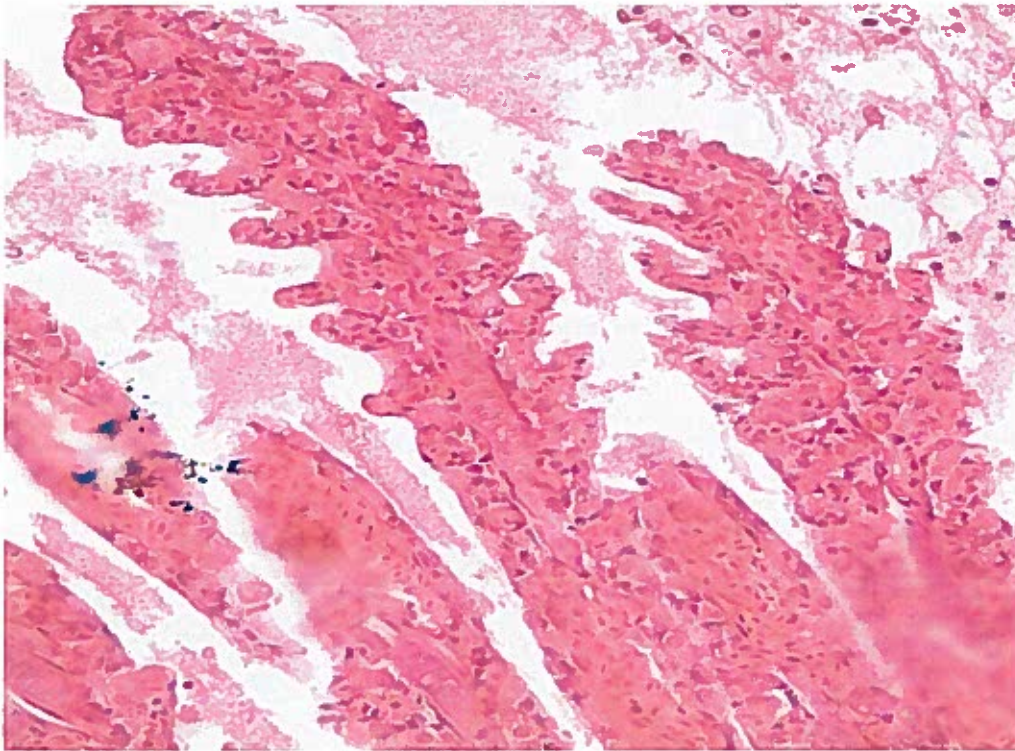
Anexo 6 – Arquitectura de uma secção de fígado de *Gambusia holbrooki* do grupo exposto a uma concentração de cloreto de benzalcónio de 0.047 mg/L (40x)



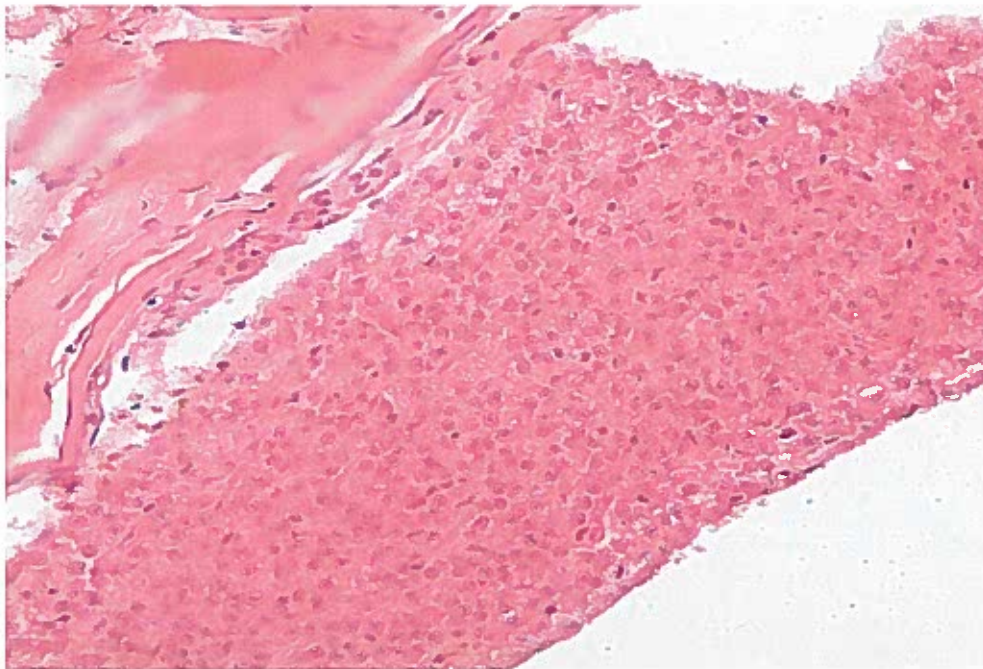
Anexo 7 – Secção de filamentos brânquiais de *Gambusia holbrooki* do grupo exposto a uma concentração de cloreto de benzalcónio de 0.094 mg/L (10x)



