

Tiago Luís Aparício Balula

Avaliação dos efeitos histológicos ao nível das brânquias e fígado no peixe mosquito (*Gambusia holbrooki*) após uma exposição a cloreto de benzalcónio.

Universidade Fernando Pessoa

Faculdade de Ciências da Saúde

Porto 2011

Do presente trabalho resultou uma comunicação em forma de painel que foi aceite pela comissão científica da SETAC: Balula T, Vidal H, Nunes B, Correia AT (2011) Histology of liver and gills in mosquitofish, *Gambusia holbrooki*, after long-term exposure to sublethal concentrations of benzalkonium chloride. 21st SETAC Europe. Milão, Itália. 15-19 Maio 2011.

Tiago Luís Aparício Balula

Avaliação dos efeitos histológicos ao nível das brânquias e fígado no peixe mosquito (*Gambusia holbrooki*) após uma exposição a cloreto de benzalcónio.



Universidade Fernando Pessoa

Faculdade de Ciências da Saúde

Porto 2011

Avaliação dos efeitos histológicos ao nível das brânquias e fígado no peixe mosquito (*Gambusia holbrooki*) após uma exposição a cloreto de benzalcónio.

Discente:

Tiago Luís Aparício Balula

Orientador:

Prof. Doutor Alberto Correia

Co-orientador:

Prof. Doutor Bruno Nunes

Projecto de Pós-Graduação/Dissertação apresentado à Universidade Fernando Pessoa como parte dos requisitos para obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas (Mestrado Integrado).

“Saberemos aquilo que somos quando virmos aquilo que fizemos”

Pierre Drieu La Rochelle

Dedicatória

Dedico este trabalho aos meus pais e irmão, não pelo conteúdo do documento em si, mas pela importância associada ao Projecto de Pós-Graduação/Dissertação.

Agradecimentos:

Ao meu orientador, Prof. Doutor Alberto Correia, por todo o apoio, supervisão, disponibilidade, simpatia e boa disposição que sempre demonstrou para comigo. O meu sincero obrigado pelas horas de trabalho cedidas a este trabalho. Ao meu co-orientador, Prof. Doutor Bruno Nunes, pela ajuda, disponibilidade e orientações prestadas ao longo de todas as fases deste projecto.

Ao Laboratório de Ecofisiologia do Centro Interdisciplinar de Investigação Marítima e Ambiental (CIIMAR), por me ter disponibilizado todas as condições materiais indispensáveis à execução experimental do trabalho. Um agradecimento particular ao Hugo Vidal pela preciosa ajuda prestada na execução dos cortes histológicos.

A todos aqueles que, directa ou indirectamente, contribuíram para que a realização deste Projecto de Pós-Graduação/Dissertação fosse possível.

À Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade Fernando Pessoa por todo o apoio que ao longo destes 6 anos me foi prestado e por nela poder tido a possibilidade de me formar profissionalmente. Obrigado pela oportunidade.

Ao meu irmão “Né”, eterno companheiro, obrigado por estares sempre a meu lado e me ajudares a ultrapassar todos os obstáculos que se vão colocando ao longo da vida.

À Sandra, com Amor, obrigado por estares sempre a meu lado, pela pessoa que és e por tudo o que fazes que eu seja.

Finalmente ao meu pai Elias Balula e à minha mãe Dulcelina Aparício, porque sem eles não seria quem sou hoje e sem eles não teria tirado um curso. Pelo enorme exemplo que sempre me deram como excelentes seres humanos e educadores, pelo que serei eternamente grato.

Resumo

A contaminação antropogénica dos ecossistemas aquáticos por uma classe emergente de poluentes, os resíduos de fármacos de utilização generalizada, tem sido um assunto de forte debate na comunidade científica internacional. Os fármacos reúnem características que os tornam um foco de crescente preocupação do ponto de vista ambiental e de saúde pública, visto possuírem actividade farmacológica, serem resistentes aos processos de metabolização, poderem sofrer fenómenos de biomagnificação e bioacumulação, e serem ambientalmente ubíquos e libertados em elevadas quantidades para o ambiente, por vezes sem qualquer tratamento prévio. Entre os compostos antropogénicos encontrados no meio ambiente, os detergentes iónicos são muito frequentes. A presença destes agentes pode causar alterações em organismos expostos, passíveis de serem quantificadas por via de ferramentas analíticas apropriadas. Os efeitos decorrentes da exposição de fêmeas imaturas de *Gambusia holbrooki* (n.v. peixe mosquito) a um detergente de uso farmacêutico generalizado, o cloreto de benzalcónio, foram avaliados através do estudo de eventuais alterações histológicas, em dois órgãos-alvo em particular, as brânquias e o fígado. Vários exemplares de *G. holbrooki* foram expostos a diferentes concentrações subletais de cloreto de benzalcónio (0,025 mg/l; 0,1 mg/l; 0,4 mg/l) durante vários períodos de tempo (4, 14 e 28 dias). Ao nível das brânquias foram detectadas alterações histopatológicas, tais como, levantamento epitelial, fusão das lamelas secundárias, hiperplasia, aneurismas e descamação das lamelas secundárias. Ao nível hepático foram detectados sinais ligeiros de vacuolização. Contudo a análise semi-quantitativa e quantitativa dessas alterações não detectou quaisquer diferenças significativas entre os grupos controlo e os grupos de teste nas diferentes concentrações e nos diferentes tempos de exposição, sugerindo uma acção relativamente inócua do cloreto de benzalcónio nos animais expostos.

Abstract

Benzalkonium chloride is a detergent with effective germicide and preservative properties, commonly used in several pharmaceutical and personal care products. The histopathological effects of benzalkonium chloride on the liver and gills of mosquitofish, *Gambusia holbrooki*, were studied by light microscope in tissues stained with hematoxylin and eosin. The fish were exposed to sublethal concentrations (0,025 mg/l, 0.1 mg/l and 0.4 mg/l) of benzalkonium chloride for 4, 14 and 28 days. Qualitative histological examination of both organs showed a variety of minor cellular alterations (e.g. lifting up of epithelium, intraepithelial oedema, fusion of adjacent secondary lamellae and hepatocytes vacuolization), also present in the control group. Almost changes are of minimal pathological importance, suggesting that the lesions were easily reversible as exposure to benzalkonium chloride ceased. In addition, gill morphometrical indices were used to test any physiological disturbance of the respiratory surface with exposure to benzalkonium chloride. However, statistical analysis did not find any relationship between the concentration and/or duration of exposure, suggesting that benzalkonium chloride has little effect on mosquitofish.

Índice

Resumo	VIII
Abstract	IX
Introdução	1
Material e Métodos	7
Resultados	10
Discussão	16
Bibliografia	22

Introdução:

A contaminação antropogénica dos ecossistemas aquáticos tem sido provocada por muitos resíduos de fármacos, devido à sua utilização quotidiana generalizada e elevado consumo, o que tem gerado um interesse crescente na comunidade científica internacional. Algumas actividades antropogénicas têm colocado em risco a saúde dos ecossistemas aquáticos, devido à libertação indiscriminada de poluentes, que afectam directamente os animais aquáticos (Breseghelo et al., 2004; Ying, 2006).

Os fármacos, em particular, reúnem características que os tornam um foco de crescente preocupação do ponto de vista ambiental e de saúde pública: possuem actividade farmacológica, são particularmente resistentes aos processos de metabolização, podem sofrer fenómenos de biomagnificação e bioacumulação, são ambientalmente ubíquos e são libertados em elevadas quantidades para o ambiente normalmente sem qualquer tratamento prévio (Nunes et al., 2004; Kostich et al., 2008; Wharfe et al., 2010). No entanto, e apesar de serem detectados frequentemente resíduos de produtos farmacêuticos nas águas de superfície, devido à escassez de dados ecotoxicológicos, ainda não é possível, na maioria dos casos, fazer uma avaliação real do impacto provocado por resíduos de produtos farmacêuticos nos organismos aquáticos (Hoeger et al., 2005).

Nos últimos anos o crescimento populacional e o desenvolvimento industrial acelerado têm causado situações preocupantes de contaminação costeira em todo o mundo. Demonstrou-se que a acumulação de produtos químicos xenobióticos em sedimentos, água do mar ou em organismos-alvo, está directamente ligado a efeitos adversos para a saúde, quer em seres humanos, quer em peixes (Bhagwant e Elahee, 2007). Embora os níveis de contaminantes em sistemas bióticos e abióticos possam ser facilmente aferidos utilizando técnicas analíticas vulgares, actualmente as ferramentas disponíveis para profissionais que trabalham na avaliação da saúde dos peixes são pouco precisas (Bhagwant e Elahee, 2007).

