

Miguel Pedro Estrada Lopo

Avaliação do Impacto da Extracção de Inertes
em Espécies Estuarinas de Peixes

Instituto de Ciências Biomédicas de Abel Salazar

Universidade do Porto

2004



Dissertação apresentada ao Instituto de Ciências Biomédicas
de Abel Salazar para obtenção do grau de Mestre em
Ciências do Mar – Recursos Marinhos, especialidade
Ecologia Marinha

Resolução 12/SC/95, D. R. Nº 169, II série, de 24 de Julho de 1995

Orientação: Prof. Doutora Lúcia Guilhermino

Co-Orientação: Doutor José Carlos Antunes

AGRADECIMENTOS

Gostaria de começar por agradecer à minha família:

Aos meus pais, por todo o apoio que sempre me deram em qualquer escolha, decisão ou actividade que empreendi.

Às minhas duas irmãs por me proporcionarem momentos de pura alegria.

À minha avó e tia por facilitarem em tudo a minha vida durante a realização desta tese.

Gostaria de agradecer aos meus dois orientadores, Doutora Lúcia Guilhermino e Doutor José Carlos Antunes pela preciosa orientação, conselhos e ajuda.

Ao Professor João Coimbra pela cedência das instalações do Centro Interdisciplinar de Investigação Marinha e Ambiental (CIIMAR).

Gostaria de agradecer particularmente à Dr. Manuela Frasco e ao Doutor Jonathan Wilson pela aprendizagem e ajuda com as técnicas de análise enzimática.

E a todos os outros colegas, pelo espírito crítico e construtivo e entreaajuda sempre que necessário.

RESUMO

A extracção de inertes é um processo que induz artificialmente o transporte e a deposição de sedimentos. Embora sejam conhecidos os seus efeitos físicos, incluindo alterações na topografia e aumentos de turbidez, entre outros, os seus efeitos nos organismos do meio aquático são ainda pouco conhecidos.

O objectivo central do presente trabalho foi estudar os efeitos de sólidos em suspensão em duas espécies de peixes migradores de grande importância ecológica, económica e social, a enguia europeia (*Anguilla anguilla*) e a truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*). Para esse efeito, foram realizados bioensaios baseados na mortalidade e em enzimas que desempenham papel importante em funções determinantes para a sobrevivência dos animais: acetilcolinesterase (AChE), crucial para a neurotransmissão; glutathione S-transferase (GST), importante na destoxificação de poluentes; lactato desidrogenase (LDH), fundamental para a manutenção do processo de glicólise em condições anaeróbicas e sódio, potássio ATPase (Na^+ , K^+ - ATPase) essencial no transporte de iões através das brânquias em ambientes hiperosmóticos.

Foi desenvolvido um sistema de exposição que permitia manter partículas sólidas em suspensão, tendo sido utilizada uma substância denominada “fuller’s earth” como exemplo. O sistema era constituído por oito silos com diferentes concentrações de partículas sólidas em suspensão. A experiência foi repetida três vezes para cada espécie.

Observou-se mortalidade em ambas espécies, sobretudo nas concentrações mais elevadas de sólidos em suspensão, não tendo ocorrido mortalidade nos tanques dos animais controlo. Não foram observadas diferenças significativas na actividade das enzimas estudadas.

Os resultados obtidos neste trabalho sugerem que a extracção de inertes pode ter efeitos negativos a nível das populações de *Anguilla anguilla* e de *Oncorhynchus mykiss*, pelo que deverão ser adoptadas medidas mitigadoras no sentido de reduzir o impacto desta actividade nestas espécies.

ABSTRACT

Dredging is a process that causes an artificial transportation and deposition of sediment by the suspension of its solids. Although its physical effects on the environment are well known and include turbidity increase and changes on riverbed or seabed topography, among others, the knowledge of the effects of dredging on aquatic organisms is rather poor.

The main objective of this work was to study the effects of suspended solids on two migrating fish species of great ecologic, economic and social importance, the European eel (*Anguilla anguilla*) and the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Bioassays based on mortality and on enzymes that play an important role in functions determinant for the survival of the organism were performed: acetylcholinesterase (AChE), crucial for neurotransmission; glutathione S-transferase (GST), very important in the detoxification of pollutants; lactate dehydrogenase (LDH), which sustains the continued process of glycolysis under anaerobic conditions and sodium, potassium ATPase (Na^+ , K^+ - ATPase) essential in the transportation of ions across the gill epithelia in hyperosmotic environments.

A system that provided continuous suspension of sediment particles was elaborated using fuller's earth as sediment. The system was composed of eight tanks with different concentrations of suspended material. The experiment was repeated three times for each species.

Mortality on both species was observed, especially at high concentrations of suspended solids. No mortality was observed in the control group. No significant differences were observed in the activity of any of the studied enzymes.

The results of this study suggest that the extraction of sediments may have negative effects on *Anguilla anguilla* and *Oncorhynchus mykiss* populations. Therefore preventive measures should be taken in order to reduce the negative impact of this activity on these species.

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. A ENGUIA EUROPEIA <i>ANGUILLA ANGUILLA</i> LINNAEUS.....	3
1.1.1. História.....	3
1.1.2. Distribuição Geográfica.....	5
1.1.3. Ciclo Biológico.....	6
1.1.4. Importância Económica e Social.....	11
1.2. A TRUTA ARCO – ÍRIS <i>ONCORHYNCHUS MYKISS</i>	13
1.2.1. Distribuição Geográfica.....	14
1.2.2. Ciclo Biológico.....	15
1.2.3. Importância Económica e Social.....	19
1.3. TÉCNICAS DE DRAGAGEM E SEUS EFEITOS EM ECOSISTEMAS AQUÁTICOS.....	20
1.4. OBJECTIVOS E CRITÉRIOS DE EFEITO UTILIZADOS NESTE ESTUDO.....	28
1.4.1. Acetilcolinesterase (AChE).....	29
1.4.2. Glutathione S- transferase (GST).....	29
1.4.3. Lactato desidrogenase (LDH).....	30
1.4.4. Sódio, potássio ATPase (Na ⁺ , K ⁺ - ATPase).....	31
1.4.5. Actividade EROD da enzima CYP1A.....	32
2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	33

2.1. CAPTURA E MANUTENÇÃO DE AMBAS AS ESPÉCIES.....	33
2.2. DETERMINAÇÃO DA ACTIVIDADE DAS ENZIMAS EM ANIMAIS MANTIDOS EM LABORATÓRIO.....	34
2.3. ENSAIOS ENZIMÁTICOS.....	36
2.3.1. Acetilcolinesterase (AChE).....	36
2.3.2. Glutathione S-transferase (GST).....	36
2.3.3. Lactato desidrogenase (LDH).....	37
2.3.4. Sódio, potássio ATPase (Na ⁺ , K ⁺ - ATPase).....	37
2.3.5 Actividade EROD da enzima CYP1A.....	38
2.3.6 Quantificação Da Proteína.....	39
2.4. ENSAIOS COM SÓLIDOS EM SUSPENSÃO.....	39
2.4.1. A Enguia Europeia <i>Anguilla anguilla</i>	39
2.4.2. A Truta Arco-Íris <i>Oncorhynchus mykiss</i>	41
2.5. AGENTES QUÍMICOS.....	43
2.6. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	43
3. RESULTADOS.....	44
3.1. ACTIVIDADE DAS ENZIMAS EM ANIMAIS MANTIDOS EM LABORATÓRIO.....	44
3.2. ENSAIOS COM SÓLIDOS EM SUSPENSÃO.....	50
3.3. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	57

4.	DISCUSSÃO.....	58
5.	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	66
6.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	68

AVALIAÇÃO DO IMPACTO DA EXTRACÇÃO DE INERTES EM ESPÉCIES ESTUARINAS DE PEIXES

1. INTRODUÇÃO

As águas costeiras e estuarinas recebem grandes quantidades de material mineral devido aos processos normais de erosão e deposição. A acção das ondas e marés também colocam, periodicamente, em suspensão sedimentos mais finos. A actividade humana em águas costeiras e ao longo destas resulta frequentemente em níveis de turbidez mais elevados do que os que ocorreriam naturalmente. Níveis elevados de turbidez podem advir de vários factores como dragagens, descarga de sedimentos ou entulho, esgotos, etc.

Duas das opções mais comuns para a remoção de resíduos produzidos pela sociedade são a sua libertação em rios, estuários ou directamente no oceano e a sua deposição em aterros sanitários. Zonas estuarinas próximas de estruturas portuárias sujeitas a grande tráfego de embarcações ou nas proximidades de centros urbanos acumulam resíduos petroquímicos, industriais e municipais. Como as partículas finas de areia e argila carregadas negativamente têm tendência para adsorver diversos xenobióticos (*e.g.* metais pesados, pesticidas), parte do sedimento que é dragado pode encontrar-se contaminado. O Corpo de Engenheiros do Exército dos Estados Unidos estimou que um terço de todo o material que é dragado nos EUA está poluído (Boyd *et al.*, 1972).

A extracção de inertes constitui um processo de erosão, transporte e deposição de sedimentos induzida artificialmente. Este processo é diferente do que ocorre naturalmente, principalmente por ser muito mais concentrado no tempo e no espaço. Os efeitos físicos da extracção de inertes por dragagem podem ser resumidos da seguinte forma: aumentos temporários de turbidez, mudanças na topografia do leito do rio, estuário ou oceano que levam a mudanças nos padrões de circulação da água e mudanças nas propriedades mecânicas dos sedimentos. Outros factores importantes que influenciam os impactos físicos da extracção de inertes são o tipo e volume de sedimento extraído, a

frequência de extracção, as condições climatéricas, os métodos usados e o tamanho da draga (Slotta *et al.*, 1973; Maurer *et al.*, 1974).

Os efeitos que as partículas em suspensão e as substâncias a elas associadas induzem nos organismos estuarinos são relativamente pouco conhecidos. No entanto, mortalidade e diminuição da reprodução são dois dos factores negativos que têm sido observados em áreas onde é efectuada a extracção de inertes. Estes efeitos estuarinos dependem de vários factores incluindo a sua concentração, composição, compostos tóxicos existentes nos sedimentos e da tolerância dos organismos.

Na literatura existem vários estudos que descrevem os efeitos físicos da extracção de inertes em peixes. Por exemplo Sherk *et al.* (1974) observaram efeitos letais de sólidos em suspensão, efeitos dos sólidos na respiração dos peixes e efeitos subletais dos mesmos em parâmetros hematológicos em várias espécies de peixes estuarinos, incluindo robalo-do-norte (*Morone americana*), roncadeira-de-pinta (*Leiostomus xanthurus*) e menhadem (*Brevoortia tyrannus*). Nesse mesmo estudo foram ainda investigados efeitos de concentrações subletais nas brânquias do robalo-do-norte e a relação tempo/concentração/mortalidade em algumas espécies expostas a “fuller’s earth”, uma substância mineral com propriedade de absorver as cores básicas e classificada como um tipo de argila. Também Rogers (1969) efectuou um estudo onde foram analisados os níveis de tolerância de quatro espécies estuarinas de peixes expostas a sólidos em suspensão. Jokiel (1989) observou em Honolulu (Havai) os efeitos dos sólidos em suspensão nos ovos e larvas do doirado (*Coryphaena hippurus*) uma espécie comercialmente importante naquela região.

Os exemplos acima referidos revelam a preocupação existente relativamente aos efeitos físicos que a extracção de inertes provoca em peixes.

O objectivo deste projecto foi avaliar os efeitos letais e subletais de partículas sólidas em suspensão em duas espécies de peixes importantes no litoral Norte de Portugal: a enguia europeia, *Anguilla anguilla* Linnaeus e a truta arco-íris, *Oncorhynchus mykiss* Walbaum.

No estudo foram utilizados juvenis de ambas as espécies. Em *A. anguilla* foram utilizados juvenis no estado denominado enguia de vidro (também conhecida como meixão, irozinha ou angula), definido por Tesch (1977) como o período de desenvolvimento compreendido entre o fim da metamorfose do leptocéfalo até o início da pigmentação. Nos estudos com a truta arco-íris, foram utilizados juvenis com dimensões entre 4 e 6 cm.

Para avaliar os efeitos de partículas em suspensão, foram realizados bioensaios, utilizando um dispositivo propositadamente desenvolvido para o efeito e que será descrito posteriormente, tendo os organismos sido expostos a diferentes concentrações de material em suspensão durante 96 horas. Ao longo e no final do ensaio foram contabilizados os indivíduos mortos. Após 96 horas foi determinado o efeito da exposição a partículas em suspensão na actividade das enzimas, nomeadamente na acetilcolinesterase (AChE), lactato desidrogenase (LDH), glutathione S-transferase (GST) e sódio, potássio ATPase (Na^+ , K^+ - ATPase). O estudo do Citocromo P4501A (isoenzima CYP1A) foi realizado através da actividade da enzima EROD (7-ethoxyresorufin O-deethylase).

1.1 A ENGUIA EUROPEIA *ANGUILLA ANGUILLA* LINNAEUS

A enguia europeia *Anguilla anguilla* é uma das 19 espécies do género *Anguilla* e de acordo com Nelson (1994), a sua posição taxonómica é a seguinte:

Filo: Chordata
Subfilo: Vertebrata
Superclasse: Gnathostomata
Grau: Teleostomi
Classe: Actinopterygii
Subclasse: Neopterygii
Divisão: Teleostei
Subdivisão: Elopomorpha
Ordem: Anguilliformes
Subordem: Anguilloidei
Família: Anguillidae
Género: *Anguilla*
Espécie: *Anguilla anguilla*

1.1.1 História

Aristóteles, filósofo grego do século I aC, afirmou que a enguia nascia do interior da terra. Outros filósofos e homens de ciência da Antiguidade diziam que esta espécie era

capaz de se reproduzir por estacas, que para se reproduzir bastava roçar nas pedras ou, ainda, que nascia das vísceras dos cavalos (Broustal, 1988). Plínio, escritor romano do século I, referia que as enguias saíam do mar para “obterem alimento e encontrar um companheiro que não é outra enguia, mas sim uma serpente” (in Bessa, 1996). Os camponeses ingleses da Idade Média acreditavam que os juvenis de enguia, no estado de enguia de vidro, eram pêlos de crina de cavalos que adquiriam vida quando deitados à água. Em vários locais, desde a Europa até ao Tahiti, existem lendas e mitos acerca da origem das enguias.