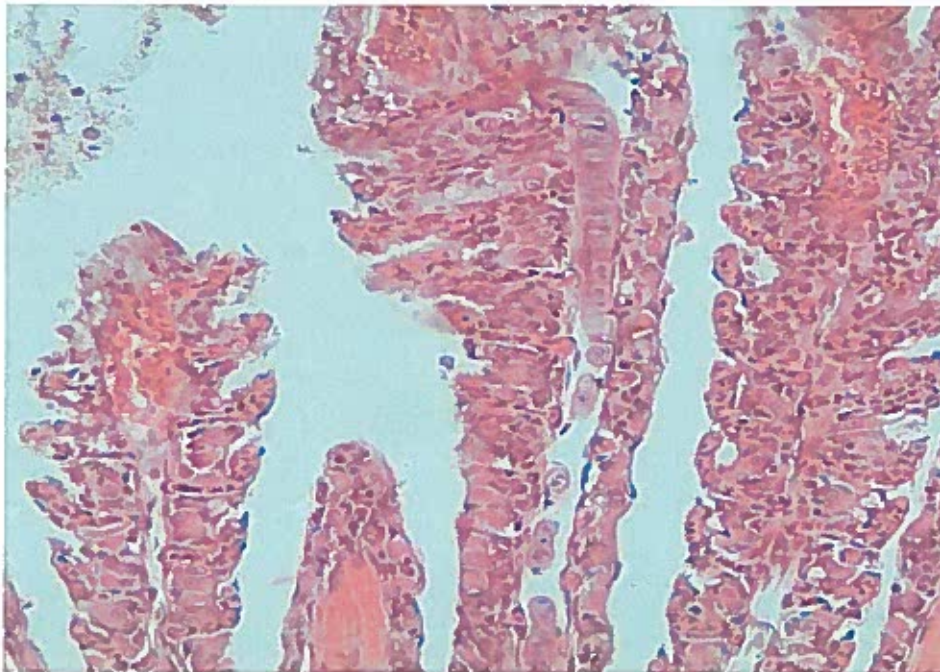
Anexo 8 – Arquitectura de uma secção de fígado de *Gambusia holbrooki* do grupo exposto a uma concentração de cloreto de benzalcónio de 0.094 mg/L (40x)



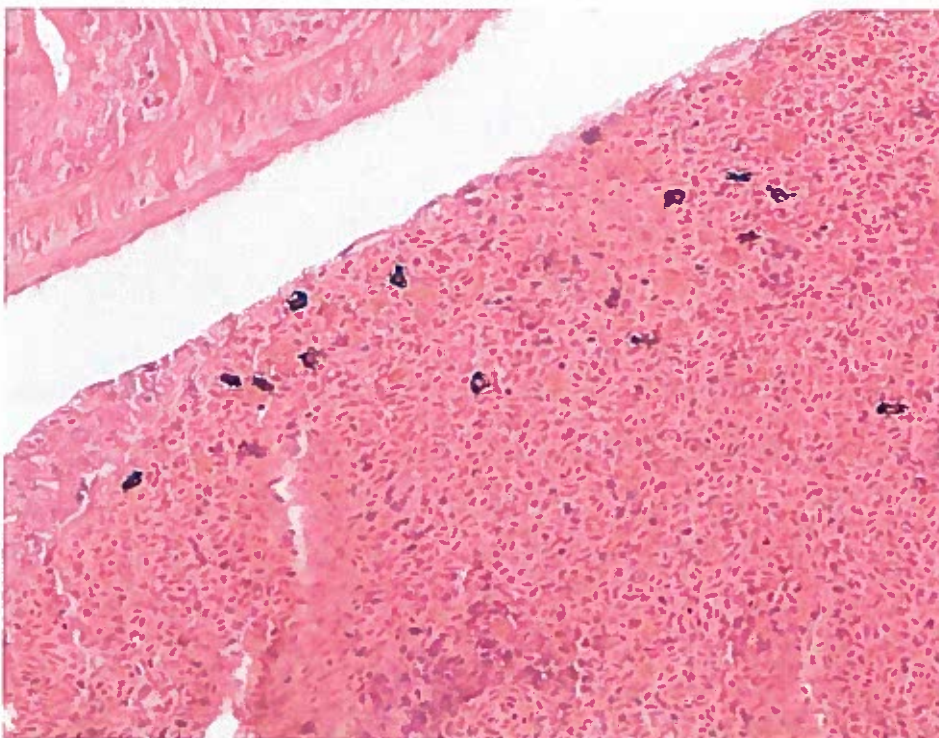
Anexo 9 – Secção de filamentos brânquiais de *Gambusia holbrooki* do grupo exposto a uma concentração de cloreto de benzalcónio de 0.19 mg/L (40x)



Anexo 10 – Arquitectura de uma secção de fígado de *Gambusia holbrooki* do grupo exposto a uma concentração de cloreto de benzalcónio de 0.19 mg/L (40x)



Anexo 11 – Secção de filamentos brânquiais de *Gambusia holbrooki* do grupo exposto a uma concentração de cloreto de benzalcónio de 0.375 mg/L (40x)



Anexo 12 – Arquitectura de uma secção de fígado de *Gambusia holbrooki* do grupo exposto a uma concentração de cloreto de benzalcónio de 0.375 mg/L (40x)