A poluição dos sistemas aquáticos resulta principalmente das descargas de efluentes industriais, agrícolas e domésticos, sendo que os peixes são expostos frequentemente a água altamente contaminada, especialmente em áreas onde a taxa de diluição de águas residuais é reduzida (Bernet et al., 1999). Outras fontes adicionais de

contaminação por medicamentos de utilização humana são as águas residuais provenientes dos hospitais e dos aterros sanitários (Fent, 2008).

Usualmente os efeitos adversos ocorrem sobretudo quando os contaminantes: a) não são, ou são apenas, parcialmente degradados; b) apresentam uma elevada acção biológica; c) possuem um elevado potencial de acumulação e d) e têm efeito sinérgico ou aditivo, caso existam vários contaminantes no meio (Bernet et al., 1999). Nos peixes a poluição da água pode levar a diversas alterações estruturais, individuais e populacionais (Bernet et al., 1999).

Dentro dos poluentes encontrados no ambiente, incluem-se a classe dos detergentes. A presença destes agentes tensioactivos pode causar alterações em organismos expostos, passíveis de serem quantificadas e por intermédio de ferramentas analíticas (biomarcadores de exposição e/ou de efeito) devidamente avaliadas (Amorim, 2003).

Geralmente os detergentes são constituídos por um grupo polar (que pode ter carga ou não) que sofre facilmente solvatação em água (hidrófilo), e uma cadeia hidrocarbonada não polar que não é facilmente dissolvida em água (hidrofoba). Ou seja, estes agentes combinam características hidrofóbicas e hidrofílicas numa só molécula (anfipatia) (Scott e Jones, 2000). Os grupos polares ou hidrofílicos podem ser carregados (aniónicos ou catiónicos) ou neutros (polioxietileno, resíduos de polihidroxiolo, etc). Entre os grupos polares carregados, encontram-se grupos como os fosfatos, aminas, sulfatos e carboxilos; entre os grupos polares não carregados encontram-se os grupos hidroxilo, carbonilo, éster ou o grupo carboxilo protonado. A parte apolar da molécula dos tensioactivos é composta por grupos hidrofóbicos, em geral hidrocarbonetos, sejam cadeias alifáticas ou grupos aromáticos ou policíclicos. Esta parte da molécula tem uma baixa solubilidade em água devido ao "efeito hidrofóbico", provocado, não tanto pela atracção entre grupos apolares mas, principalmente pela dificuldade em romper as fortes interacções entre as moléculas de água. Os grupos polares não iónicos são hidrófilos mais fracos do que os grupos carregados, pelo que a sua energia de interacção com soluções aquosas é também inferior. No caso dos tensioactivos não iónicos, os grupos polares não carregados são em geral maiores do que as caudas hidrofóbicas (Helenius e Simons, 1975).

A concentração de agentes tensioactivos nos rios e lagos é função da época do ano, da distância dos troços de águas às zonas residenciais, e depende ainda das

condições ambientais, como sejam a densidade do tráfico marítimo, intensidade de exploração de petróleo/gás no mar alto e das descargas diurnas de águas residuais não tratadas (Cserhádi et al., 2002). A contaminação das águas subterrâneas ocorre devido ao tratamento incompleto e ineficaz dos efluentes nas ETARs. A avaliação dos efeitos adversos dos tensoactivos permitiu verificar que estes compostos apresentam efeitos tóxicos sobretudo ao nível do ambiente marinho nomeadamente na flora da zona costeira (Cserhádi et al., 2002).

O cloreto de benzalcónio é um composto catiónico e está inserido no grupo de compostos de amónio quaternário; estas são moléculas com pelo menos uma longa cadeia alquílica ligada a um átomo de nitrogénio carregado positivamente. Contudo outros grupos substituintes alquílicos podem ocorrer sendo na maioria de cadeia curta, como substituintes metil ou benzílicos. (Nalecz-Jawecki et al., 2003). O comprimento da cadeia alquílica determina não só as características físico-químicas do tensoactivo, mas também pode ter um papel preponderante no destino e efeitos deste composto no ambiente (Ying, 2006). Sendo compostos de amónio quaternário, apresentam uma superfície com propriedades específicas o que permite a sua utilização como tensoactivos, mas também utilizados como agentes amaciadores têxteis, antiestáticos, germicidas, emulsionantes e desodorizantes. O cloreto de benzalcónio possui marcada natureza biocida, o que o torna um excelente conservante em produtos farmacêuticos (soluções oftálmicas, compostos nebulizadores, sprays nasais); é também útil como desinfectante de superfícies em centros de saúde e hospitais (Effendy e Maibach, 1996; Jaganathan e Boopathy, 2000; Kummerer, 2001).

A toxicidade dos tensoactivos é determinada primariamente pela capacidade que estes têm de adsorverem e penetrarem a camada bifosfolipídica da membrana celular de organismos aquáticos. No entanto, o mecanismo de toxicidade molecular dos tensoactivos não está bem esclarecido, embora saibamos que a interacção com lípidos membranares parece perturbar a integridade da membrana, causando efeitos tóxicos. A disrupção da integridade membranares é possivelmente causada pela interferência na permeabilidade das proteínas membranares. Um possível mecanismo de disrupção da integridade membranares, é por via do *stress* oxidativo que tem efeitos perniciosos podendo levar a uma diminuição da fluidez e a um aumento da permeabilidade a certos iões na membrana (Li, 2008).

Os peixes são organismos adequados para monitorizar a poluição ambiental no meio aquático, visto que, concentram alguns poluentes provenientes directamente da água e, também através da sua dieta, nos seus tecidos (Ayas et al., 2007). A espécie *Gambusia holbrooki*, vulgarmente designada por gambúsia ou peixe-mosquito, pertence à família Poeciliidae e é originária da América do Norte, tendo sido introduzida posteriormente em diversos países europeus, asiáticos, africanos e australianos com o propósito de ser um agente controlador de mosquitos (vectores de transmissão de doenças); actualmente está distribuído a nível global (Cabral et al., 1998; Oscoz et al., 2008). É um peixe de reduzidas dimensões (2-2,5 cm nos machos, até 5-6 cm nas fêmeas) que apresenta dimorfismo sexual evidente. Este peixe possui alta fecundidade e tem sido considerado como um consumidor secundário representativo dos ecossistemas aquáticos. Está naturalmente presente em ecossistemas de água doce (lagos, rios) assim como se encontra igualmente bem adaptado a ecossistemas estuarinos (água salobra). Prefere águas temperadas, de fluxo lento ou paradas, rodeadas de alguma vegetação aquática, e tende a evitar zonas de água profunda, com correntes e densa vegetação, que pode obstruir o acesso à alimentação e à superfície. Esta espécie de peixe é um omnívoro oportunista, e alimenta-se de uma gama diversa de insectos terrestres como formigas e moscas que caem na superfície da água, assim como invertebrados aquáticos incluindo percevejos, besouros, larvas de moscas, zooplâncton, algas filamentosas, fragmentos de frutos e outros tecidos vegetais (Cabral et al., 1998; McKay et al., 2001).

G. holbrooki é um organismo eurialino amplamente distribuído em sistemas de água doce e estuários de regiões temperadas, normalmente utilizado para estudo experimental dos efeitos dos poluentes químicos a diferentes níveis de organização biológica, desde um nível celular a populacional (Beaudouin, 2007). Além disso são animais facilmente mantidos e manipulados em laboratório (Cengiz e Unlu, 2003; Guillette et al., 2003). Todas estas características permitem considerar esta espécie como um modelo animal adequado em Ecotoxicologia (Nunes et al., 2004).

As análises químicas de diversas matrizes ambientais por si só não são suficientes para descrever os efeitos adversos da mistura complexa de substâncias químicas presentes nos locais contaminados (Ayas et al., 2007). Além disso falta-lhes a relevância ecológica. Assim, e no sentido de se apurar os efeitos biológicos decorrentes das substâncias no ambiente, desenvolveu-se e implementou-se o conceito de biomarcador. Os biomarcadores podem ser definidos como uma resposta biológica que

fornece uma medida de exposição ao poluente ou ao efeito tóxico (Handy et al., 2002). Uma vantagem dos biomarcadores é a possibilidade de serem aplicados no terreno, onde as variações espaciais e temporais à exposição de poluentes e/ou efeitos tóxicos podem ser medidas. Independente da finalidade e aplicação dos biomarcadores, estes podem ser classificados em diversos tipos (Timbrell, 1998): a) os biomarcadores de exposição podem ser usados para confirmar e avaliar a exposição individual, ou de um grupo, a uma substância em particular, estabelecendo uma ligação entre a exposição externa e a quantificação da exposição interna; b) os biomarcadores de efeito podem ser usados para explicar as alterações biológicas ou efeitos adversos decorrentes da exposição e absorção da substância química. Desta forma, a ligação dos biomarcadores de exposição e de efeito contribuem para a definição da relação dose-resposta; c) e os biomarcadores de susceptibilidade permitem elucidar o grau de resposta dos indivíduos provocada pela exposição .