Aparentemente, os mitos e lendas apenas começaram a ruir no século XVI. Em 1771, Mondini, cientista da Universidade de Bolonha, identificou uma enguia fêmea e assim desfez o mito do cruzamento com a serpente. Em 1771, independentemente de Mondini, o cientista dinamarquês O. F. Muller, descobriu os ovários da enguia (Netboy, 1978). De acordo com o mesmo autor, em 1874, os testículos lobulados, foram descobertos pelo cientista austríaco Syrski, que lhes deu o nome, sendo a existência destes órgãos confirmada posteriormente por diversos autores: Jacoby (1880), Hermes (1880), Robin (1881) e Brock (1881). O cientista italiano do século XVIII, Spallanzani, afirmou na sequência das suas observações, que as enguias desciam dos rios para o mar no Outono e entravam nos rios na Primavera. Em 1856, Kaup descreveu uma espécie nova, com forma de folha, capturada no estreito de Messina, a que deu o nome de *Leptocephalus brevirostris*, e que parece ter sido o primeiro exemplar capturado de uma das fases de desenvolvimento da enguia europeia (Rodriguez e Alvarino, 1951).

Aproximadamente quarenta anos mais tarde (1897), dois italianos, Grassi e Calandruccio, realizaram uma importantíssima descoberta ao terem mantido em cativeiro um leptocéfalo e observando que, passados dois meses, este se tinha transformado numa enguia de vidro ou meixão. Esta descoberta veio demonstrar que as enguias desovam no mar e que o peixe anteriormente chamado *Leptocephalus brevirostris* não era mais do que um estado larvar da enguia. Apesar de todo este progresso, o local de desova da enguia permanecia um mistério.

Em 1904, Johannes Schmidt, um oceanógrafo dinamarquês, ao efectuar capturas de ovos de bacalhau a Oeste das ilhas Faroe com uma rede de plâncton capturou os primeiros leptocéfalos. Nos vinte anos seguintes, com um interregno durante a Primeira Guerra Mundial (1914 – 1918), este investigador seguiu o trilho destes peixes em forma de folha através do Oceano Atlântico, seguindo a grande curva da corrente do Golfo, pescando sucessivamente exemplares mais pequenos, até atingir o Mar dos Sargaços

(Netboy, 1978). Em 1922, concluiu que identificara o local de acasalamento, desova e morte dos adultos, a grande profundidade, tanto da enguia europeia como da americana, sugerindo que estas não mais regressariam aos lugares de crescimento (rios, lagos, charcos, etc.). Ficou, portanto, demonstrado que a desova da enguia Europeia se dá apenas num local – no meio do oceano (Mar dos Sargaços), longe da costa e numa zona tropical. Pensa-se que os antepassados da enguia do género *Anguilla* eram animais tropicais que passavam todo o seu ciclo de vida no mar.

1.1.2 Distribuição Geográfica

A enguia europeia apresenta uma ampla distribuição geográfica, considerando os locais de postura, crescimento e migração.

Após a metamorfose, as ilhas Canárias representam o ponto mais a Sul onde foram capturados espécimes da enguia europeia *A. anguilla*. É do consenso geral da comunidade científica que a distribuição a Oeste se estende até aos Açores. No entanto, alguns investigadores defendem que a distribuição a Oeste se estende até às Bermudas, que coincide com o limite Este da distribuição da enguia americana. No que diz respeito ao limite Este da distribuição da enguia europeia, o Mar Negro parece reunir o consenso de grande parte dos investigadores. Embora existam relatos por parte de vários autores que referem ter a enguia Europeia sido encontrada na costa Oeste do Mar Vermelho (Schmidt, 1925; *in* Tesch, 1977) ou em várias zonas do rio Volga (Schmidt, 1909b; *in* Tesch, 1977), essas ocorrências parecem ser com grande probabilidade consequência de uma intervenção humana. Por exemplo, a construção do Canal do Suez, no que diz respeito ao Mar Vermelho, e a rede de canais que liga o Báltico ao Volga, no caso da presença desta espécie no rio Volga. A Gronelândia e a Islândia são os limites Norte da distribuição como se pode ver na figura 1.1.1.

Concluindo, a enguia europeia é encontrada no Atlântico Norte, na Europa e no Norte de África. Os seus limites de distribuição a Norte são o Cabo Norte (Noruega) e a leste deste até à costa de Murmansk (Rússia) na baía de Kola (Rússia) e no rio Dvina do Norte (Rússia), a Sul a costa atlântica de Marrocos e as Canárias, a Leste toda a região do Mediterrâneo e o Mar Negro, a Oeste a Islândia, a Madeira e os Açores (Schmidt, 1909; Sorokin & Konstantinow, 1960; *in* Tesch, 1977).

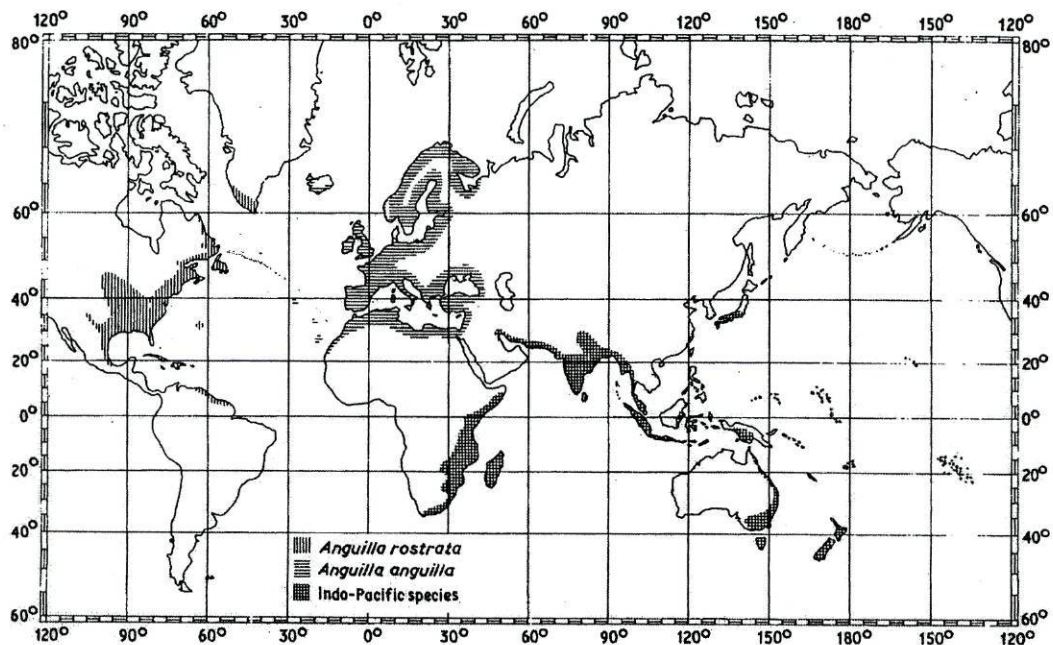


Figura 1.1.1 – Distribuição das diferentes espécies do género *Anguilla* (Tesch, 1977).

1.1.3 Ciclo Biológico

A enguia europeia é um peixe notável pelo seu ciclo de vida que inclui deslocamentos migratórios de grande amplitude, acompanhadas de metamorfoses: migração transatlântica dos leptocefalos, fase larvar de forma foliácea, anadromia do meixão e catadromia das enguias prateadas (Lecomte-Finiger, 1984).

A desova, como já foi dito anteriormente, dá-se no Mar dos Sargaços (figura 1.1.2) e, embora existam ainda muitas questões sem resposta, é do consenso geral que esta acontece de Março a Julho, a cerca de 400 – 500 m de profundidade, sendo a isotérmica de 17° C que, segundo Tesch (1977), define melhor a zona de postura. Trabalhos de Schmidt (1922, 1925) e outros mais recentes de diversos investigadores europeus, tais como Kracht e Tesch (1981), bem como de americanos como Kleckner e McCleave (1988), permitiram precisar os limites da área de postura da enguia europeia nas coordenadas 23 – 30° N e 48 – 74° W e também as suas características hidrocorrentológicas (Bessa, 1996). Uma vez que nunca foram capturados ovos ou adultos nas áreas de reprodução, ainda hoje, tal como na época de Johannes Schmidt, o local de postura é inferido pela presença das mais pequenas larvas de ambas as espécies.

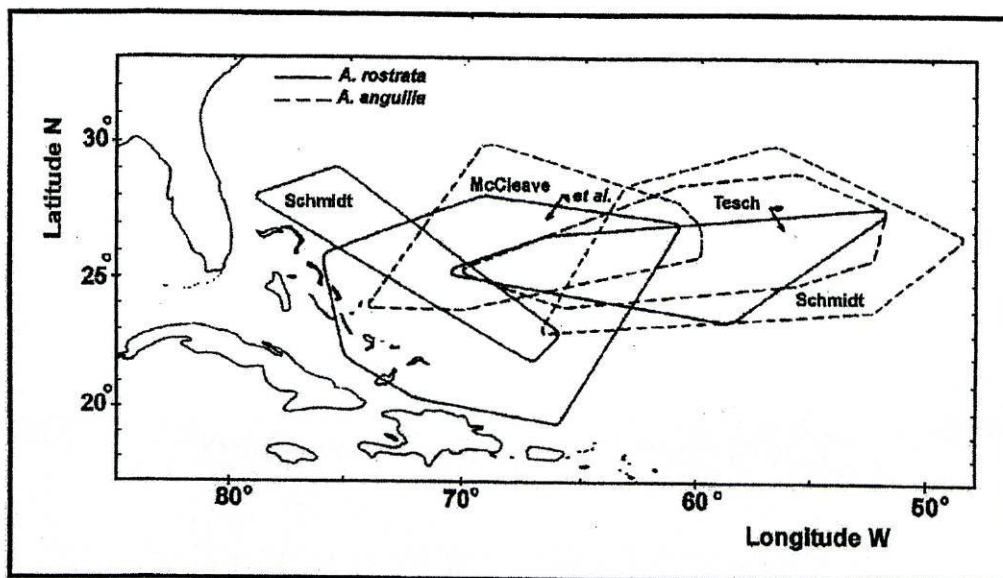


Figura 1.1.2 – Área de postura das enguias do Atlântico Norte (*A. anguilla* e *A. rostrata*) no Mar dos Sargãos, baseada na distribuição de leptocéfalos ≤ 10 mm (McCleave *et al.*, 1987).

A profundidade a que os ovos são depositados é desconhecida, tendo as larvas mais jovens sido encontradas entre 75 e 300 metros abaixo do nível médio do mar. Do ovo eclode uma pré-larva com cerca de 5 mm de comprimento que gradualmente se vai transformando em leptocéfalo, larva transparente, planctónica e carnívora com a forma de uma folha de oliveira. Arrastada no início pela corrente do Golfo e, seguidamente, pela deriva norte atlântica em direcção ao continente europeu, o leptocéfalo atinge o seu completo desenvolvimento quando alcança a plataforma continental europeia. Nesta altura, a larva tem aproximadamente 75 mm de comprimento (Jorge e Sobral, 1989). Em relação à duração desta viagem, as posições têm sido controversas. Alguns autores assumem que a migração dos leptocéfalos desde os locais de postura até à plataforma europeia é uma deriva passiva. É o caso de Johannes Schmidt (1922, 1925) cujos dados o levaram a formular a hipótese de que tal viagem durava um pouco menos de três anos. Boëtius e Harding (1985a) utilizando os dados do autor anteriormente citado, debruçaram-se novamente sobre a questão e chegaram à conclusão que a viagem duraria de 12 a 18 meses, opinião partilhada por McCleave (1993). Outros autores, como Tesch (1991) e Lecomte-Finiger (1992a), não aceitam a hipótese do transporte passivo, em parte porque as larvas que chegam ao Golfo da Biscaia são maiores do que as que

chegam ao estreito de Gibraltar, o que não estaria de acordo com a situação esperada, assumindo uma dispersão larvar dependente das correntes. Além disso, a grande abundância de larvas no Mar Mediterrâneo põe em causa qualquer deriva oceânica (Williams e Koehn, 1984). Finiger e Yahyaoui (1989) e Lecomte-Finiger (1991), atendendo ao número de anéis diários nos otólitos e à velocidade da corrente nas diversas zonas atravessadas pelos leptocéfalos, chegaram à conclusão que esta viagem teria uma duração inferior a um ano. Há cerca de dez anos, Lecomte-Finiger (1994) estudou os anéis diários dos otólitos de meixão que chega às costas europeias e concluiu que a migração até Gibraltar dura, em média, 216 dias (cerca de 7 meses), e que os animais que chegam ao Norte da Europa migram durante, aproximadamente, 286 dias (cerca de 9 meses), o que implica uma deslocação activa por parte do leptocéfalos.

O processo através do qual as larvas abandonam a área de postura é uma questão que ainda continua em aberto. Por exemplo, McCleave *et al.* (1998) referem que a migração dos leptocéfalos é passiva, mas admitem desconhecer o processo de transporte destas larvas entre os sistemas de correntes e a costa.

Os leptocéfalos, à medida que se aproximam da costa, mais precisamente quando atingem a plataforma continental a profundidades próximas dos 1000 metros, vão-se metamorfoseando em enguias de vidro ou meixão. O nome deve-se à sua total transparência e corresponde a um estado que vai desde a completa metamorfose do leptocéfalo até ao começo da pigmentação (Tesch, 1977). Esta metamorfose tem lugar principalmente no Outono (Deeler, 1985) e é acompanhada de modificações fisiológicas e morfológicas profundas. Os leptocéfalos perdem os dentes longos e frágeis, que são substituídos pelos dentes definitivos, desenvolvem a tiróide, o corpo torna-se cilíndrico, deixam de ingerir qualquer alimento, inicia-se a pigmentação a partir de uma simples mancha caudal e vão diminuindo de comprimento até cerca de 7 cm, ocorrendo uma redução de peso fresco da ordem dos 32 a 64%. Esta metamorfose, segundo Gault (1986), está ligada a uma mudança de comportamento e a uma variação de sensibilidade às correntes de maré e à água doce, e vai permitir a migração em direcção às águas interiores. Vários factores, em particular a temperatura, influenciam a velocidade da metamorfose (Tesch e Deeler, 1978; Lecomte-Finiger, 1984; Cantrelle, 1984). Após a metamorfose ocorrida na plataforma continental, as enguias de vidro migram em direcção às costas europeias. São encontradas em Setembro nas costas portuguesas, espanholas e francesas, enquanto que na baía de Heligoland (Alemanha), em Skagerak e Kattegat (Dinamarca) só são encontradas em Fevereiro, como se pode ver na figura 1.1.3.

Esta disparidade temporal na distribuição da enguia de vidro deve-se à distância da área de metamorfose. As enguias demoram mais tempo a chegar a zonas mais a leste do Atlântico do que zonas que estão em contacto directo com a corrente do Golfo. Para além da distância, a temperatura parece também contribuir para a disparidade de datas de chegada aos locais acima referidas. Assim, no Nordeste Europeu, as temperaturas poderão ser demasiado baixas para permitir a entrada das enguias antes de Fevereiro (Tesch, 1977). Gandolfi *et al.* (1984) são também da opinião que a temperatura é um dos factores mais importantes durante a migração das enguias para águas interiores. Segundo dados destes autores, a migração parece ser mais intensa quando as temperaturas do mar e do rio não têm uma diferença superior a 3-4° C.

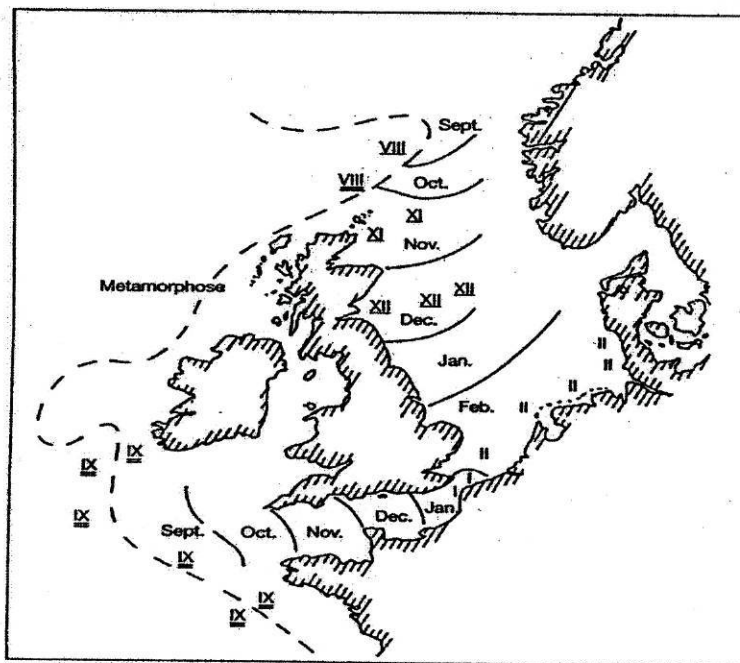


Figura 1.1.3 – Tempos prováveis de chegada da enguia europeia ao Nordeste da Europa (Tesch, 1977).

Uma vez em água doce, as enguias vão-se pigmentando e transformam-se em enguias amarelas que são carnívoras, alimentando-se activamente de insectos e outros animais pequenos, sendo a sua dieta similar à das trutas. Os machos, de uma forma geral, permanecem próximo dos estuários. As fêmeas, sempre de dimensões superiores às dos machos, sobem os rios (Tesch, 1977), distribuindo-se por estes e pelos lagos e poços, podendo até deslocar-se sobre sedimento húmido, de noite, uma vez que cerca de 60% da

sua respiração é efectuada através da pele e apenas cerca de 40% é efectuada pelas brânquias.

Em água doce e após cerca de 8 a 10 anos para os machos e 12 a 15 para as fêmeas, é atingida a maturação sexual. No último Verão das suas vidas em água doce, dá-se uma nova metamorfose como preparação para a sua migração para os locais de reprodução, durante a qual a enguia amarela se transforma em enguia prateada. Entre outras modificações morfológicas e fisiológicas, destacam-se as seguintes: aumento do diâmetro dos olhos, maior densidade de pigmento foto-sensível na retina, as barbatanas peitorais tornam-se mais lanceoladas, mudança de coloração e de espessura da pele, ocorre o início da maturação das gónadas, redução ou cancelamento da actividade alimentar e acumulação de grande quantidade de gordura no tecido subcutâneo com consequente paragem do crescimento. Enquanto que a quantidade de gordura na enguia amarela é de 5-15%, na enguia prateada representa 25-28% do seu peso total (Usui, 1974). Este aumento extraordinário de lípidos parece ser de grande importância para a sobrevivência das enguias durante a longa viagem de volta ao Mar dos Sargaços. A migração da enguia prateada em direcção ao mar tem lugar principalmente no Outono, particularmente em noites de lua nova e de chuvas abundantes. A maioria dos machos e fêmeas pequenas partem mais cedo do que as fêmeas de maiores dimensões. Os machos migram normalmente com 30-40 cm e as fêmeas com um tamanho igual ou superior a 55-65 cm (Sinha e Jones, 1975). Estes autores admitem que as fêmeas migram mais tarde devido à necessidade de acumular maiores quantidades de gordura necessários ao desenvolvimento das suas gónadas que são muito maiores do que as dos machos. Nesta altura da sua vida deixam de comer, não se alimentando durante a viagem de cerca de 6.500 km, da Europa até ao Mar dos Sargaços; daí a importância do aumento do teor de lípidos no organismo. O tubo digestivo entra em regressão morfológica e a pigmentação passa a castanha. Denominam-se então enguias castanhas. Embora nunca tenha sido observado, supõe-se que depois da postura os indivíduos morram, uma vez que não há indícios de um eventual regresso às águas continentais.

A enguia pode permanecer em águas doces para além de 35 anos. A migração pode ocorrer entre os 8 e os 25 anos (Netboy, 1978). Devido ao longo tempo de permanência nos rios e estuários, a enguia é considerada uma boa indicadora para monitorizar os níveis de organoclorados, metais pesados (Knights, 1991, 1994) e outros xenobióticos que acumulam nos tecidos animais.

A sua fase de vida continental (estuários, rios, lagoas e lagos) é bem conhecida, contrariamente ao que acontece com a fase marinha, que tem sido objecto de muitas especulações.

1.1.4 Importância Económica e Social

Para além do salmão e da truta, provavelmente não existe outro tipo de peixe com um mercado mundial tão vasto como a enguia, seja viva ou congelada (Tesch, 2003). A enguia europeia está sujeita à exploração pelo Homem desde que se transforma em angula e entra nos cursos de água continentais. A maioria das capturas de angulas destina-se à aquacultura. No entanto, são também utilizadas para repovoamento de locais onde se tornaram escassas ou desapareceram completamente em consequência de alterações diversas nos ecossistemas, com especial destaque para a construção de obstáculos físicos.

Em Espanha e países da América Latina, as angulas são consumidas como uma iguaria (numa espécie de sopa bem condimentada com alho), sendo também usadas na produção de cola (Tesch, 2003). Em países do Atlântico e do Mediterrâneo, a exploração de enguias amarelas é mais frequente, devido à grande procura e apreciação por esta fase do ciclo de vida. Em contrapartida, no Norte da Europa, aumentam os hábitos de consumo de enguias prateadas. Verifica-se, portanto, que as angulas são particularmente capturadas nos países do Sul da Europa, enquanto as enguias prateadas são mais procuradas nos países do Norte da Europa.

Na maioria dos países europeus, a pesca das enguias prateadas está restringida a rios e estuários. No entanto, nos estados em redor do Mar Báltico, as condições são diferentes. Assim, na Dinamarca, Alemanha e Suécia, as enguias em migração continuam a ser capturadas depois de saírem da água doce, constituindo uma percentagem importante entre as espécies pescadas. As capturas são efectuadas com armadilhas, colocadas ao longo das margens, em águas pouco profundas (6-7 m) (Schmidt, 1906; Westin, 1998).

A depleção das populações selvagens da enguia europeia e a deterioração dos habitats que ocupavam, levou a tentativas da sua produção em aquacultura. Assim sendo, esta actividade desenvolveu-se e tornou-se numa das principais formas de satisfazer a procura mundial, sobretudo o mercado japonês. Devido a esta actividade, a procura de

angulas e enguias recentemente pigmentadas aumentou consideravelmente, sendo estas retiradas da natureza em quantidades substanciais. Todavia, a aquacultura é neste momento a maior fonte de produção de enguias (McDowall, 1988; Gousset, 1992).

Os modelos de aquacultura da enguia europeia variam desde a muito industrializada, em regime intensivo nos países do Norte da Europa até ao regime extensivo no Sul da Europa, principalmente em Itália. Para além da aquacultura na Europa, a Ásia Oriental, primeiro Japão e mais recentemente a China, têm uma enorme indústria de anguicultura, utilizando também, para além de espécies locais, a enguia europeia. O Japão é o maior consumidor mundial de enguias (Gousset, 1992). Contudo, passou a importá-las de outros países asiáticos como a Tailândia, a Coreia do Sul e a China sendo este último considerado líder mundial de produção.

Em Portugal, existem locais onde a pesca de enguias tem uma importância económica considerável, como a lagoa de Stº André, Óbidos e a Ria de Aveiro. Na Lagoa de Stº André, algumas famílias dependem quase em exclusivo da pesca da enguia (Bernardo, 1990). Na Ria de Aveiro, até algum tempo atrás, existia uma indústria de conserva de enguia. A enguia europeia é tradicionalmente uma espécie explorada em Portugal, com um valor gastronómico elevado, principalmente quando frita ou na forma de ensopado. Estas preferências direccionam a procura e, conseqüentemente, a pesca. As dimensões mais apreciadas variam entre os 20 e os 25 cm para fritar, enquanto que para o ensopado são geralmente utilizadas enguias de dimensões superiores.

O meixão não era objecto de qualquer exploração importante em Portugal até à década de 40. Esta actividade teve início no Rio Minho, provavelmente devido à influência espanhola e ao igual direito de acesso aos recursos por parte das comunidades das duas margens. A captura desta fase da enguia foi a pouco e pouco, alastrando para outros rios, como o Lima e o Mondego, exercendo-se em alguns deles até dezenas de quilómetros da foz (Jorge e Sobral, 1989). A forte procura espanhola sempre absorveu o produto desta pesca, sendo a exportação efectuada principalmente através do norte do país. Apesar do mercado espanhol ser grande apreciador deste recurso piscícola e absorver a quase totalidade do produto de pesca, o negócio não termina no país vizinho. As enguias são depois reexportadas para outros países como a Itália, diversos países da América Latina, Holanda e Japão, a preços muito mais elevados do que os que são pagos aos pescadores portugueses.

Em Portugal, a pesca de exemplares de *Anguilla anguilla* tem apenas dois termos legislados: o da captura do meixão e o da captura de enguias adultas. Como peixe

migrador diádromo, a enguia europeia pode ser capturada em dois domínios sujeitos a legislação diferente: as massas de água doce e salobra sob a área de jurisdição da Direcção-Geral das Florestas (DGF) e os meios estuarinos e lagunares sob a jurisdição da autoridade marítima (DM). Esta espécie é pescada em Portugal em todos os estados de desenvolvimento (angula, enguia amarela e enguia prateada), embora exista uma variação, nalguns aspectos, entre as várias bacias hidrográficas (Domingos, 2003).

1.2 A TRUTA ARCO-ÍRIS *ONCORHYNCHUS MYKISS*

A truta arco-íris, *Oncorhynchus mykiss* é, segundo Crisp (2000), uma das nove espécies do género *Oncorhynchus* e a sua posição taxonómica é a seguinte:

Filo: Chordata
Subfilo: Vertebrata
Superclasse: Osteichthyes
Classe: Actinopterygii
Subclasse: Neopterygii
Divisão: Teleostei
Subdivisão: Protacanthopterygii
Ordem: Salmoniformes
Subordem: Salmonoidei
Família: Salmonidae
Género: *Oncorhynchus*
Espécie: *Oncorhynchus mykiss*

As diferentes espécies do género *Oncorhynchus* estão descritas na tabela 1.2.1.

Género	Espécie	Nome Comum
<i>Oncorhynchus</i>	<i>O. clarki</i> (Richardson)	
	<i>O. mykiss</i> (Walbaum)	Truta arco-íris
	<i>O. masou</i> Brevoort	Salmão-japonês
	<i>O. rhodurus</i> (Gunther)	
	<i>O. kisutch</i> (Walbaum)	Salmão-prateado
	<i>O. tshawytscha</i> (Walbaum)	Salmão-real
	<i>O. Keta</i> (Walbaum)	Salmão-cão
	<i>O. gorbuscha</i> (Walbaum)	Salmão-rosa
	<i>O. nerka</i> (Walbaum)	Salmão-vermelho

Tabela 1.2.1 – Membros do género *Oncorhynchus* (adaptado de Crisp, 2000).

1.2.1 Distribuição Geográfica

O género *Oncorhynchus* é encontrado naturalmente no Pacífico, na costa Oeste dos Estados Unidos, na costa Oeste do continente Asiático e a Norte de Taiwan. Está, também, presente na costa Leste da Sibéria (Crisp, 2000).

A truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) foi, juntamente com outras espécies como *O. clarki*, recentemente transferida do género *Salmo* para o género *Oncorhynchus* (Elliot, 1994). É uma espécie cuja distribuição natural está limitada à América do Norte e onde existem os dois tipos de espécimes normalmente encontrados em salmonídeos, residentes – vivem em água doce e anádromos – durante alguns anos no mar e voltam aos rios na época da desova. Esta espécie é fácil de propagar, tem um crescimento rápido e portanto goza de grande popularidade em aquacultura. Na Europa e outras zonas do mundo é frequentemente cultivada de forma intensiva e usada para fins gastronómicos e para fins lúdicos como, por exemplo, a pesca desportiva. A truta arco-íris foi introduzida, literalmente, em vários países de zonas tão dispersas como a Austrália, a Índia, o Quênia, o Malawi e a África do Sul. Na Europa, está espalhada por toda a parte como consequência de fugas durante o transporte dos animais e de fugas directas de pisciculturas.

1.2.2 Ciclo Biológico

O ciclo biológico da truta é comum aos outros salmonídeos. Começa em água doce quando a fêmea escolhe um local com água limpa, corrente e sedimento (geralmente gravilha ou cascalho) com granulometria e composição apropriada. Após a escolha do local, a fêmea escava uma espécie de “fosso” no sedimento através de uma série de movimentos repetitivos que envolvem virar-se de lado, em relação ao leito do rio, e mover-se exageradamente como se estivesse a nadar. Desta forma, cria uma sucção que levanta as partículas de sedimento do leito do rio. Estas partículas são transportadas pela corrente rio abaixo. Portanto, forma-se um fosso no leito do rio com uma “cauda” de partículas de sedimento que se amontoam uns centímetros mais abaixo. De tempos a tempos, a fêmea aninha-se no fosso e baixa a barbatana anal. Este comportamento, serve aparentemente para testar a corrente da água no fundo do fosso. A fêmea pode considerar as condições no fosso pouco satisfatórias, abandonar o local e procurar outro. Quando um fosso é feito num local que a fêmea acha apropriado, deposita os ovos; ao mesmo tempo, o macho (ou machos) liberta(m) o esperma (“milt”) em cima deles. A fêmea cava então outro fosso, imediatamente acima do primeiro, e o sedimento deslocado na realização deste cobre os ovos colocados no primeiro. Este processo é repetido várias vezes, sendo o local onde são depositados os ovos denominado “redd” (figura 1.2.1). Durante a época de postura uma fêmea pode formar um ou mais “redd”, mas o mais comum é um por fêmea.