De entre os biomarcadores mais utilizados em análise ecotoxicológica moderna, podem salientar-se as avaliações istológicas. A histologia representa uma ferramenta útil na avaliação da poluição aquática, nomeadamente para estudo dos efeitos sub-letais e crónicos resultantes da exposição a poluentes (Cengiz e Unlu, 2003). Foi aliás demonstrada em vários estudos a utilidade da detecção de lesões histológicas como indicadores sensíveis e fidedignos para avaliar a saúde de populações de peixes (Bhagwant e Elahee, 2007; Schlacher et al., 2007). No entanto, a ausência de dados numéricos quantificáveis torna difícil estabelecer relações de causa-efeito entre os padrões de doença e os níveis de contaminação e consequentemente avaliar o significado das diferenças entre os grupos pesquisados. Por esta razão, as pesquisas actuais sobre características histopatológicas de animais expostos, estão agora concentradas em índices histopatológicos de modo a fornecer dados numéricos com base numa abordagem semi-quantitativa e quantitativa (Costa et al., 2009). Algumas destas abordagens foram utilizadas com sucesso em alguns estudos que avaliaram a progressão de lesões em diversos órgãos de peixes, com a vantagem de proporcionar índices individuais (e.g. Schwaiger, 2001; Van Dyk et al., 2007; Costa et al., 2009; Tribskorn et al., 2008) e em estudos de biomonitorização (e.g. DelValls et al., 1998; Riba et al., 2004, 2005) por via da aplicação de análise estatística apropriada.

Os organismos aquáticos ao serem expostos a poluentes, sofrem danos estruturais significativos nos seus órgãos, podendo alterar a estrutura histológica e

comprometer a função do órgão. Esta exposição causa algumas alterações metabólicas, sendo iniciadas com mudanças ao nível das células e tecidos. Embora os dados qualitativos sejam usados na maioria dos casos para estudar patologias causadas por poluentes ambientais, são os dados quantitativos que demonstram melhor as reacções dos organismos aos poluentes (Ayas et al., 2007). A histopatologia é por isso uma resposta de elevada sensibilidade e reflecte alterações prévias, quer a nível fisiológico, quer nas funções bioquímicas (Nero et al., 2006).

Nos peixes a fragilidade dos tecidos epitelial e conjuntivo torna a pele, a parede dos capilares, a coluna vertebral, o globo ocular, e as vísceras, em particular as brânquias e o fígado, estruturas fortemente susceptíveis a fenómenos tóxicos consequentes a episódios de poluição (Halver et al., 1975). Estas alterações têm sido comprovadas por numerosos autores (e.g. Lim e Lovell, 1978; Chavez e Matinez, 1991; Martins, 1994).

As brânquias são importantes órgãos nos peixes pois realizam numerosas funções que incluem a respiração, osmorregulação, excreção de produtos nitrogenados residuais e regulação do equilíbrio ácido-base (Cengiz e Unlu, 2003; Campagna et al., 2007; Cinar et al., 2009). A sua multifuncionalidade, a vasta área de superfície que ocupam e a sua localização relativamente ao meio externo, fazem das brânquias um órgão chave para a acção directa dos poluentes existentes no meio aquático. Nesse sentido, as alterações histológicas da brânquia são reconhecidas como um método rápido e válido para determinar os danos causados pela exposição a diferentes poluentes nos peixes (Garcia-Santos et al., 2007; Cinar et al., 2009). O comprometimento funcional das brânquias causado por poluentes pode portanto prejudicar significativamente a saúde dos peixes, bem como a própria sobrevivência (Leonardo et al., 2001).

O fígado desempenha um papel importante em funções vitais dos peixes, nomeadamente no metabolismo, transformação, acumulação e excreção de contaminantes (Carrola et al., 2009). 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 como a glucose. Além disso, estão envolvidas no processo de hematocitopoiese, na produção de anticorpos e na secreção biliar (Melo et al., 2004). Por esta razão, o fígado responde rapidamente à presença de poluentes,

demonstrando prontamente alterações estruturais e funcionais (Figueiredo-Fernandes et al., 2006).

A histopatologia do fígado é considerada uma ferramenta de biomonitorização que prevê os efeitos causados por contaminantes ambientais em populações de peixes selvagens, funcionando como um dos indicadores mais fiáveis para avaliar os efeitos na saúde dos peixes causados por actividades antropogénicas (Carrola et al., 2009). Devido à crescente evidência da relação causa-efeito entre os poluentes ambientais e a ocorrência de lesões hepáticas em peixes, os estudos sobre a histopatologia hepática em peixes tem sido cada vez mais incorporada em programas de monitorização dos efeitos biológicos (e.g. Koehler, 2004; Lang et al., 2006).

O objectivo do presente trabalho foi avaliar eventuais efeitos histopatológicos, ao nível das brânquias e do fígado, causados pela exposição de indivíduos de *Gambusia holbrooki* a diferentes concentrações e tempos de exposição de cloreto de benzalcónio.

Material e Métodos:

Os peixes utilizados neste estudo foram capturados na Pateira de Fermentelos (40° 34' 30''N; 8° 30' 56'' W), na região centro de Portugal, com redes de mão (vulgar camaroeiro) em Outubro de 2009. Após a captura, os peixes foram devidamente acondicionados e transportados para o laboratório numa arca de plástico aerificada. Com base na morfologia externa, em particular na forma da barbatana anal e na forma do ventre (Pyke, 2005), os machos foram descartados e as fêmeas imaturas, foram seleccionadas e acondicionadas sob condições laboratoriais controladas: água salobra desclorada a 6 psu, temperatura 20°C, fotoperíodo controlado (16 h luz e 8 h de obscuridade) e arejamento contínuo. Os animais foram sujeitos a um período de quarentena durante duas semanas antes dos testes de toxicidade propriamente ditos. Os animais foram alimentados de 2 em 2 dias *ad libitum* com comida comercial para peixe (Sera Vipán®).

Os peixes foram divididos em quatro grupos (grupo controlo, concentração baixa, concentração média e concentração alta) e colocados em aquários de vidro separados com capacidade para 50 litros. Cada aquário era constituído por 40 exemplares de peixe-mosquito.

Os peixes do grupo controlo, foram expostos in vivo somente a água salina 6 psu e os outros três grupos de peixes foram expostos in vivo a concentrações subletais de cloreto de benzalcónio (concentração baixa: 0,025 mg/l; concentração média: 0,1 mg/l; concentração alta: 0,4 mg/l) durante um período de 28 dias. Durante este período procedeu-se à renovação de 80% da água de cada aquário a cada 2 dias e adicionou-se um volume conhecido de solução *stock* de forma a ajustar as respectivas concentrações de cloreto de benzalcónio. No final do ensaio a mortalidade dos peixes no grupo controlo foi inferior a 10% (OCDE, 1984, 1992, 2000).

As condições abióticas foram rigorosamente controladas durante o período de exposição: fotoperíodo controlado (16 h luz e 8h obscuridade), temperatura da água ($18,5 \pm 0,5^\circ\text{C}$), pH ($8,48 \pm 0,14$) e arejamento contínuo.

O sacrifício dos peixes decorreu ao longo do tempo de exposição. Ao 4º, 14º e 28º dias foram retirados 10 peixes de cada aquário perfazendo um total de 30 peixes de cada grupo no final da exposição.

O processamento histológico consistiu em mergulhar os peixes inteiros em solução de Bouin durante 24 horas para fixação química. Foram posteriormente descalcificados, desidratados através de uma série de soluções de álcool com graduações crescentes (70%, 80%, 90% e 100%), embebidos em parafina ($56-58^\circ\text{C}$) e seccionados (5-7 μm) num micrótomo manual rotativo no plano lateral. As secções foram coradas com hematoxilina-eosina e examinadas por microscopia óptica convencional. As brânquias foram examinadas a 100 e 200 X, enquanto, o fígado foi examinado a 100 e 400 X. Foram realizadas microfotografias com recurso a uma câmara digital.

As alterações histopatológicas foram avaliadas qualitativamente e semi-quantitativamente segundo o método proposto por Bernet et al. (1999). As alterações foram classificadas em seis categorias principais (distúrbios circulatórios, proliferativos, degenerativos, inflamatórios, estruturais e citoplasmáticos). No cálculo do índice patológico foi atribuído um grau de severidade às alterações (1 a 6) com base na área afectada. Além disso, foram atribuídos factores de importância (1 a 3) a cada alteração como medida avaliativa do grau de impacto sobre o peixe (Tabela 1). O cálculo dos índices branquial (Ig) e hepático (II) resultou do somatório dos factores atrás enunciados.