Pensa-se que a presença e comportamento de um macho incentiva a fêmea a escavar o fosso e a pôr os ovos. No entanto, a presença do macho não é necessária para o desenrolar do processo. Crisp e Carling (1989) observaram uma truta fêmea durante várias horas a construir o fosso e efectuar a postura de ovos, tendo o macho surgindo depois de todo o processo. O “redd” é normalmente deixado ao cuidado do macho dominante que defende o local e a fêmea contra outros machos, geralmente menores, que também procuram uma fêmea para copular. O repetido e quase constante assédio por parte de outros machos leva a interrupções e complicações frequentes das interacções entre a fêmea e o macho dominante. A maioria desses encontros entre machos são resolvidos através de ameaças e encontros de um peixe ao outro. No entanto, Jones e Ball (1954) afirmam ter observado machos a morderem-se um ao outro e machos mais pequenos a serem agarrados pela cauda e sacudidos pelos machos maiores. Depois de terminado todo o processo de postura, os machos abandonam o local de postura e procuram fecundar outras fêmeas.

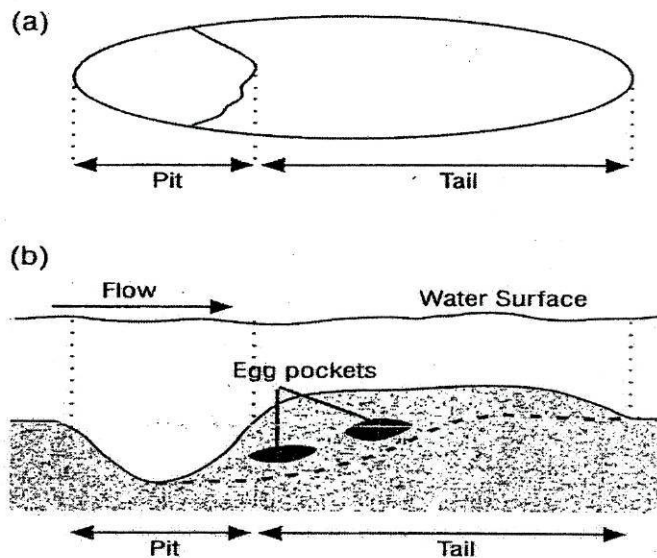


Figura 1.2.1 – Seção longitudinal do “redd”. O tracejado marca os limites aproximados do sedimento remexido. “Pit” – Fosso; “Tail” – Cauda (adaptado de Crisp, 1993a).

A parte inicial do ciclo biológico da truta passa-se soterrada no sedimento (gravilha) sendo esta fase designada por fase “intergravel”. Estes aspectos embrionários estão bem estudados, uma vez que podem ser seguidos em cativeiro. A duração desta fase é determinada, em grande parte, pela temperatura. A primeira diferença óbvia acontece quando os olhos do embrião em desenvolvimento se tornam visíveis através da casca do ovo. O ovo eclode e, nessa altura, o embrião é denominado “alevim”. Este permanece enterrado e à medida que cresce consome o saco vitelino como fonte de nutrientes. Quando o saco vitelino está praticamente consumido, o alevim emerge do fosso, enche a bexiga natatória de ar para obter uma flutuabilidade neutra e começa à procura de alimento externo. Isto marca o fim da fase “intergravel” e o jovem peixe é então denominado “fry”.

Os “fry” de truta foram observados a emergir do sedimento à noite, a descer rapidamente o rio e a definir territórios (Moore e Scott, 1988). Portanto o “fry” rapidamente deixa o “redd” e define “estações de alimento”, estabelecendo e defendendo um território. A partir desse momento é denominado “parr”. A truta permanece no rio como “parr” durante um ano ou mais. A duração desta fase é geralmente mais curta em rios das zonas mais a Sul de distribuição destes animais do que a Norte, uma vez que o crescimento dos juvenis tem tendência para ser mais rápido no Sul. Depois da fase

“parr”, o peixe torna-se um “smolt”. A idade a que o “smolting” acontece parece estar ligado, pelo menos em parte, ao tamanho dos peixes. Costuma ocorrer quando o animal tem entre 12,5-17,0 cm, sendo caracterizado por perda da cor acinzentada e das marcas “parr” e pelo escurecimento das barbatanas peitoral e caudal (figura 1.2.2). Os “smolt” descem o rio em direcção ao mar (Crisp, 2000). Kennedy (1982) concluiu que as trutas se movimentam para águas mais profundas à medida que crescem.

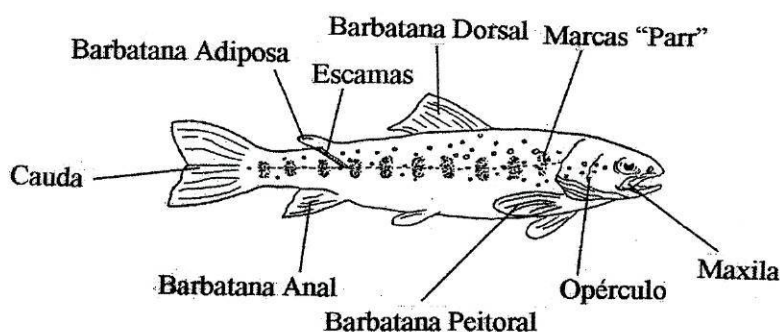


Figura 1.2.2 – Diagrama das características do juvenil de truta (Crisp, 2000).

Os “smolt”, passados vários anos, regressam ao rio para se reproduzirem, existindo no entanto casos de alguns machos que voltam ao rio para se reproduzir no mesmo ano em que migraram para o mar.

A territorialidade das trutas já foi anteriormente referida. Todavia, esta não acontece em todas as fases do seu ciclo de vida. Como “smolt”, as trutas deixam de ser agressivas e geralmente agregam-se em cardumes. Estudos recentes, efectuados por Huntingford e De Leaniz (1997), indicam que certos comportamentos relacionados com territorialidade e agressividade, sinónimo de sucesso quando existe competição por alimento em zonas de densidade moderada, podem ser diferentes em zonas de menor densidade, com circunstâncias mais complexas e imprevisíveis.

Existe uma tendência na maioria das espécies de *Oncorhynchus* para voltarem ao rio de origem afim de se reproduzirem. Porém, uma minoria de peixes acaba por se reproduzir no rio errado, quiçá por não conseguir aceder ao rio de origem ou por eventuais falhas nos seus sistemas de orientação. Esta minoria é muito importante na medida em que contribui para o alargamento da distribuição geográfica da espécie, estabelecendo populações em zonas que só recentemente se tornaram acessíveis ou com condições ideais para serem utilizadas pelos peixes, podendo também repovoar zonas que

anteriormente já continham a espécie mas que por algum factor a perderam (Quinn e Tallman, 1987; Thorpe, 1994). Na truta arco-íris existem espécimes anádromos e espécimes residentes (machos e fêmeas) que atingem a maturidade sem migrarem para o mar.

No seu habitat natural, a truta é um predador e durante a sua vida em água doce consome uma grande variedade de presas, incluindo animais aquáticos e terrestres, tanto submersos como à superfície. De modo geral são oportunistas, embora certos indivíduos ou grupos se possam especializar num certo tipo de alimento. Os juvenis de truta comem praticamente tudo o que tenham capacidade de engolir. No período em que começam a nadar activamente, alimentam-se de pequenos animais como microcrustáceos e minúsculas larvas de insectos (*e.g.* Chironomidae e Ephemeroptera). À medida que crescem, tanto o tamanho como a variedade das presas aumenta, passando a incluir vertebrados: peixes, anfíbios e pequenos mamíferos. Evidentemente, esta nova dieta proporciona um aumento considerável do crescimento. No Inverno, é comum os juvenis mudarem a sua estratégia de alimentação e passarem a procurar as presas à noite, proporcionando-lhes esta mudança uma maior protecção contra predadores, diminuindo em contrapartida o número de presas capturadas e por conseguinte consumidas (Metcalf e Thorpe, 1992).

O crescimento durante a fase marinha é rápido e excede os valores previstos para a fase de rio. A dieta da truta no mar inclui uma variedade de organismos. A galeota menor ou sandilho-menor (*Ammodytes tobianus* L.) é dos animais mais consumidos, juntamente com outros peixes como o arenque (*Clupea harengus* L.) e a espadilha (*Sprattus sparttus* L.). A dieta inclui também vários crustáceos e poliquetas (Pemberton, 1976b; Fahy, 1983, 1985).

Concluindo, este género demonstra uma enorme plasticidade no seu ciclo de vida tanto entre espécies como dentro da mesma espécie. Esta característica, talvez seja o segredo para o sucesso deste grupo de peixes, considerado relativamente primitivo.

1.2.3 Importância Económica e Social

De acordo com Crisp (2000), a importância dos salmonídeos como recurso para a sociedade, tanto em termos económicos como sociais, pode ser, no mínimo, considerada segundo três perspectivas.

A primeira perspectiva pode ser descrita como “moral, estética e política” e está relacionada com o facto dos salmonídeos necessitarem de água de muito boa qualidade, sendo o seu bem-estar num determinado rio indicador de uma boa conservação dos recursos fluviais. A presença ou ausência de salmonídeos é geralmente notado de forma imediata pelo público que aprecia observar grandes salmonídeos a transpor obstáculos, espécimes mais jovens a surgirem à superfície, ou simplesmente por saberem que estão presentes salmonídeos num determinado rio. O valor moral, estético e político e a importância dos salmonídeos é por si só difícil de definir e avaliar na sociedade.

A segunda perspectiva está relacionada com o valor social dos salmonídeos como recurso para a pesca desportiva. Este recurso é difícil, para não dizer impossível de quantificar. No entanto, a sua importância pode ser mencionada e depreendida citando orçamentos e investimentos nesta área. Por exemplo, no Reino Unido um inquérito realizado pela “National Rivers Authority (1994a)” chegou à conclusão que existiam cerca de 841 000 praticantes de pesca desportiva de salmonídeos em Inglaterra e no País de Gales.

A terceira e última perspectiva é financeira. Uma estimativa realizada por Radford *et al.* (1991), que analisou os lucros obtidos, no ano de 1988, pela pesca desportiva e comercial de salmonídeos em Inglaterra e no País de Gales, chegou à conclusão que os valores dos dois tipos de pesca são importantes nestes países e que em termos de lucros a pesca desportiva é mais valiosa do que a pesca comercial. Os valores ascenderam a 75,0-77,5 milhões de Libras, sendo cerca de 72 milhões derivados da pesca desportiva e cerca de 3,0-5,5 derivados da pesca comercial. Contudo, o mesmo estudo chegou à conclusão que os gastos na pesca desportiva de trutas no mesmo ano ascendia às dezenas de milhões de libras. No entanto, estes números não devem ser tomados como verdades empíricas e servem apenas para dar uma ideia da importância da pesca desportiva destes animais. É de realçar que os dois tipos de pesca têm uma importância local considerável na criação de empregos, uma vez que estas zonas de pesca recreativa se situam em áreas de precariedade económica.

Em Portugal, a importância económica e social dos salmonídeos, em particular da truta arco-íris, advém sobretudo da indústria de aquacultura. A truta arco-íris é cultivada em água doce desde 1890. Inicialmente, a truta arco-íris foi cultivada com a finalidade de povoamento de lagos e de rios, visando sobretudo a pesca desportiva. Mais tarde, passou também a ser cultivada para consumo humano, tendo sido construída, em 1968, a primeira piscicultura privada, em Paredes de Coura. Esta unidade mantém-se, ainda hoje, não só como a maior truticultura mas, também como a maior piscicultura industrial do país (500-600 toneladas/ano) (Sousa Lopes *et al.*, 1999). No entanto, a nível nacional, este é um sector ainda pouco desenvolvido. Por exemplo, a aquacultura apenas representa cerca de 2% do pescado capturado e produzido (5,3 mil toneladas em 1996), o que significa que a captura é muito inferior às necessidades do consumo e daí a necessidade de se recorrer à importação. Para se ter uma ideia da dimensão da aquacultura relativamente a outros países, Portugal e a Alemanha têm praticamente a mesma dimensão do ponto de vista da produção de pescado, mas na Alemanha cerca de 20% é produzido em aquacultura enquanto que em Portugal, como já foi referido anteriormente, a aquacultura representa apenas 2% do pescado capturado e produzido. A Irlanda e a Holanda têm uma produção duas vezes superior à nossa, produzindo respectivamente 7% e 16,1% em aquacultura. A Itália pesca 3 vezes mais do que Portugal e 36% da truta consumida provém de aquacultura (Moniz, 1999).

1.3 TÉCNICAS DE DRAGAGEM E SEUS EFEITOS EM ECOSISTEMAS AQUÁTICOS

O tipo de draga e a técnica a usar dependem de vários factores incluindo o tipo de material a ser dragado, a quantidade desse material, a profundidade a que ele se encontra, o seu grau de contaminação e o ambiente físico do local da dragagem (ventos, marés, correntes) (Rochon, 1985). Os dois tipos de dragas mais comuns são as dragas mecânicas e as dragas hidráulicas ou de sucção. Existem ainda outros tipos de dragas menos utilizados como, por exemplo, o “Jetsed” ou técnica de injeção.

No caso das dragas mecânicas (figura. 1.3.1), os sedimentos podem ser despejados numa espécie de poço, numa barca ou em terra. As perdas de material por deposição ou por deficiente encerramento do dispositivo que extrai os sedimentos são

comuns no caso de sedimentos finos não coesivos, sendo o rendimento da draga melhor para sedimentos coesivos. Estas dragas são utilizadas sobretudo em zonas de difícil acesso (*e.g.* bermas de cais, bacias estreitas) e podem trabalhar a uma profundidade de 25 a 30 metros. De modo geral, este tipo de dragas é usado em projectos de pequena dimensão. A sua principal desvantagem é a excessiva turbidez que provocam, sendo a reduzida interacção entre sedimento e água, a sua principal vantagem.

Nas dragas hidráulicas ou de sucção, uma mistura de água e de sedimento (cerca de 15% a 20% de sedimento e 80% a 85% de água) é aspirada através de um tubo e depois depositada num poço, numa barca ou em condutas que a reencaminham para um depósito. O volume do poço pode chegar aos 23 000 m³. Estas dragas não trabalham a uma profundidade superior a 30 metros. O primeiro tipo de draga hidráulica é constituído por engenhos que trabalham de forma estacionária, ou seja, ancoradas. Estas dragas se não forem auto transportadoras, despejam os sedimentos em barcas ou em condutas flutuantes com ligação a uma área de depósito (figuras 1.3.2a e 1.3.3). O outro tipo de draga de sucção trabalha em movimento. A draga vai aspirando o sedimento à medida que avança e deposita-o em poços para ser despejado, após transporte, através da abertura de válvulas no fundo do poço ou abertura da própria draga (figuras 1.3.2b e 1.3.2c). A aspiração de sedimentos pelas dragas de sucção necessita também de aspiração de uma quantidade considerável de água: dez a doze vezes superior em volume e cerca de oito vezes mais em peso do que no caso das dragas mecânicas. Aquando da decantação dos sedimentos no poço, a água em excesso regressa ao meio; esta constitui a fonte de matéria em suspensão mais importante no caso das dragas por sucção.

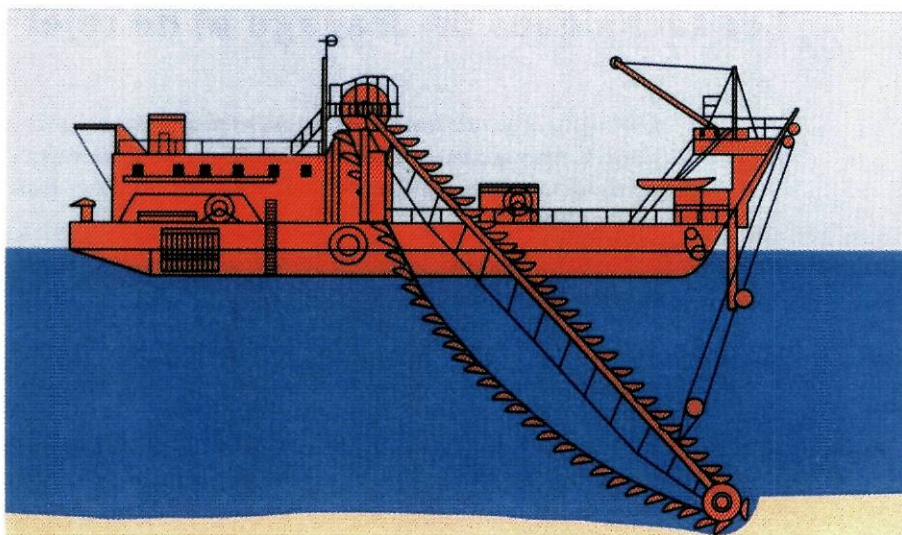
O “jetsed”, consiste em colocar os sólidos em suspensão através de um jacto de água ou de ar comprimido; o sedimento pode então ser disperso pelas correntes (figura 1.3.4) (Bassoullet e Guillaud, 1999). Os impactos físicos causados pela extracção de inertes são, geralmente, mais directos e mais facilmente avaliados neste tipo de dragas. A avaliação dos mesmos não necessita de testes laboratoriais muito elaborados e pode ser efectuada através da análise das características físicas do sedimento e do meio que o rodeia. Em muitos casos, este impacto pode ser muito diminuído por escolha do local e altura do ano mais apropriadas para realizar a extracção.

Durante a extracção, os sedimentos encontram-se em suspensão criando um efeito físico óbvio – descoloração da água e redução da penetração da luz. Embora as partículas mais pesadas como areia e pedaços de lama depositem depressa, as partículas finas, como vasa ou argila, permanecem em suspensão por longos períodos e são transportados do

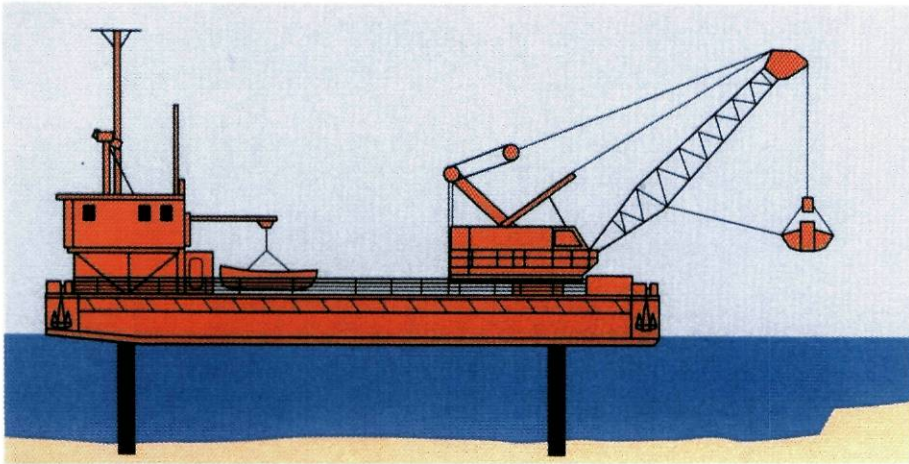
local de extracção para outros por correntes locais (Mackin, 1961; Oertel, 1975). Este problema torna-se mais grave pelo facto da maioria dos poluentes estar associado aos sedimentos mais finos. Assim, do mesmo modo que as partículas finas, os poluentes podem ser transportados para outros locais e afectar outros organismos, entrar nas cadeias tróficas e tornarem-se perigosos para o homem.

A topografia do leito do estuário altera-se quando há dragagens. A draga cria ou aprofunda canais no local de dragagem e pode acumular sedimento, formando elevações consideráveis de terreno acima do solo circunjacente do local de descarga. Estas modificações físicas podem alterar a hidrografia existente. As correntes de maré podem ser canalizadas pelos canais, alterando os seus padrões normais de circulação, ou desviadas pelos montes de sedimento que funcionam como barreiras físicas. A redistribuição de sedimentos que resulta da mudança dos padrões de circulação nem sempre é previsível. O canal criado pelas dragagens pode aumentar a elevação criada pela acumulação de sedimentos ou pode provocar erosão da mesma. Esta última parece ser a regra em estuários do Texas (EUA) estudados por Bastian (1974). Com uma excepção, praticamente não houve alteração do leito do rio nestes locais. Vários estudos foram já realizados acerca dos efeitos hidrodinâmicos indesejáveis que a construção de canais provoca. Kaplan *et al.* (1974) observaram que os padrões de transporte da água em Gooseneck Creek, Long Island Sound (EUA) foram alterados depois de serem realizadas dragagens.

a



b



c

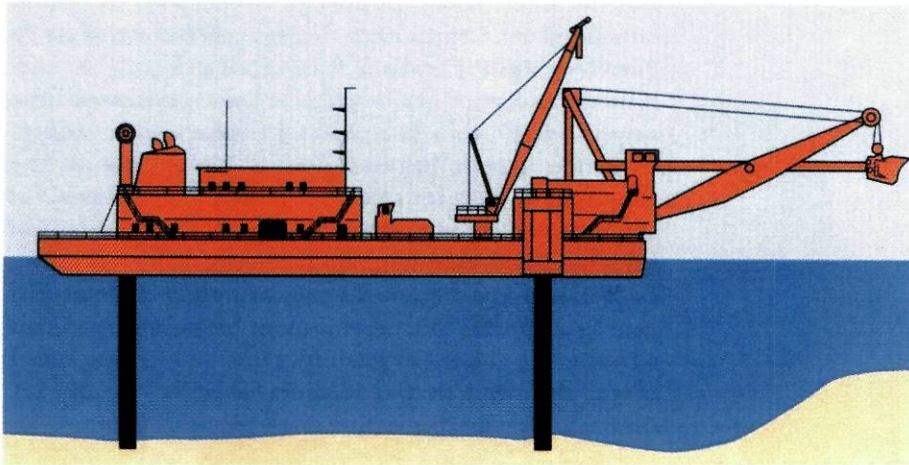
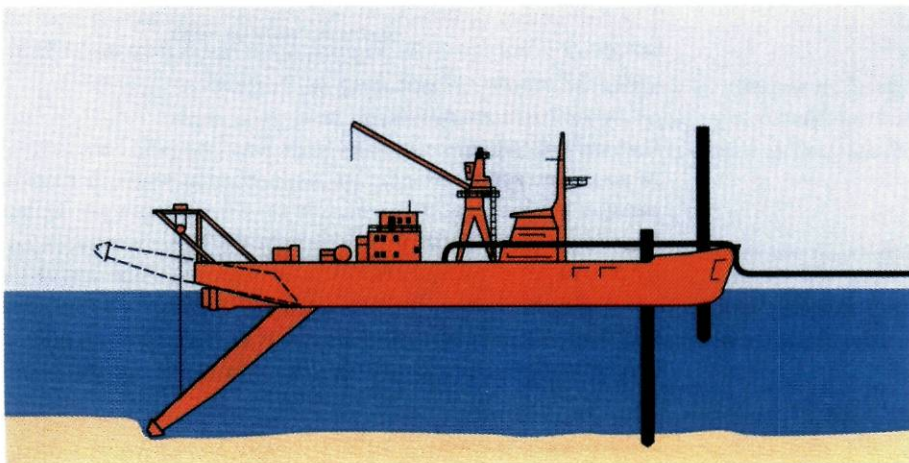
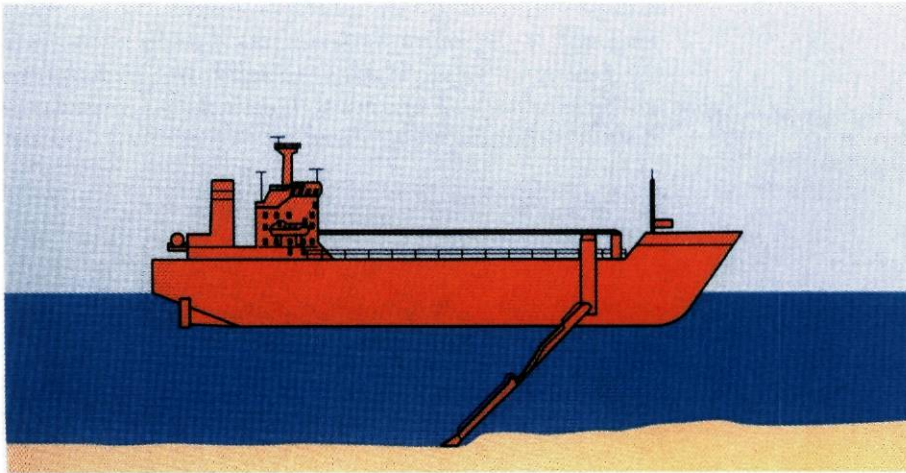


Figura 1.3.1 – Três tipos de dragas mecânicas (Bassoullet e Guillaud, 1999).

a



b



c

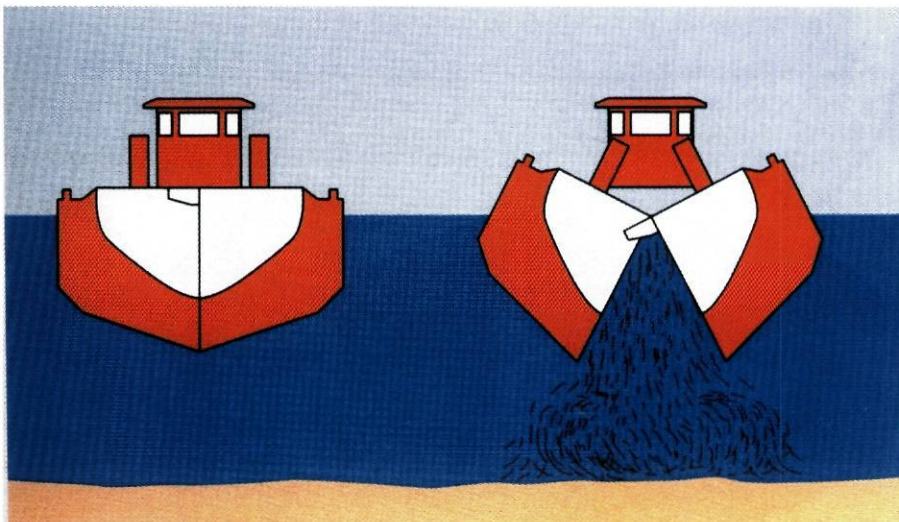


Figura 1.3.2 – Três tipos de dragas hidráulicas (Bassoullet e Guillaud, 1999).

Depois de um canal ter sido dragado no rio Savannah (EUA), água salgada deslocou-se para esse novo canal e instalou-se um fluxo de sedimento em direção à margem. Não só o sedimento que antes era transportado para o mar estava preso no estuário mas, provavelmente, também sedimento vindo do mar era arrastado, pelo fundo, para o interior do estuário (Simmons, 1965).



Figura 1.3.3 – Draga de sucção estacionária com conduta de rejeição ligada à margem (Bassoullet e Guillaud, 1999).

As mudanças das propriedades mecânicas dos sedimentos nos locais de dragagem raramente foram estudadas. Numa dessas raras exceções, na baía de Coos, Oregon, Slotta *et al.* (1973) observaram um aumento na granulometria do sedimento no local de dragagem e concluíram que esta diminuição era devida às dragagens que colocavam o material em suspensão. A realização de repetidas dragagens no mesmo local aumenta o potencial para a perda de partículas mais finas, as quais são mais facilmente transportadas pelas correntes. A constante perda e deposição de sedimentos durante as dragagens levanta dois problemas importantes: o reabastecimento do canal dragado e, (no caso dos sedimentos conterem poluentes), a contaminação das zonas adjacentes. A redistribuição destes sedimentos depende da sua deposição e dos mecanismos de transporte (correntes, marés) que actuam nos locais de dragagem (Oertel, 1975). Vários autores descreveram a erosão dos sedimentos e o seu transporte para longe do local de dragagem ou descarga. Por exemplo, Hellier e Kornicker (1962), numa baía do Texas, observaram deposição de sedimentos a 0,8 km do local de dragagem e a acerca de 2,4 km do local onde estes tinham sido acumulados. Os investigadores concluíram que a ondulação tinha sido a principal responsável pela erosão do monte de sedimentos.