A análise quantitativa das brânquias foi efectuada num filamento branquial de cada indivíduo tendo em linha de conta as seguintes medições: comprimento lamelar secundário (SLL), espessura da lamela secundária (SLW), distância interlamelar (ID) e espessura da lamela primária (BET). Para o cálculo do valor médio individual foram realizadas três medições, respectivamente na região distal, central e proximal de um filamento branquial de cada indivíduo (Nero et al., 2006) (Fig. 1).

Após se ter verificado que os pressupostos relativos à utilização de testes estatísticos paramétricos estavam cumpridos, nomeadamente homogeneidade de variâncias e distribuição normal dos dados, correu-se uma análise de variância bifactorial. Os factores foram o tempo de exposição (com 3 níveis) e a concentração do detergente (com 4 níveis). Caso a hipótese nula fosse rejeitada, realizou-se de seguida um teste à posteriori (teste de Dunnett) Os testes estatísticos foram executados com o software SigmaPlot 11.2 Todos os procedimentos estatísticos foram executados de acordo com Zar (1996). Usou-se um nível de significância de 95% nos procedimentos estatísticos.



Figura 1 - Secção de filamentos brânquiais de *Gambusia holbrooki* onde se pode observar as medições quantitativas das brânquias (SLL: comprimento da lamela secundária; SLW: espessura da lamela secundária; ID: distância entre lamelas secundárias; BET: espessura da lamela primária) usadas na análise morfométrica das brânquias.

Resultados:

A exposição crónica de *Gambusia holbrooki* a diferentes concentrações de cloreto de benzalcónio e a diferentes tempos de exposição nas condições experimentais definidas não causou alterações qualitativas significativas comparativamente ao grupo controlo. Contudo, verificou-se de uma forma generalizada, incluindo em alguns exemplares do grupo controlo, a ocorrência de alterações histopatológicas tais como, levantamento epitelial, fusão das lamelas secundárias associada com a hiperplasia epitelial e presença de alguns aneurismas (Figs. 2 e 3). O tecido hepático apresentou uma arquitectura normal, com hepatócitos com núcleos de tamanho normal e sem sinais de necrose (Fig. 4A). No entanto, verificou-se em alguns casos sinais de vacuolização (Fig.4B).

Desta forma, verificou-se que a distribuição das diferentes lesões foi uniforme nos diferentes grupos (expostos e controlo). Neste sentido não houve correlação entre a dose e/ou tempo de exposição/efeito.

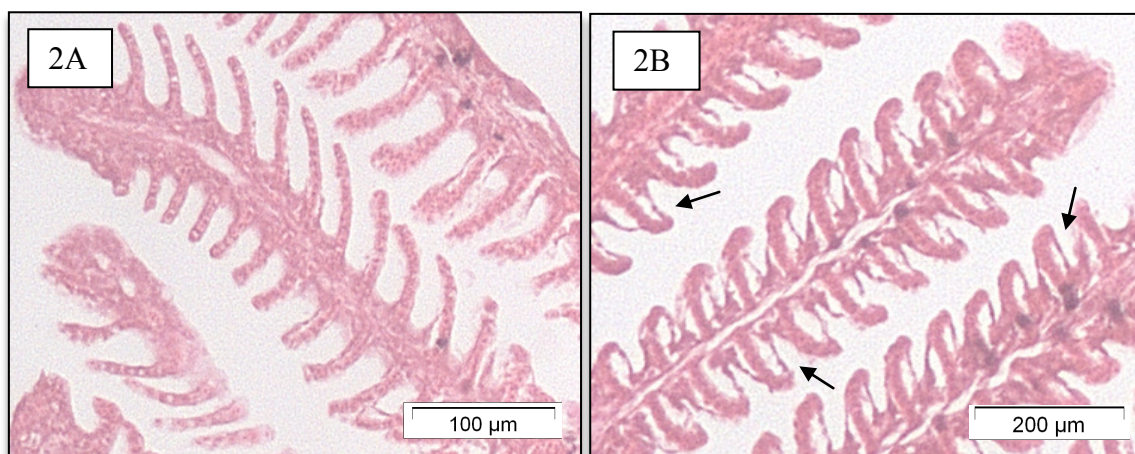


Figura 2 - Secção de filamentos brânquiais de *Gambusia holbrooki* do grupo controlo ao 4º dia (2A: filamentos branquiais com uma aparência normal; 2B: levantamento epitelial generalizado - setas).



Figura 3 - Secção de filamentos brânquiais de *Gambusia holbrooki* (3A: sinais de fusão das lamelas secundárias associada a hiperplasia epitelial – círculos - na concentração 0,025 mg/l de cloreto benzalcónio e ao 4º dia de exposição; 3B: fusão das lamelas secundárias – setas – na concentração 0,5 mg/l de cloreto benzalcónio e ao 14º dia de exposição; 3C: dois aneurismas (seta) na lamela secundária – seta – na concentração de 0,025 mg/l de cloreto benzalcónio e ao 14º dia de exposição).

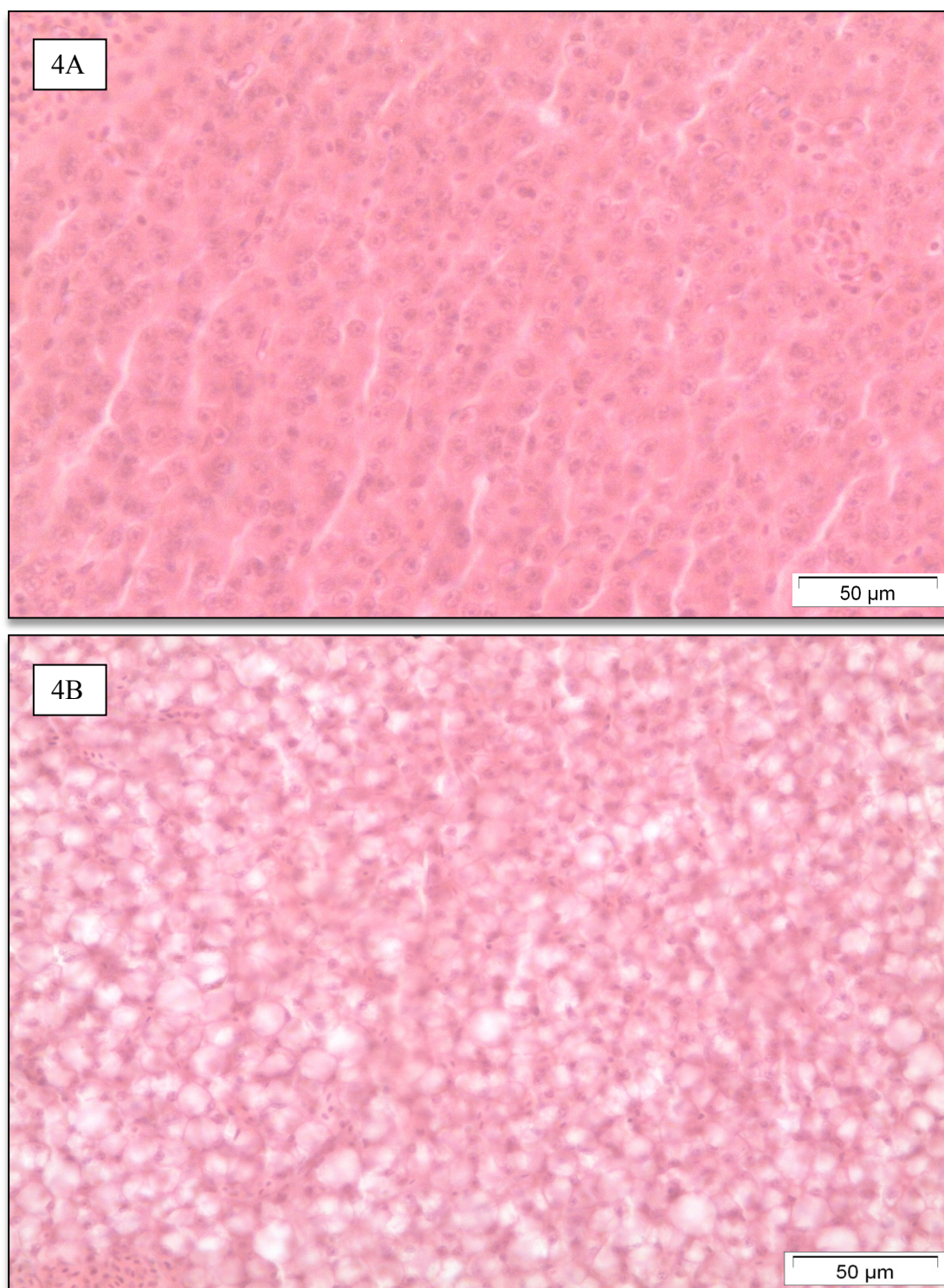


Figura 4 – Arquitectura de uma secção de fígado de *Gambusia holbrooki* (4A: sem alterações histopatológicas; 0,025 mg/l de cloreto benzalcónio e ao 4º dia de exposição; 4B: vacuolização hepática; grupo controlo ao 14º dia).

Os dados semi-quantitativos demonstram que as alterações histopatológicas estão distribuídas de uma maneira uniforme nos grupos controlo como nos grupos expostos (Figura 5), sem qualquer diferença significativa entre grupos (análise de variância bifactorial, $P>0,05$).

A análise dos dados quantitativos relativos às alterações observadas nas brânquias para os vários parâmetros morfométricos também não evidenciam qualquer relação entre a concentração do poluente, o tempo de exposição ou para a interacção entre os dois (análise de variância bifactorial, $P>0,05$) (Figuras 6 a 9).

Tabela 1 – Alterações observadas e respectivo factor de importância para às brânquias.

Padrão de reacção	Alteração	Factor de importância
Brânquias		
Distúrbios Circulatórios	Aneurisma	1
Alterações regressivas	Levantamento epitelial	1
	Descamação	1
	Fusão lamelar	1
Alterações progressivas	Hiperplasia	2

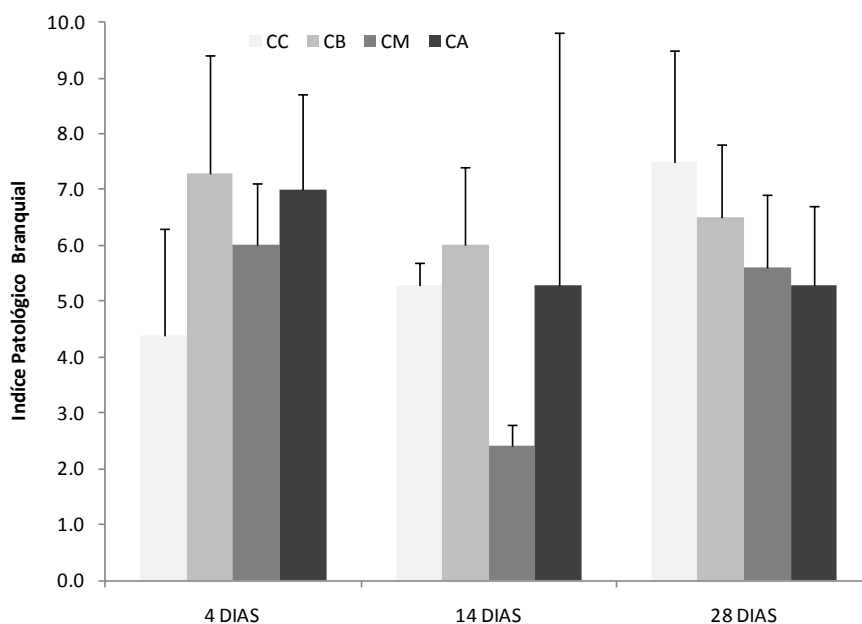


Figura 5: Índice patológico branquial para os diferentes grupos (CC: concentração controlo; CB: concentração baixa; CM: concentração média; CA: Concentração alta) ao longo do tempo (valor médio + erro padrão).

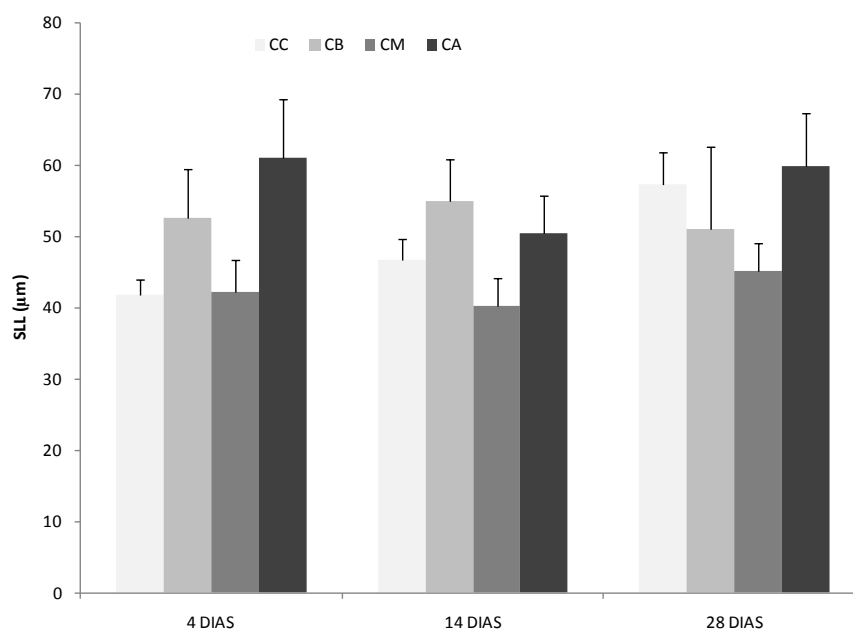


Figura 6 – Variação do comprimento da lamela secundária (SLL) para os diferentes grupos (CC: concentração controlo; CB: concentração baixa; CM: concentração média; CA: concentração alta) ao longo do tempo (valor médio + erro padrão).

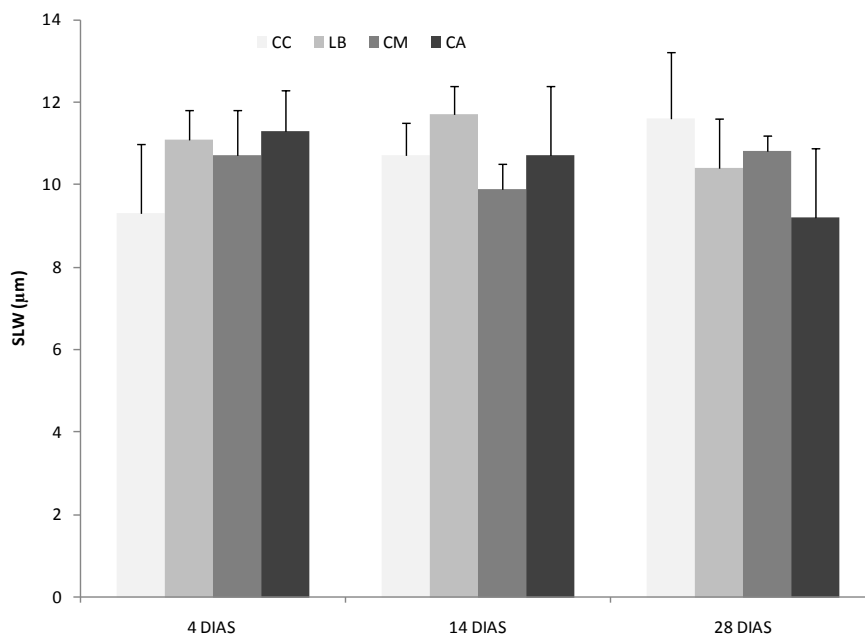


Figura 7: Espessura das lamelas secundárias (SLW) para os diferentes grupos (CC: concentração controlo; CB: concentração baixa; CM: concentração média; CA: concentração alta) ao longo do tempo de exposição (valor médio + erro padrão).

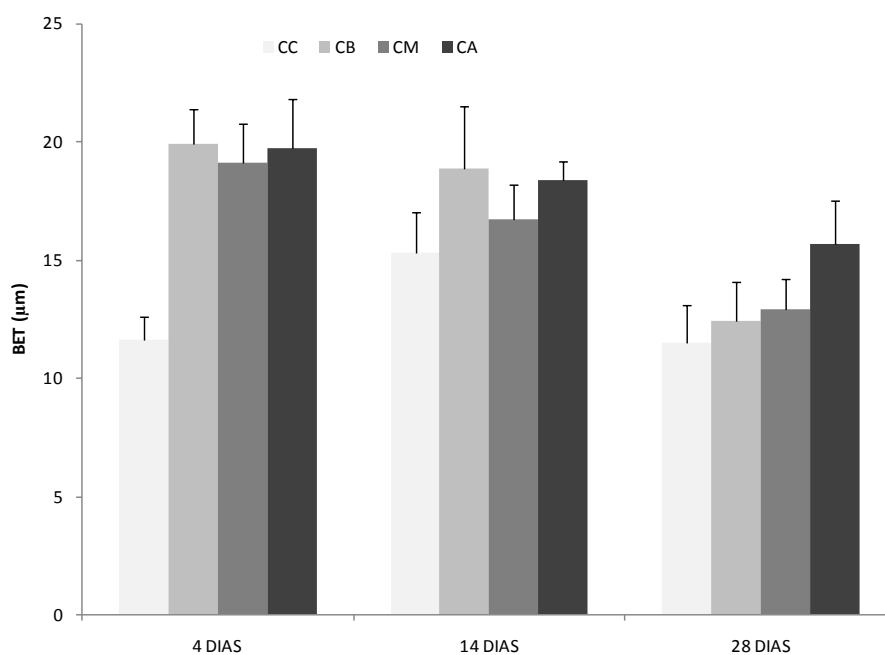


Figura 8: Espessura das lamelas primárias (BET) para os diferentes grupos (CC: concentração controlo; CB: concentração baixa; CM: concentração média; CA: concentração alta) ao longo do tempo de exposição (valor médio + erro padrão).