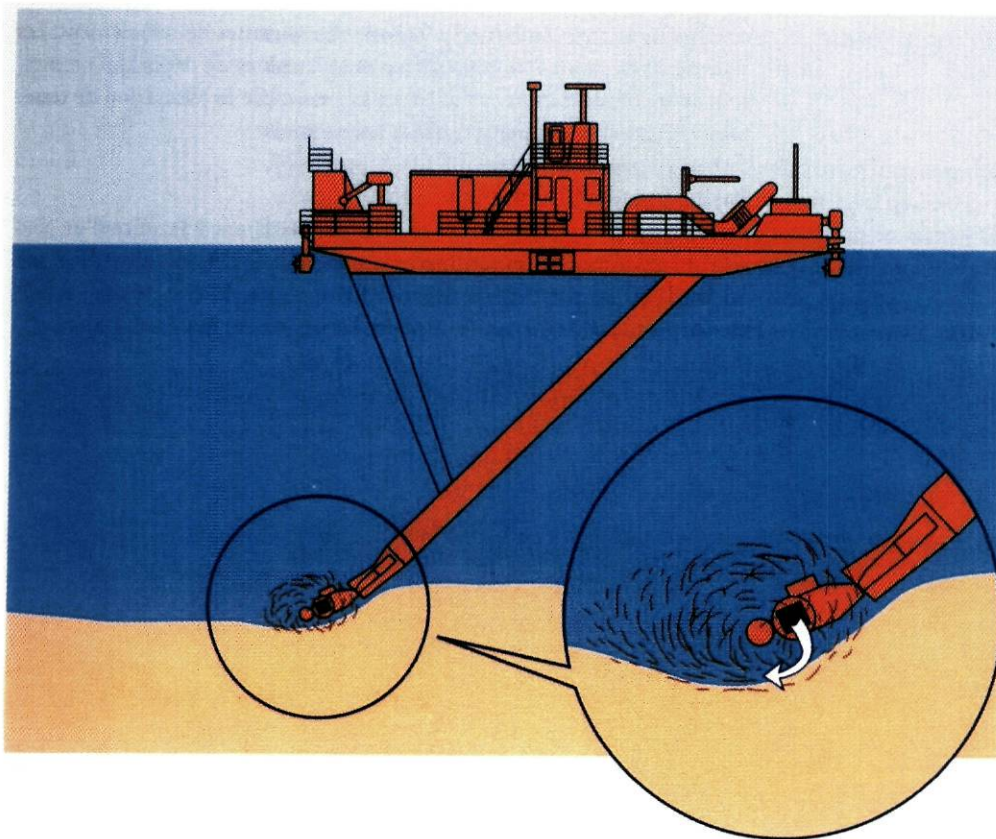


Figura 1.3.4 – Técnica de dragagem “Jetsed” (Bassoullet e Guillaud, 1999).

Oertel (1975) estudou as deslocções a longo prazo de acumulações de sedimento provenientes das dragagens, no estuário do rio Savannah. Os sedimentos foram colocados numa área onde as correntes do fundo não eram suficientemente fortes para os deslocar. No entanto, durante um período de três meses várias tempestades vindas do Atlântico provocaram a deslocação de grandes quantidades de sedimento. Oertel observou que durante esses três meses, uma elevação de sedimento, com mais de um milhão de m^3 , se moveu 0,5 km. Passado algum tempo, os sedimentos consolidaram-se conseguindo resistir à erosão. Têm sido atribuídas as seguintes razões para a ocorrência de deslocações de sedimentos depositados: transporte dos sedimentos em suspensão pelas correntes do local onde foram despejados aquando da descarga, erosão dos sedimentos imediatamente após à descarga e perda de água durante a consolidação dos mesmos.

A extracção de sedimentos produz também alterações químicas na água, porque, normalmente, os sedimentos estuarinos de superfície são oxidados e à medida que se

avança para camadas mais profundas, estes vão-se tornando reduzidos; os sedimentos mais profundos, reduzidos, adquirem afinidade por oxigénio quando são expostos ao ambiente aeróbio e tornam-se oxidados. Assume-se também que os constituintes químicos dos sedimentos de superfície se encontram em equilíbrio com a água, enquanto os constituintes químicos dos sedimentos de camadas mais profundas não o estão (Keeley e Engler, 1974). Como os sedimentos mais profundos são misturados com a água durante as dragagens, o potencial para a circulação dos seus constituintes químicos aumenta. Os sedimentos profundos, que ficam expostos depois da dragagem, podem ser oxidados alterando-se as suas propriedades físicas e químicas quando estes se misturam com a água.

As concentrações de oxigénio dissolvido (OD) nas redondezas dos locais de dragagem e descarga têm um efeito importante na forma química, solubilidade e mobilidade dos constituintes químicos do material dragado. As dragagens e descarga dos materiais em excesso causam frequentemente reduções temporárias na concentração de oxigénio dissolvido (OD) da coluna de água nos locais de extracção e descarga (Maurer *et al.*, 1974). Há ocasiões em que a concentração de OD não sofre alterações (May, 1973b), existindo também situações em que as concentrações de OD aumentam (Wakeman, 1974). Em Arthur Kill, Nova Jersey (EUA), Brown e Clark (1968) observaram reduções de OD entre 16 e 83% abaixo das concentrações registadas antes da dragagem. Estes autores sugeriram que esta redução era causada pelos sedimentos em suspensão que diminuía a penetração da luz solar e conseqüentemente diminuía a actividade fotossintética. Em contrapartida, Windom (1973) registou um aumento de OD durante dragagens em alguns estuários da Geórgia (EUA), concluindo que a amónia libertada pelos sedimentos em suspensão estimulava a fotossíntese e a produção de oxigénio. Estas duas observações podiam ser conciliadas e justificadas se tivesse sido demonstrado que a produção primária no estuário de Nova Jersey era limitada pela luz, enquanto nos estuários da Geórgia era limitada pelos nutrientes. Estes são os factores mais importantes que influenciam a concentração de OD na água. Existem outros, mas a sua documentação é escassa, existindo em muitos casos apenas especulação.

Os processos pelos quais poluentes como metais pesados e pesticidas se transferem do sedimento para a água são complexos e não estão totalmente compreendidos. Contudo, foram já identificados alguns factores que parecem ter um papel importante nesses processos: conteúdo de argila, fracção orgânica, potencial redox e pH do sedimento, espécies de bactérias presentes e os ciclos do ferro e do enxofre. As

partículas de argila são importantes devido à sua capacidade de troca de cátions. A concentração de matéria orgânica aumenta grandemente em relação ao seu valor dissolvido quando está ligada a partículas inorgânicas de argila (Carricker, 1967). Enquanto a matéria orgânica existente nos sedimentos se decompõe, o oxigênio é consumido e o potencial redox e o pH diminuem (Pratt e O'Connor, 1973). Os impactos químicos dos sedimentos em excesso no ambiente do local onde são descarregados (mudanças no conteúdo orgânico, oxigênio dissolvido, pH e potencial redox) têm um efeito significativo, a longo prazo, na libertação de poluentes do sedimento dragado para a coluna de água. O estado físico-químico de substâncias contaminantes presentes nos sedimentos também influencia a sua transferência para a água (Lee e Plumb, 1974). Assim, a possível libertação de contaminantes de sedimentos poluídos não pode ser unicamente baseada na concentração total de substâncias presentes nos sedimentos dragados (Morton, 1976), devendo também ser utilizados modelos que possam simular transferências entre compartimentos ambientais e métodos biológicos que permitam avaliar potenciais efeitos a nível das comunidades.

1.4 OBJECTIVOS E CRITÉRIOS DE EFEITO UTILIZADOS NESTE ESTUDO

Como já foi referido, o objectivo central deste estudo foi avaliar os efeitos letais e subletais de sedimentos em suspensão em duas espécies de peixes importantes no litoral Norte de Portugal. Para tal, utilizou-se um sistema de exposição desenhado propositadamente para o efeito, que será descrito na secção 2.4.

Neste projecto foram utilizados como critérios de efeito nos ensaio efectuados a mortalidade e enzimas-chave em processos fisiológicos importantes para a sobrevivência do indivíduo e da população. Estas enzimas têm sido muito utilizadas como biomarcadores em testes de toxicidade e em estudos de biomonitorização para avaliação de exposição e/ou efeito de poluentes. No entanto, não encontramos na literatura referências à utilização destas enzimas para avaliar efeitos de materiais em suspensão.

1.4.1 Acetilcolinesterase (AChE)

A acetilcolinesterase pertence à família das colinesterases, as quais foram classificadas por Aldridge (1953; *in* Peakall, 1992), como esterases do tipo B, por serem inibidas por compostos organofosforados. É também conhecida como “verdadeira colinesterase” ou colinesterase específica e é importante no funcionamento do sistema nervoso quer de vertebrados quer de invertebrados. Esta enzima é principalmente encontrada no tecido nervoso, em particular no cérebro, no músculo, nos glóbulos vermelhos e plasma de alguns vertebrados, onde a sua função é desconhecida. No caso do sistema nervoso, a acetilcolinesterase é responsável pela degradação do neurotransmissor acetilcolina libertado na fenda das sinapses colinérgicas, após a passagem do impulso nervoso (Thompson, 1999). A inibição desta enzima resulta numa acumulação de acetilcolina na sinapse e numa estimulação prolongada dos receptores pós-sinápticos, podendo provocar a morte.

Esta enzima é inibida por alguns xenobióticos, em particular por pesticidas organofosforados e carbamatos, pelo que tem sido muito utilizada como biomarcador específico para estes agentes. No entanto, a actividade desta enzima pode também ser diminuída em certas condições fisiológicas. Por este motivo, foi utilizada neste trabalho como critério indicativo de efeitos a nível do sistema nervoso.

1.4.2 Glutationa S- transferase (GST)

As Glutationa S- transferases (GST) são uma família importante de enzimas envolvidas na biotransformação de compostos endógenos e xenobióticos (Coles e Ketterer, 1990). Têm um papel importante na destoxificação e excreção de xenobióticos – catalisando a conjugação do tripeptídeo glutatona (GSH) com o xenobiótico na fase II do processo de biotransformação, promovendo a sua eliminação do organismo (Leaver *et al.*, 1992). As GST são essenciais na destoxificação de diversos substratos eletrofílicos e produtos de stress oxidativo, quer endógenos quer xenobióticos. A maioria das GST são citosólicas e estão agrupadas em classes (Alfa, Mu, Pi e Teta), de acordo com a especificidade do substrato, sequência proteica e outras propriedades. As GST foram também identificadas em algumas espécies de peixes e caracterizadas. Embora não exista nenhum esquema de classificação para as GST de peixes, existem indícios que sugerem

que as GST de peixes funcionam de forma similar à dos mamíferos (Armknrecht *et al.*, 1998).

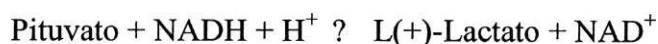
Nos mamíferos, a indução de GST específicas ocorre após exposição a diversos agentes indutores como hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA) e compostos bifenilicos policlorados (PCB).

Finalizando, as GST catalizam a conjugação do tripeptídeo GSH para os centros electrofílicos dos compostos lipofílicos, aumentando assim a sua solubilidade e ajudando a sua excreção da célula. São também responsáveis pela degradação de produtos de macromoléculas durante períodos de stress oxidativo. Portanto, as GST têm um papel vital na protecção dos tecidos contra stress e danos oxidativos (Vontas *et al.*, 2001).

Neste estudo, a actividade desta enzima foi utilizada como critério indicativo do funcionamento das brânquias.

1.4.3 Lactato desidrogenase (LDH)

Esta enzima existe no citoplasma das células, sendo fundamental para a manutenção do processo de glicólise em condições anaeróbicas. Esta enzima é responsável pela catalisação da redução reversível de piruvato a lactato (Diamantino *et al.*, 2001):



Nos mamíferos, a LDH existe em cinco formas moleculares diferentes (isoenzimas). Estas, embora tenham pesos moleculares similares, diferem nas suas propriedades catalíticas e imunológicas, composição de aminoácidos e características físicas. Cada isoenzima é um tetrâmero composto por dois tipos de subunidades monoméricas geralmente referidas como M (músculo), ou forma A, e H (“heart” – coração), ou forma B. Como os nomes indicam, a subunidade M ou A é produzida maioritariamente em tecidos capazes de metabolismo anaeróbico, como os músculos enquanto a subunidade H ou B é sobretudo encontrada em tecidos com metabolismo aeróbio, como o músculo cardíaco.

Almeida-Val e Val (1993) defendem o mesmo tipo de descrição para as isoenzimas nos peixes com a forma A e B. No entanto, neste estudo é ainda referida uma

terceira subunidade que teria surgido após várias duplicações independentes e sucessivas da forma B dando origem à forma C. Esta terceira forma, de acordo com Markert (1984) está presente em peixes, aves e mamíferos.

O princípio que serve de base à quantificação da LDH em homogeneizados de músculo é a hipótese de que os organismos em stress necessitam de obter energia de uma forma rápida pelo que recorrem à via anaeróbica para o efeito.

1.4.4 Sódio, potássio ATPase (Na^+ , K^+ - ATPase)

A Na^+ , K^+ - ATPase existe na membrana plasmática sob a forma de um heterodímero contendo duas subunidades α e β que bombeiam potássio (K^+) para o exterior e sódio (Na^+) para o interior de célula contra os seus gradientes de concentração (Horisberger *et al.*, 1991). Na maioria dos vertebrados, as duas subunidades da Na^+ , K^+ - ATPase podem existir sob diferentes isoformas. A subunidade α é a parte catalítica da troca Na^+/K^+ e apresenta uma sequência de aminoácidos semelhante tanto em vertebrados como em invertebrados (Shikano e Fujio, 1998).

A sódio-potássio adenosina trifosfatase (Na^+ , K^+ - ATPase – a bomba sódio potássio) é reconhecida como sendo o maior mecanismo através do qual se criam gradientes iónicos e eléctricos, em tecidos transportadores de sais como o fígado de mamífero e a brânquia de peixe. Nas brânquias de teleósteos, a Na^+ , K^+ - ATPase tem um papel importantíssimo no transporte de iões através das brânquias em ambientes hiperosmóticos (McCormick e Bern, 1989), criando gradientes eléctricos e iónicos usados para a secreção de sais em água do mar e, possivelmente, para a absorção de iões em água doce (McCormick, 1993). Portanto, a enzima regula as trocas de Na^+/K^+ entre o organismo e o meio ambiente, pelo que a actividade da Na^+ , K^+ - ATPase nas brânquias dos peixes é um dos mecanismos mais importantes pelos quais os peixes se adaptam a meios com diferentes concentrações de iões.