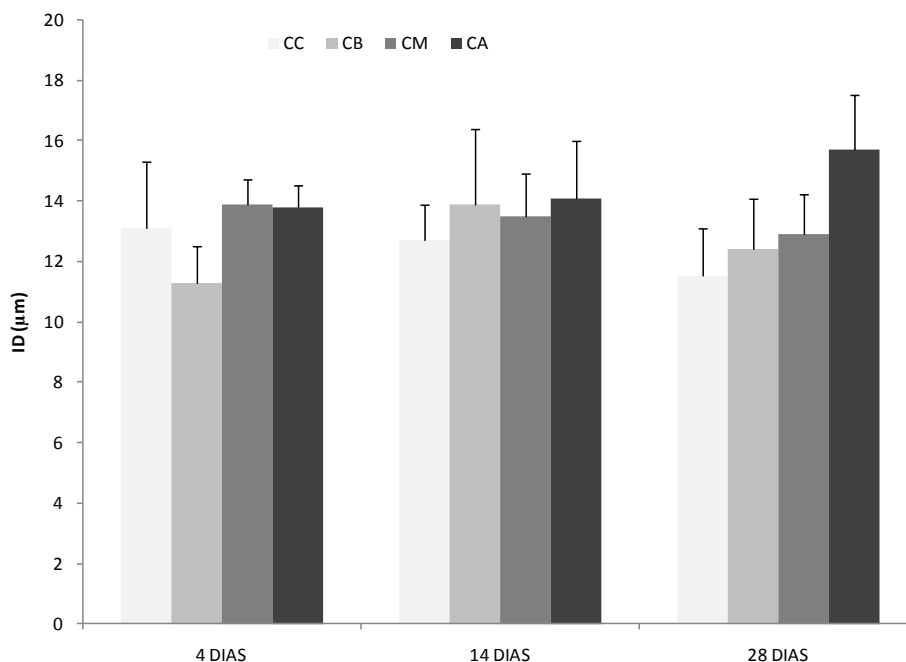


Figura 9 – Distância entre as lamelas secundárias (ID) para os diferentes grupos (CC: concentração controlo; CB: concentração baixa; CM: concentração média; CA: concentração alta) ao longo do tempo de exposição (valor médio + erro padrão).

Discussão:

Um elevado número de agentes terapêuticos, depois da sua eliminação do corpo do paciente, são lançados inalterados para o meio ambiente aquático. Desta forma existe um elevado número de compostos químicos que são encontrados no meio ambiente e que sofrem degradação biológica pelos organismos presentes nos ecossistemas aquáticos. Estes compostos têm particular interesse se possuírem uma importante actividade biológica, mesmo a baixas concentrações. Além disso, alguns deles são bioacumuláveis e/ou biomagnificáveis ao longo das cadeias alimentares. Além dos compostos farmacêuticos, por si só, os seus metabolitos podem também possuir actividade biológica que pode ser semelhante ou totalmente diferente do composto original. Além disso, a entrada de compostos farmacêuticos no meio ambiente deve ser considerada como um processo contínuo, no qual pequenas quantidades de uma enorme variedade de substâncias são sistematicamente libertadas (Nunes et al., 2004).

Actualmente, os fármacos, nomeadamente os agentes tensioactivos, são uma das causas de poluição antropogénica dos meios aquáticos (Amorim, 2003). A toxicidade genérica do cloreto de benzalcónio tem sido amplamente estudada na sequência de intoxicações nos humanos por este composto. Um dos principais aspectos da toxicidade do cloreto de benzalcónio é a sua afinidade com estruturas biológicas membranares, tais como cílios (Eleftheriadis et al., 2002). A título de exemplo sabe-se que a exposição da mucosa nasal humana a preparações farmacêuticas que contenham cloreto de benzalcónio pode causar ciliotoxicidade devido ao aumento do teor em mieloperoxidase fruto de um processo inflamatório (Riechelmann et al., 2004). Este composto também é considerado tóxico quando utilizado em preparações intra-oculares, usadas em operações cirúrgicas para tratar cataratas, por terem sido observadas várias alterações histológicas no olho (Eleftheriadis et al., 2002).

As respostas oxidativas e histopatológicas dos peixes a contaminantes variam com a espécie, com o seu habitat e mesmo como os seus hábitos alimentares (Ayas et al., 2007). Os biomarcadores têm a vantagem de medir respostas quantitativamente válidas e com relevância ecológica ao nível da poluição aquática (Ribeiro et al., 2007). Nos últimos anos verificou-se um acréscimo da utilização de biomarcadores histopatológicos na monitorização, tanto ao nível da qualidade ambiental, como na saúde dos organismos que habitam os ecossistemas poluídos (Bernet et al., 1999; Ayas et al., 2007; Costa et al., 2009).

A utilização de biomarcadores histopatológicos na monitorização do meio ambiente acarreta grandes vantagens, visto que permite examinar órgãos-alvo específicos, tais como, as brânquias, os rins e o fígado, que são responsáveis por funções vitais, como respiração, excreção e acumulação/biotransformação de xenobióticos em peixes. Além disso, as alterações estruturais encontradas nestes órgãos são normalmente mais fáceis de identificar que as funcionais, e servem como sinais de aviso de danos para a saúde animal (Camargo e Martinez, 2007).

A vantagem do uso de ferramentas histológicas como biomarcadores reside na sua localização intermédia no que respeita ao nível de organização biológica. As alterações histológicas aparecem como uma resposta aos efeitos sub-letais, sendo a um método rápido para detectar os efeitos de irritantes, especialmente crónicos, em vários tecidos e órgãos (Bernet et al., 1999). Uma das dificuldades mais importantes dos estudos histopatológicos em peixes está relacionada com a falta de especificidade das

lesões e alterações provocadas por um contaminante ou classe de contaminantes, o que prejudica, e muito, a avaliação da causa-efeito, quando estão envolvidos vários tóxicos. Por outro lado, as patologias ao nível do tecido são, de longe, melhor descritas na espécie humana do que nos peixes, podendo, em alguns casos, surgir discrepâncias, quer na terminologia, quer na identificação de lesões. No sentido de resolver este problema, está sendo realizado trabalho de pesquisa, com o âmbito de fornecer orientações sobre os parâmetros histopatológicos de exposição a xenobióticos (e.g. Koehler, 2004). Outro ponto fulcral será o de conseguir atribuir um real significado biológico às lesões analisadas (Costa et al., 2009).

Alguns autores propõem que os índices de condição devam considerar a importância relativa das lesões, visto que algumas alterações podem implicar um prejuízo maior para um órgão do que para os outros. Estes índices de ponderação têm sido desenvolvidos de modo a preencher esta lacuna através da atribuição de uma escala de valores a lesões específicas de acordo com o seu impacto no peixe (Costa et al., 2009). Existe uma miríade de estudos de patologias de peixes em laboratório (e.g. Couch, 1975; Couch, 1984; Forlin et al., 1986; Grady et al., 1992; Braunbeck, 1998), no entanto, e surpreendentemente, são poucas as tentativas da aplicação sistemática de biomarcadores histopatológicos no terreno a ecossistemas de água doce. Estes estudos têm demonstrado que os biomarcadores histopatológicos são muito sensíveis e podem revelar a etiologia tóxica de acordo com o tipo de contaminação ambiental (Handy et al., 2002). Apesar destas vantagens, os biomarcadores histopatológicos não são utilizados em rotina regulatória de monitorização na saúde dos peixes na Europa (Handy et al., 2002).

Os peixes teleósteos possuem cinco pares de arcos branquiais constituídos por numerosos filamentos branquiais, nos quais se inserem as lamelas secundárias num ângulo recto e que representam a superfície funcional respiratória (Leonardo et al., 2001; Garcia-Santos et al., 2007). A nível do revestimento, as brânquias possuem um epitélio do tipo simples pavimentoso. As lamelas primárias são sustentadas por um tecido cartilaginoso e possuem muitos vasos sanguíneos, enquanto que as lamelas secundárias são constituídas por três camadas de células: duas de células pavimentosas e uma camada intermédia constituída por células pilares. Os prolongamentos das células pilares formam os capilares sanguíneos através dos quais ocorrem as trocas gasosas (Rossi et al., 2008). As brânquias participam em muitas funções importantes nos peixes,

tais como a osmorregulação, respiração e excreção, e permanecem em contacto estreito com o ambiente externo e são particularmente sensíveis às mudanças na qualidade da água (Leonardo et al., 2001; Breseghelo et al., 2004; Cengiz e Unlu, 2006; Camargo e Martinez, 2007).

Muitos agentes químicos, físicos e biológicos podem produzir alterações histológicas no tecido branquial, como edema e hiperplasia epitelial das lamelas secundárias, infiltração de células epiteliais, fusão lamelar, como também a morte de células mucosas, devido a longos períodos de hipersecreção de muco. Estas alterações provêm de uma resposta defensiva crónica a infecções parasitárias, bacterianas ou a irritantes químicos (Leonardo et al., 2001; Breseghelo et al., 2004).

A avaliação histológica do dano causado por um insecticida (malatião) no tecido branquial de *Gambusia affinis* demonstrou ser um eficaz bioindicador de exposição e efeito (Cengiz e Unlu 2003). Outro estudo de avaliação de efeito de um tensioactivo aniónico a nível histopatológico em tecido branquial, em *Solea senegalensis*, evidenciou também fenómenos de fusão lamelar, edema intraepiteal, levantamento de camadas epiteliais (Álvarez-Muñoz et al., 2009). Coutinho e Gokhle (2000) observaram levantamentos epiteliais nas brânquias de carpas (*Cyprinus carpio*) e tipália (*Oreochromis mykiss*) expostas ao efluente de uma estação de tratamento de águas residuais. Engelhardt et al. (1981) observou levantamento epitelial e fusão lamelar em trutas arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) expostas a resíduos de petróleo. Alterações similares também foram descritas para peixes expostos a metais e contaminantes orgânicos (Camargo e Martinez, 2007).

Alterações como o levantamento epitelial, hiperplasia e hipertrofia das células epiteliais são exemplos de mecanismos de defesa, pois levam a diminuição da área de contacto com a água, funcionando como uma barreira para a entrada de contaminantes, embora com prejuízo para a função respiratória (Camargo e Martinez, 2007; Garcia-Santos et al., 2007). Essas alterações não são específicas e podem ser induzidas por diferentes contaminantes (Mallat et al., 1985). Como consequência do aumento da distância entre água e sangue, devido à elevação epitelial, o consumo de oxigénio é comprometido. No entanto, os peixes têm a capacidade de aumentar a sua taxa de ventilação, para compensar o baixo consumo de oxigénio (Camargo e Martinez, 2007).

A maior parte das lesões branquiais são efeitos subletais causados por exposições crónicas sub-letais; no entanto também podem ocorrer algumas alterações

nos vasos sanguíneos quando os peixes estão sujeitos a um tipo mais grave de *stress*. Neste caso, as células pilar danificadas podem resultar num aumento do fluxo sanguíneo no interior das lamelas, provocando a dilatação do canal marginal, congestão de sangue ou mesmo um aneurisma. A formação de aneurismas está relacionado com a ruptura das células pilar devido ao aumento do fluxo sanguíneo ou até devido aos efeitos directos de contaminantes nessas células. Este é um tipo de lesão grave, da qual também é possível recuperar, mas mais difícil do que as alterações epiteliais (Camargo e Martinez, 2007).

No presente estudo, foram detectadas diversas alterações histopatológicas, tais como, fusão das lamelas secundárias, hiperplasia, aneurisma e levantamento da camada epitelial das lamelas secundárias, sendo esta alteração predominante. As alterações evidenciadas não podem ser consideradas específicas, visto que ocorreram de uma forma geral, tanto nos grupos teste como nos grupos controlo. Estes resultados podem também significar que, os grupos controlo estavam afectados, independentemente do período de quarentena a que estiveram sujeitos; ou então trata-se de variações normais individuais. Estas alterações são facilmente revertidas por supressão do agente causador (Bernet et al., 1999). Os aneurismas foram observados de forma muito pontual (cloreto benzalcónio 0,025 mg/l ao 14º dia) e podem ser interpretado como um reflexo da acção directa do agente tóxico (Camargo e Martinez, 2007) ou uma alteração histológica associada ao stress mecânico causado durante o sacrificio dos animais.

O fígado é o órgão mais importante no processo de desintoxicação sobretudo devido à sua posição interposta na circulação porta-hepática e como tal é dos órgãos mais afectados pelos contaminantes da água (Camargo e Martinez, 2007). O tecido hepático é composto por células parenquimais (células hepáticas ou hepatócitos) e uma rede de suporte constituída por fibras reticulares (Braunbeck, 1998). A análise histológica de hepatócitos, exactamente por desempenharem várias funções vitais (metabolismo básico, produção de bÍlis, vitelogénese, acumulação, biotransformação e excreção de contaminantes orgânicos e inorgânicos) representam um tipo de biomarcador com grande sensibilidade ambiental (Braunbeck, 1998).

O tamanho das células hepáticas em preparações microscópicas reflecte o seu estado funcional fisiológico, podendo se apresentar em estados hiperfuncional (aumento do volume celular, núcleo e nucléolo) e hipofuncional (diminuição do volume celular, núcleo e nucléolo) (Melo et al., 2004). Vários estudos sugerem a utilização do tecido hepático como biomarcador histopatológico, pois este tecido demonstra ser uma

ferramenta útil na avaliação da qualidade da água e do papel dos contaminantes aquáticos nos ecossistemas (Lang et al., 2006). Na espécie piscícola *Gobiocypris rarus* este tecido demonstrou sofrer várias alterações (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 sofreu alterações (aumento do tamanho dos hepatócitos, aumento do tamanho do núcleo e núcleos picnóticos, aumento da densidade do tecido conectivo, vacuolização) após exposição a um herbicida (glifosato) (Olurin et al., 2006). *Corydoras paleatus* sujeitos à contaminação por pesticidas evidenciaram alterações hepáticas tais como uma forma irregular dos hepatócitos, vacuolização do citoplasma e núcleos com disposição excêntrica. Os vacúolos no citoplasma dos hepatócitos contêm lípidos e glicogénio, sendo a diminuição de glicogénio nos hepatócitos normal para animais sujeitos a *stress*, porque o glicogénio actua como reserva de glicose para fornecer mais energia em situações deste tipo (Camargo e Martinez, 2007). Desta forma, o aumento da vacuolização dos hepatócitos como um sinal de doenças degenerativas, é um processo que sugere que os danos metabólicos estão possivelmente relacionados com a exposição a água contaminada (Pacheco e Santos, 2002). Contudo a presença de glicogénio nos vacúolos dos hepatócitos demonstrado pelo método PAS sugere que a vacuolização não necessita de estar relacionada necessariamente com um processo degenerativo (Camargo e Martinez, 2007).

No presente trabalho 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 inespecífica e comum a diversos compostos químicos (Liao et al., 2006).

A análise qualitativa e estatística das alterações observadas neste trabalho sugere que o cloreto de benzalcónio é relativamente inócuo para a gambúsia, não tendo sido observada qualquer relação entre a concentração e/ou duração de exposição. Estes resultados vêm apoiar um estudo recente que também não detectou qualquer inibição *in vivo* da actividade da acetilcolinesterase numa exposição aguda de *G. hoolbrooki* ao mesmo composto (Gonçalves et al., 2010).

Bibliografia:

Alvarez-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* 74:1216-1223.

Amorim L C A (2003) Os biomarcadores e sua aplicação na avaliação da exposição aos agentes químicos ambientais. *Revista Brasileira de Epidemiologia* 6: 1.

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

Beaudouin R (2007) Modélisation individu-centrée pour aider à la détection et à l'interprétation des effets des polluants chimiques sur la dynamique de population d'un poisson, la gambusie, en écosystème expérimental. [em linha]. Disponível em <http://www.remy-beaudouin.net/uploads/Pdf/ManuscritThesis.pdf>. [consultado em 15/12/09].

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.

Braunbeck T (1998) Cytological alterations in fish hepatocytes following in vivo and in vitro sublethal exposure to xenobiotics – structural biomarkers of environmental contamination. *Braunbeck, T., Hinton, D.E., Streit, B. (Eds.). Fish Ecotoxicology.* Birkhauser Verlag, Basel, Switzerland 61–140.