Neste estudo, a actividade desta enzima foi utilizada como critério indicativo do funcionamento das brânquias.

1.4.5 Actividade EROD da enzima CYP1A

O sistema de monoxigenases ligado ao citocromo P-450 é composto por uma família de enzimas com um papel fundamental na destoxificação de xenobióticos, em particular agentes lipofílicos e aromáticos. O “450” refere-se ao comprimento de onda de absorção máxima por parte da forma reduzida do citocromo. Uma das enzimas mais utilizadas como biomarcador em peixes é a P-4501A (ou isoenzima CYP1A). Em presença de alguns xenobióticos, novas quantidades de enzima P-4501A são sintetizadas e a actividade enzimática aumenta significativamente (Hodson *et al.*, 1991).

O estudo da isoenzima CYP1A pode ser efectuado quantificando a actividade de EROD (7-ethoxyresorufin O-deethylase), que catalisa a reacção de desalquilação do substrato padrão 7-ethoxyresorufin (7-ER), e que se supõe ser específica para esta isoenzima.

Foi já demonstrado por vários estudos que compostos como bifenílicos policlorados (PCB), dibenzo-p-dioxinas (PCDD) e dibenzoforanos (PCDF) induzem a isoenzima CYP1A. Esta indução está associada ao aumento de compostos xenobióticos no meio. Por exemplo, Van der Weiden *et al.* (1994) afirmam que o citocromo P-4501A pode ser induzido por compostos como HPA e PCB. Esta indução foi já utilizada em estudos com várias espécies de peixes (Sleiderink *et al.*, 1995).

Neste estudo, tentou-se utilizar a actividade desta enzima, em conjugação com a actividade da GST, como indicativa do funcionamento dos mecanismos de destoxificação no sentido de investigar se a presença de sólidos em suspensão poderia interferir com a actividade destas enzimas.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

Neste estudo, como já foi referido, foram usadas duas espécies de peixes: a enguia europeia (*Anguilla anguilla* L.) e a truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*).

Numa primeira fase do trabalho, foram determinadas as actividades das enzimas AChE, LDH, GST, EROD e Na⁺, K⁺ - ATPase em animais mantidos em laboratório, conforme indicado anteriormente, afim de se determinar as gamas de actividade que podem ser consideradas “normais” para cada espécie.

Numa segunda fase, utilizando um dispositivo especialmente desenvolvido para o efeito, foi estudado o efeito de várias concentrações de sólidos em suspensão.

2.1 CAPTURA E MANUTENÇÃO DE AMBAS AS ESPÉCIES

As enguias de vidro foram capturadas no rio Lima utilizando a arte de pesca “*Tela de Saco*” (figura 2.1.1). Após captura, os meixões foram separados do resto da pescaria e trazidos para laboratório num contentor sem água, procedimento comum na pesca comercial. No laboratório, as enguias foram mantidas durante pelo menos 15 dias em aquários de vidro com capacidade para 70 litros, à temperatura de 17°C, com fotoperíodo de 16 horas luz: 8 horas escuro e uma concentração de oxigénio dissolvido acima de 80% do valor de saturação do ar. Durante o período de manutenção, as enguias de vidro não foram alimentadas, uma vez que durante esta fase em condições naturais os animais não se alimentam.

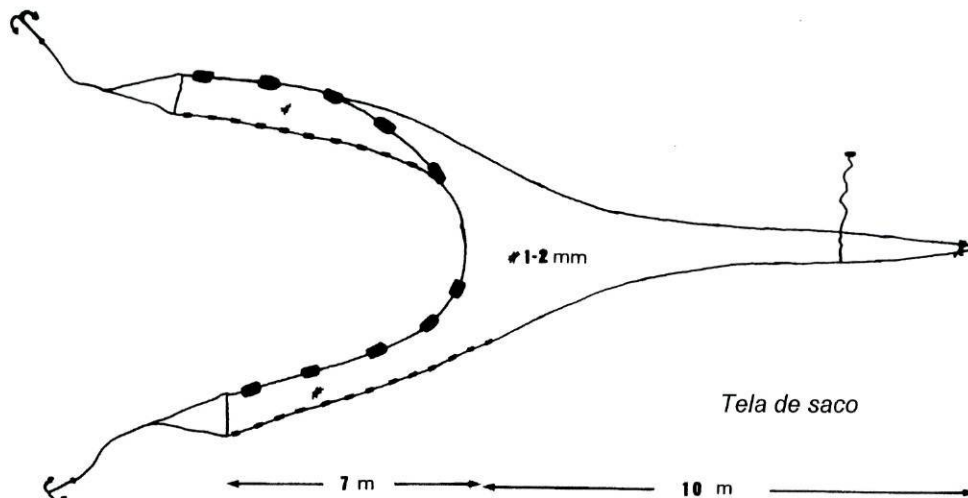


Figura 2.1.1 – Esquema de “Tela de saco” (Antunes, 2002).

Os juvenis de truta, amavelmente cedidos pela truticultura de Paredes de Coura, foram mantidos nas mesmas condições que as enguias. No entanto, as trutas foram alimentadas três vezes por semana com alimento composto e completo para trutas, aquasoja, até 24 horas antes do início dos ensaios.

2.2 DETERMINAÇÃO DA ACTIVIDADE DAS ENZIMAS EM ANIMAIS MANTIDOS EM LABORATÓRIO

Dez meixões, escolhidos ao acaso, foram retirados dos aquários e mortos por decapitação. Os peixes foram dissecados e o fígado, brânquias, músculo e cabeça foram isolados, lavados em tampão para remover vestígios de sangue e colocados no tampão apropriado para determinação de cada actividade enzimática, conforme a seguir se descreve. Todo o procedimento foi efectuado sobre gelo. Foram usados dez peixes por ensaio.

Para cada homogeneizado de AChE foi colocada uma cabeça em 1 ml de tampão fosfato (0,1 M, pH = 7,2). Para cada homogeneizado de LDH foi colocado um músculo dorsal em 1 ml de tampão Tris/NaCl (0,08 M Tris, 0,2 M NaCl, pH = 7,2). Para cada

homogeneizado de GST foi colocada a totalidade dos filamentos branquiais (uma vez que neste estado de desenvolvimento da enguia as brânquias são muito diminutas) em 0,5 ml de tampão fosfato (0,1 M, pH = 6,5). Para cada homogeneizado de EROD foi colocado um conjunto de nove fígados, em 0,5 ml de tampão de ressuspensão (50 mM Tris, 1mM dithiothreitol, 1mM EDTA, 20% glicerol, pH = 7,4). No caso da Na^+ , K^+ - ATPase foram utilizadas duas técnicas para determinação da actividade da enzima. Os homogeneizados para a primeira técnica foram preparados colocando a totalidade dos filamentos branquiais em 0,5 ml de tampão de homogeneização (0,25 M sacarose, 6mM Na_2EDTA , pH = 7,2). Os homogeneizados para a segunda técnica foram preparados colocando a totalidade dos filamentos branquiais em 0,1 ml de tampão SEI (150 mM sacarose, 100 mM EDTA, 50 mM imidazole, pH = 7,3).

Na preparação dos homogeneizados foi usado um homogeneizador Ystral GmbH Dottingen a uma velocidade de 19000 rpm durante 30 segundos.

Os homogeneizados de AChE, da LDH e os homogeneizados de Na^+ , K^+ - ATPase utilizados na primeira técnica foram congelados a -20°C . Os homogeneizados para determinação da GST, EROD e de Na^+ , K^+ - ATPase utilizados na segunda técnica de determinação foram mantidos a -80°C . Nas amostras para quantificação da Na^+ , K^+ - ATPase pela segunda técnica, os homogeneizados foram preparados utilizando um sonicador da Sonics & Materials Inc, CT, EUA. Foi usada uma centrifugadora refrigerada (Sigma 3K 30) para obtenção dos sobrenadantes a usar nas determinações enzimáticas, excepto no caso do segundo método de Na^+ , K^+ - ATPase, onde foi usada um centrifugadora Sigma 1-13 (Sigma Lab. Centrifugadoras, DE). No caso da AChE e da LDH, os homogeneizados foram centrifugados a 3300 g durante 3 minutos. A centrifugação foi feita a 9000 g durante 30 minutos para homogeneizados de EROD e GST. Em termos de Na^+ , K^+ - ATPase, os homogeneizados foram centrifugados 10000 g durante 30 minutos no que diz respeito ao primeiro método e a 15493 g durante 1 minuto para o segundo método.

A determinação da actividade das enzimas em trutas mantidas em laboratório foi efectuada utilizando a metodologia já descrita para a enguia.

2.3 ENSAIOS ENZIMÁTICOS

2.3.1 Acetilcolinesterase (AChE)

A actividade da AChE foi determinada de acordo com o método de Ellman *et al.* (1961), adaptado a microplaca (Guilhermino *et al.*, 1996).

Depois de um período máximo de 5 dias a -20°C , os homogeneizados foram descongelados a uma temperatura constante de 4°C . Num ensaio típico, 0,250 ml de solução de reacção com as proporções de: 30 ml de tampão fosfato (0,1M, $\text{pH} = 7,2$) 1ml de solução de 5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzóico) (10 mM) com hidrogénio carbonato de sódio (84,01 mM) e 0,200 ml de acetiltiocolina 0,075 M foram adicionados a 0,05 ml de homogeneizado. A solução de reacção (tampão + DTNB + acetiltiocolina) foi usada como branco. As determinações foram feitas a 25°C , a 414 nm, utilizando um leitor de microplacas Labsystem Multiskan EX. As leituras foram efectuadas em quadruplicado, efectuando uma primeira leitura após um período de incubação de 10 minutos e uma segunda leitura, 5 minutos após a primeira.

A actividade da AChE foi expressa em U por mg/proteína, sendo 1 U igual a 1 nmol de substrato hidrolisado por minuto.

2.3.2 Glutathione S- transferases (GST)

A actividade da GST foi determinada de acordo com o método de Habig *et al.* (1974), adaptado a microplaca, conforme descrito em Frasco e Guilhermino (2002).

Depois de um período máximo de cinco dias a -80°C , os homogeneizados foram descongelados a uma temperatura constante de 4°C . Antes de começar o ensaio foi preparada uma solução de glutathione (GSH) 10 mM em tampão fosfato 0,1M, $\text{pH} = 6,5$ e uma solução de 1-cloro-2, 4-dinitrobenzeno (CDNB) 60 mM em etanol. A solução de reacção tinha as seguintes proporções: 4,95 ml de tampão fosfato, 0,9 ml de solução de GSH, 0,15 ml de solução de CDNB. A 0,2 ml de solução de reacção foi adicionado 0,1 ml de homogeneizado. Como branco foi usado um tratamento constituído por 0,2 ml de solução de reacção e 0,1 ml de tampão fosfato. A actividade da GST foi medida, em

quadruplicado, a 25° C, usando um leitor de microplacas Labsystem Multiskan EX, a um comprimento de onda de 340 nm durante 5 minutos a intervalos de 20 segundos.

A actividade da GST foi expressa em U por mg/proteína, sendo 1 U igual a 1 nmol de substrato hidrolisado por minuto.

2.3.3 Lactato Desidrogenase (LDH)

A actividade da LDH foi determinada de acordo com o método de Vassault (1983), adaptado a microplaca, conforme descrito em Diamantino *et al.* (2001).

Depois de um período máximo de cinco dias a -20°C, efectuou-se um ciclo de 3 congelações/descongelações, a uma temperatura de 4°C. Em cada poço da microplaca, 0,25 ml de uma solução de Tris/NaCl/NADH (Tris 81,3 mM + NaCl 203,2 mM + NADH 0,244 mM) foi adicionada a 0,04 ml de homogeneizado. Após esta operação e usando uma pipeta multicanais adicionaram-se 0,04 ml de Tris/NaCl/Piruvato (Tris 81,3 mM + NaCl 203,2 mM + Piruvato 9,76 mM). As determinações foram efectuadas a 25°C, em quadruplicado, usando um leitor de microplacas Labsystem Multiskan EX a um comprimento de onda de 340 nm, durante 5 minutos a intervalos de 20 segundos.

A actividade da LDH foi expressa em $\mu\text{mol}/\text{minuto}$ por mg/proteína.

2.3.4 Sódio, Potássio ATPase (Na^+ , K^+ - ATPase)

Conforme referido anteriormente, foram testados dois métodos para determinar a actividade da Na^+ , K^+ - ATPase.

O primeiro método foi efectuado de acordo com a metodologia descrita em Corotto e Holliday (1996), adaptado a microplaca. Foram preparadas duas soluções diferentes de adenosina trifosfato (ATP): uma foi preparada sem ubaína e com cloreto de potássio (KCl) [100 mM cloreto de sódio (NaCl), 30 mM cloreto de potássio (KCl), 10 mM cloreto de magnésio (MgCl_2), 0,1 mM EGTA, 10 mM Hepes, pH = 7,2]. A outra foi preparada com ubaína e sem cloreto de potássio (KCl): 130 mM cloreto de sódio (NaCl), 10 mM cloreto de magnésio (MgCl_2), 0,1 mM EGTA, 10 mM Hepes, 1 mM ubaína, pH = 7,2. Foram incubados 0,05 ml de amostra com 0,05 ml de cada solução de ATP durante 15 minutos, a 25° C. Após este período de incubação, a reacção foi parada pela adição de

0,15 ml de reagente de molibdato (8,10 mM molibdato de amónio, 176 mM sulfato de ferro, 560 mM ácido sulfúrico). A absorvância foi lida, a 25°C, usando um leitor de microplacas Labsystem Multiskan EX, a um comprimento de onda de 650 nm, 20 minutos após o desenvolvimento de cor. A quantidade de fosfato inorgânico (Pi) libertado foi determinado utilizando dihidrogenofosfato de potássio (KH₂PO₄) como padrão.

O segundo método utilizado para determinar a actividade da Na⁺, K⁺ - ATPase foi o descrito em McCormick (1993), adaptado a microplaca.

Antes de começar o ensaio preparou-se uma solução salina [189 mM NaCl, 10,5 mM MgCl₂, 42 mM KCl e 50 mM imidazole (pH = 7,5)]. Prepararam-se duas soluções de adenosina trifosfato (ATP). A primeira contendo 4 U de lactato desidrogenase (LDH) mL⁻¹, 5 U de piruvato kinase (PK) mL⁻¹, 2,8 mM de fosfoenolpiruvato (PEP), 0,7 mM ATP, 0,22 mM NADH e 50 mM de imidazole (pH = 7,5). A segunda solução foi preparada de modo semelhante à primeira mas foram-lhe adicionados 0,5 mM de ubaína. Misturou-se cada uma das soluções de ATP com a solução salina, em recipientes separados, numa proporção de 3:1. Estas foram mantidas em gelo.