Breseghele L, Cardoso M P, Borges-De-Oliveira R, Costa M F, Barreto J C B, Sabóia-Morais S M T, Yamada A T (2004) Efeitos do fluoreto de sódio no epitélio da brânquia do peixe Guaru (*Poecilia vivipara*). *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science* 41:274-280.

Cabral J, Mieiro C, Marques J (1998) Environmental and biological factors influence the relationship between a predator fish, *Gambusia holbrooki*, and its main prey in rice fields of the Lower Mondego River Valley (Portugal). *Hydrobiologia* 382:41-51.

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

Campagna A F, Eler M N, Fracácio A, Rodrigues B K, Verani N F (2007) The toxic potential of aldrin and heptachlor on *Danio rerio* juveniles (*Cypriniformes, Cyprinidae*). *Ecotoxicology* 16:289–298.

Carrola J, Fontainhas-Fernandes A, Matos P, Rocha E (2009) Liver Histopathology in Brown Trout (*Salmo trutta* f. *fario*) from the Tinhela River, Subjected to Mine Drainage from the Abandoned Jales Mine (Portugal). *Bull Environ Contam Toxicol* 83:35–41.

Cengiz E I, Ünlü E (2003) Histopathology of Gills in Mosquitofish, *Gambusia affinis* After Long-Term Exposure to Sublethal Concentrations of Malathion. *Journal of Environmental Science and Health, Part B* 38:581-589.

Cinar K, Aksoy A, Emre Y, Aşti R N, (2009) The histology and histochemical aspects of gills of the flower fish, *Pseudophoxinus antalyae*. *Vet Res Commun* 33:453–460.

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

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

Cserháti T, Forgács E, Oros G (2002) Biological activity and environment impact of anionic surfactants. *Environment International* 28:337-348.

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

Elahee K S, Bhagwant S (2006) Hematological and gill histopathological parameters of three tropical fish species from a polluted lagoon on the west coast of Mauritius. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 68:361-371.

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

Elenius A, Simons K (1975) Solubilization of membranes by detergents. *Biochim. Biophys. Acta* 415:29-79.

Engelhardt F R, Wong M P, Duey M E (1981) Hydromineral balance and gill morphology in rainbow trout *Salmo gairdneri*, acclimated to fresh and sea water as affected by petroleum exposure. *Aquatic Toxicology* 1:175-186.

Fent K (2008) Effects of Pharmaceuticals on Aquatic Organisms. *Pharmaceuticals in the Environment*, part III:175-203.

Figueiredo-Fernandes A, Fontainhas-Fernandes A, Monteiro R, Reis-Henriques M A, Rocha E (2006) Effects of the Fungicide Mancozeb on Liver Structure of Nile Tilapia, *Oreochromis niloticus*: Assessment and Quantification of Induced Cytological Changes Using Qualitative Histopathology and the Stereological Point-Sampled Intercept Method. *Bull. Environ. Contam. Toxicol* 76:249–255.

Garcia-Santos S, Monteiro S M, Carrola J, Fontainhas-Fernades A (2007) Alterações histológicas em brânquias de tilápia nilotica *Oreochromis niloticus* causadas pelo cádmio. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 59:376-381.

Gonçalves A, Padrão J, Gonçalves F, Nunes B (2010) In vivo acute effects of several pharmaceutical drugs (diazepam, clofibrate, clofibric acid) and detergents (sodium dodecylsulphate and benzalkonium chloride) on cholinesterases from *Gambusia holbrooki*. *Fresenius Environmental Bulletin* 04:1-12.

Halver J E (1975) Utilization of ascorbic acid in fish. *Annual New York Academy of Sciences*. Washington 258:81-102.

Handy R D, Runnalls T e Russel P M (2002) Histopathologic Biomarkers in The Sticklebacks, *Gasterosteus aculeatus*, from Several Rivers in Southern England that Meet the Fisheries Directive. *Ecotoxicology* 11:467-479.

Hoeger B, Kollner B, Dietrich D R, Hitzfelt B (2005) Water-borne diclofenac affects kidney and gill integrity and selected immune parameters in brown trout (*Salmo trutta f. fario*). *Aquatic Toxicology* 75:53-64.

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

Koehler A (2004) The gender-specific risk to liver toxicity and cancer of flounder (*Platichthys flesus* (L.)) at the German Wadden Sea coast. *Aquatic Toxicology* 70:257-276.

Koehler A, Alpermann T, Lauritzena B, Van Noorden C J F (2004) Clonal xenobiotic resistance during pollution-induced toxic injury and hepatocellular carcinogenesis in liver of female flounder (*Platichthys flesus* (L.)). *Acta histochemica*. 106:155-170.

Kostich M S, Lazorchak J M (2008) Risks to aquatic organisms posed by human pharmaceutical use. *Science of the environment* 389:329-339.

Kummerer K (2001) Drugs in the environment: emission of drugs, diagnostic aids and disinfectants into wastewater by hospitals in relation to the other sources – a review. *Chemosphere* 45:957-969.

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* 53:488-496.

Leonardo J M L O, Vargas L, Ribeiro R P, Moreira H L M, Natali M R M, Cavichiolo F (2001) Histologia das brânquias de larvas da tilápia do Nilo, *Oreochromis niloticus* (L.), de origem tailandesa, submetidas a diferentes níveis de vitamina C. *Acta Scientiarum* 23:863-870.

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

Liao C Y, Fu J J, Shi J B, Zhou Q F, Yaun C G, 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* 22:225-233.

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

Mckay S, Clunie P, Gillespie G, Raadik T, Saddler S, O'brien T, Ryan T, Aland G (2001) Predation by *Gambusia holbrooki*: a review of the literature. New South Wales National Parks and Wildlife Service.

Melo G C, Fanta E S (2004) Efeitos subletais da acção do organofosforado Folidol® 600 no fígado do peixe de água doce jundiá *Rhamdia quelen* (Quoy & Gaimard, 1824) : uma análise histopatológica. Universidade federal do Panamá, sector de ciências biológicas. Programa de pós-graduação em biologia celular e molecular.

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

Nero V, Farwell A, Lister A, Van Der Kraak G, Lee L E J, Van Meer T, Mackinnon M D, Dixon D G (2006) Gill and liver histopathological changes in yellow perch (*Perca flavescens*) and goldfish (*Carassius auratus*) exposed to oil sands process-affected water. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 63:365–377.

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

OCDE (1984) Test No. 204: Fish, Prolonged Toxicity Test: 14-day Study. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals.

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

OCDE (2000) Test No. 215: Fish, Juvenile Growth Test. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals.

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* 5:2480-2487.

Oscoz J (2008) Additional records of eastern mosquitofish *Gambusia holbrooki* (Girard, 1859) for the River Ebro basin (Spain). *Journal compilation reabic* 3:108-112.

Pacheco M, Santos M A (2002). Biotransformation, genotoxic and histopathological effects of environmental contaminants in European eel (*Anguilla anguilla* L.). *Ecotoxicology and Environmental Safety* 53:331-347.

Pyke G H (2005) A review of the biology of *Gambusia affinis* and *G. holbrooki*. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 15:339–365.

Ribeiro E A, Fanta E S, Assis H C (2007) Efeitos de concentrações subletais dos hidrocarbonetos poliaromáticos específicos BTX (benzeno, tolueno e xileno) no peixe (*Sphaeroides testudineus linnaeus*, 1758) através de biomarcadores bioquímicos e histológicos. Universidade federal do Panamá, sector de ciências biológicas. Programa de pós-graduação em biologia celular e molecular.

Riechelmann H, Deutschle T, Stuhmiller A, Gronau S e Harald B (2004) Nasal Toxicity of Benzalkonium Chloride. *American Journal of Rhinology* 18:291 – 299.

Rossi S, Assis H (2008) Uso de biomarcadores para a detecção de efeitos subletais de pesticidas Roundup® e hexaron® em *Astyanax* sp. (pisces, Teleostei). Universidade federal do panama. Sector de ciências biológicas. Programa de pos-graduação em farmacologia.

Schlacher T A, Mondon J A, Connolly R M (2007) Estuarine fish health assessment: Evidence of wastewater impacts based on nitrogen isotopes and histopathology. *Marine Pollution Bulletin* 54:1762–1776.

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

Timbrell J A (1998) Biomarkers in Toxicology. *Toxicology* 129:1-12.

Wharfe E S, Winder C W L, Jarvis R M, Goodacre R (2010) Monitoring the Effects of Chiral Pharmaceuticals on Aquatic Microorganisms by Metabolic Fingerprinting. *Applied and Environmental Microbiology* 76:2075–2085.

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

Zar J H (1996) *Biostatistical analysis*, 3rd edn. Prentice-Hall, London.

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