Depois de um período máximo de cinco dias a -80° C, os homogeneizados foram descongelados a uma temperatura constante de 4° C. Adicionaram-se 0,025 ml de SEID [0,1 g de sodium deoxycholate em 20 ml de tampão SEI (150 mM sacarose, 100 mM EDTA, 50 mM imidazole, pH = 7,3)]. Adicionaram-se 0,2 ml de cada uma das soluções de ATP a 0,01 ml de homogeneizado. A absorvância foi lida, a 25° C, usando um leitor de microplacas Labsystem Multiskan EX a um comprimento de onda de 340 nm, durante 10 minutos, a intervalos de 20 segundos. A actividade da Na⁺, K⁺ - ATPase foi calculada através da diferença na hidrólise de ATP, na presença ou ausência de ubaína, e expressa em micromoles de ADP por miligrama de proteína por hora (µmol ADP/mg⁻¹ proteína/h).

2.3.5 Actividade EROD da Enzima CYP1A

A actividade de EROD foi determinada de acordo com o método de Hodson *et al.* (1991), adaptado a microplaca, conforme descrito em Frasco e Guilhermino (2002).

Depois de um período máximo de 5 dias a -80°C, os homogeneizados foram descongelados a uma temperatura constante de 4°C. O substrato foi preparado por dissolução de um cristal de 7-ethoxyresorufin (7-ER) em metanol "HPLC-grade". Esta

solução saturada foi depois diluída em tampão EROD (0,1M Tris, 0,1M NaCl, pH = 8,0) com o intuito de obter uma concentração final de 0,002 mM. Esta concentração foi determinada medindo a absorvância da solução a 482 nm usando um espectrofotômetro Spectronic 20 Genesys. O ensaio foi iniciado pela incubação, em microplaca de 0,1 ml de amostra com 0,194 ml de substrato durante 2 minutos. Findo este período, 0,006 ml de uma solução de NADPH (30 mM em tampão de resuspensão) foi rapidamente adicionada à solução de reacção e a diferença de absorvância determinada, a 25°C, usando um leitor de microplacas Labsystem Multiskan EX a um comprimento de onda de 570 nm durante 5 minutos a intervalos de 20 segundos.

A actividade de EROD foi expressa em pmol/minuto por mg/proteína.

2.3.6 Quantificação da Proteína

A quantificação da proteína nas amostras foi realizada em triplicado pelo método de Bradford (Bradford, 1976), adaptada a microplaca, usando globulinas de bovino como padrão e adicionando 0,25 ml do reagente de Bradford (com um factor de diluição de 5 em água ultra-pura) a 0,01 ml de amostra. A absorvância foi lida a 600 nm após um período de incubação de 15 minutos.

2.4 ENSAIOS COM SÓLIDOS EM SUSPENSÃO

2.4.1 Enguia europeia *Anguilla anguilla*

As enguias de vidro ou meixões, com tamanhos entre os 6 e 7 cm, foram retiradas dos aquários e distribuídas por 8 silos (ver figura 3.2) de material inerte com capacidade de 20 litros, onde foram novamente aclimatados durante pelo menos 7 dias. Cada silo continha 10 litros de água e 10 enguias. As enguias foram expostas a diferentes concentrações de uma substância denominada “fuller’s earth”, terra “fuller” ou terra fulónica, usada para simulação de sólidos em suspensão. Trata-se de uma argila predominantemente montmorilonítica, sendo a montmorilonite um dos minerais das

argilas, mas que pode apresentar interestratificados, ou seja, pode apresentar em camadas sobrepostas outros minerais como a ilite-montmorilonite e o ciorito-montmorilonito, em que o catião de troca é geralmente o magnésio e que tem alto poder absorvente e descorante para óleos orgânicos. Algumas “fuller’s earth” contêm paligorskite, um mineral do grupo das argilas, que, quimicamente, é um silicato hidratado de magnésio, branco, muito leve, que aparece em veios ou camadas delgadas ou sepiolite, que é igualmente um silicato básico, hidratado, de magnésio. Por vezes a “fuller’s earth” montmorilonítica não se distingue mineralogicamente e geologicamente da bentonite que não aumenta de volume. No entanto, em geral, uma bentonite que não aumenta de volume não produz qualquer clarificação de óleos, a não ser depois de tratamento ácido, enquanto que quase todas as “fuller earth” montmoriloníticas são bons agentes descorantes de óleos mesmo no estado natural, diminuindo o poder descorante pelo tratamento ácido no caso de terra “fuller” paligorskítica (Carvalho, 1967). É também utilizada para pisar a lã.

Um dos silos desempenhava a função de controlo e os restantes sete tinham concentrações de 2; 4; 6; 8; 10; 12 e 14 g/l de sólidos em suspensão. Os peixes foram expostos ao “fuller’s earth” por 96 horas, a 18°C. Os sedimentos foram mantidos em suspensão através de um sistema de arejamento utilizando uma bomba da marca “Eheim” para cada silo (figura 2.4.1).

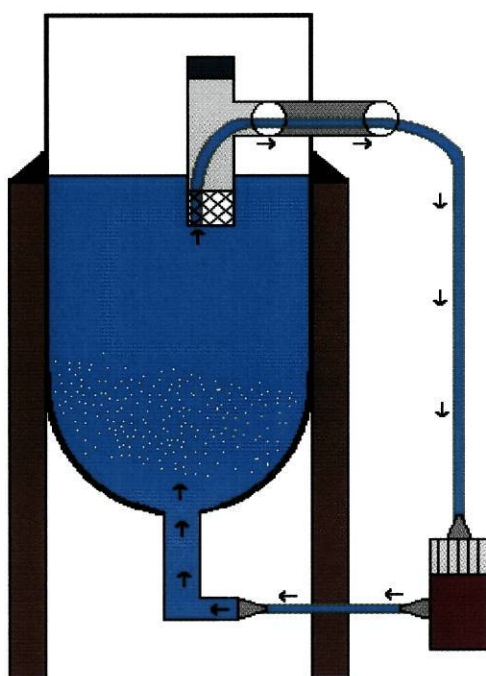


Figura 2.4.1 – Esquema de silo utilizado nos ensaios de enguia europeia *Anguilla anguilla*.

Na figura 2.4.1 as setas indicam o fluxo da água e do sedimento. Como é possível observar, a extremidade por onde a água e sedimentos entravam estava coberta com uma rede de malhagem pequena, para impedir a passagem das enguias de vidro. Na extremidade oposta, o fluxo da água era suficientemente forte para impedir que os meixões nadassem contra a corrente.

Ao longo do ensaio foram determinadas diariamente as mortalidades e lidos os valores de pH e percentagem de O₂ em cada silo. No final do teste, os animais sobreviventes foram retirados dos silos, mortos por decapitação e foi determinada a concentração a que os sólidos em suspensão provocam a morte de 50% da população estudada (LC50). As análises enzimáticas foram efectuadas da forma descrita nos pontos 2.3 e 2.4. O teste foi repetido três vezes.

2.4.2 A truta arco-íris, *Oncorhynchus mykiss*

Os juvenis de truta, com comprimentos entre os 4 e 6 cm, foram distribuídos por cinco tanques (silos) de material inerte com capacidade de 20 litros, onde foram, novamente aclimatados durante pelo menos sete dias. Cada silo continha 15 litros de água e 10 trutas. As trutas foram expostas a diferentes concentrações da mesma substância que as enguias: “fuller’s earth”. Um dos silos desempenhava a função de controlo os restantes quatro tinham concentrações de 0,055, 0,75, 1,75 e 3,5 g/l. Os peixes foram expostos ao “fuller’s earth” por 96 horas a 18°C. Os sedimentos eram mantidos em suspensão através de um sistema de arejamento utilizando uma bomba da marca “Eheim” para cada silo mas de forma diferente da usada para a enguia (figura 2.4.2.1).

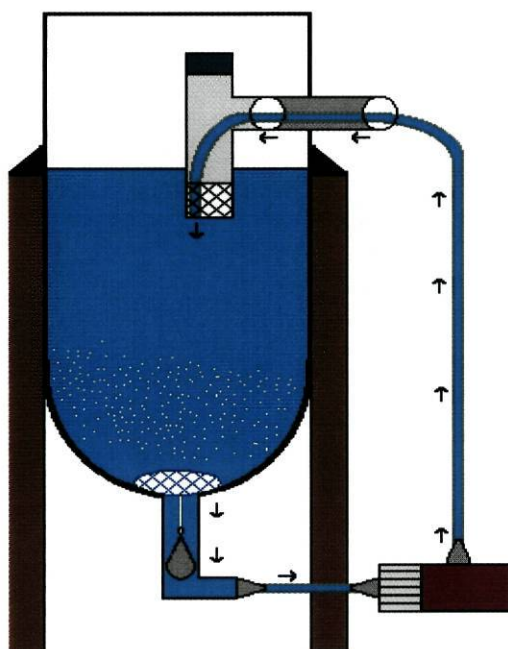


Figura 2.4.2.1 – Esquema de silo utilizado nos ensaios de truta arco-íris *Oncorhynchus mykiss*.

No caso das trutas, o fluxo da água foi revertido como as setas o indicam e a estrutura que se vê no fundo do silo impedia as trutas de seguirem o fluxo de água até à bomba. É um artefacto concebido artesanalmente com uma rolha de garrafão de água de 5 litros, fio de pesca e uma chumbeira (figura 2.4.2.2).

A base da rolha foi perfurada para permitir a passagem de água e de sedimento. As perfurações realizadas foram largas o suficiente para não permitir a acumulação de sedimentos na base da rolha. O fio de pesca e a chumbeira foram adquiridos num estabelecimento comercial de material de pesca. A chumbeira, com um peso de 60 gramas foi revestida com “teflon” e isolada com cola de silicone para tentar evitar qualquer libertação de chumbo para o meio que poderia afectar os animais testados.

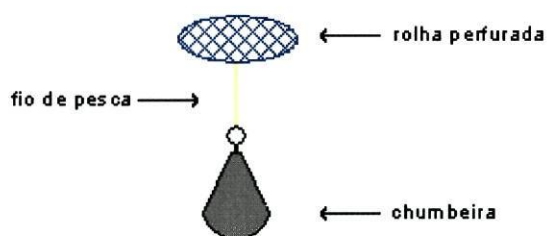


Figura 2.4.2.2 – Estrutura montada com uma rolha, fio de pesca e chumbeira com objectivo de impedir a passagem de juvenis de trutas.

Durante o teste foram determinadas diariamente as mortalidades e lidos os valores de pH e percentagem de O₂ em cada silo. No final do teste, foi determinada a concentração a que os sólidos em suspensão provocam a morte de 50% da população estudada (LC50). Os animais sobreviventes foram retirados dos silos e mortos por decapitação. As análises enzimáticas foram efectuadas da forma descrita nos pontos 2.3 e 2.4. O teste foi repetido três vezes.

2.5 AGENTES QUÍMICOS

Os agentes químicos utilizados neste estudo foram adquiridos à Sigma (EUA) e Merck (Alemanha). O metanol “HPLC-grade” foi adquirido à SDS (França) e o reagente de Bradford foi fornecido pela Bio-Rad (Alemanha).

2.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Nos ensaios com sólidos em suspensão, os vários tratamentos foram comparados utilizando uma Análise de Variância unifactorial (one-way ANOVA). As diferenças entre os vários tratamentos foram discriminadas utilizando um teste de Dunnet. Os valores de LC50 foram determinados utilizando a análise probit (Finney 1971). O nível de significância foi de $P= 0,05$.

3. RESULTADOS

Apresentam-se de seguida, os resultados obtidos no decurso do trabalho, descrevendo-se em primeiro lugar os resultados obtidos com enguia e posteriormente os obtidos com truta.

3.1 ACTIVIDADE DAS ENZIMAS EM ANIMAIS MANTIDOS EM LABORATÓRIO

Na figura 3.1.1, podemos observar a actividade da AChE determinada em dez cabeças de enguia, efectuando quatro determinações enzimáticas por peixe. A média de valores obtidos em animais mantidos em laboratório e não expostos a sedimentos em suspensão foi de $39,3 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1} \text{ proteína}$ com um desvio padrão de $\pm 2,18$.

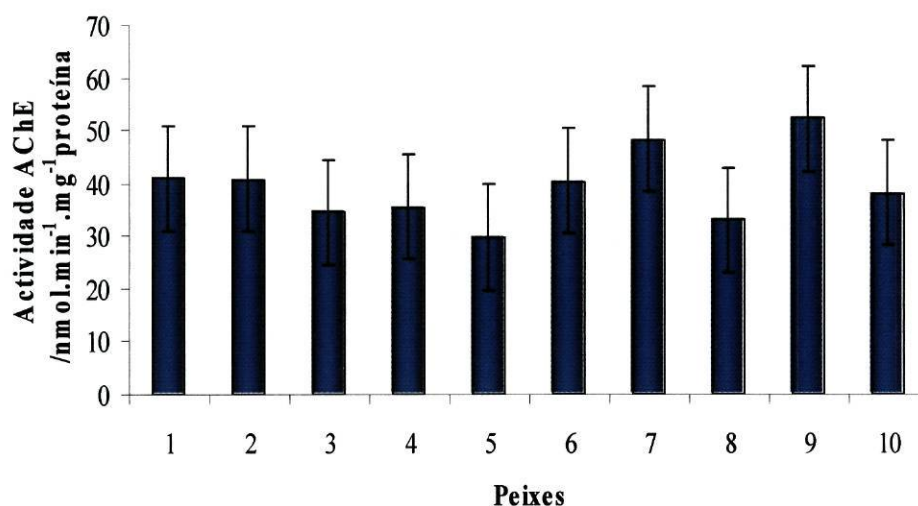


Figura 3.1.1 – Actividade enzimática da AChE em 10 enguias de vidro (*Anguilla anguilla*) mantidas durante pelo menos 15 dias em laboratório. Os valores correspondem à média de quatro determinações enzimáticas por cabeça de peixe, com respectivas barras de erro padrão.

Na figura 3.1.2, podemos observar a actividade da AChE determinada em dez cabeças de truta, efectuando quatro determinações enzimáticas por peixe. A média de valores obtidos em animais mantidos em laboratório e não expostos a sedimentos em suspensão foi de $59,8 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ proteína com um desvio padrão de $\pm 7,89$.

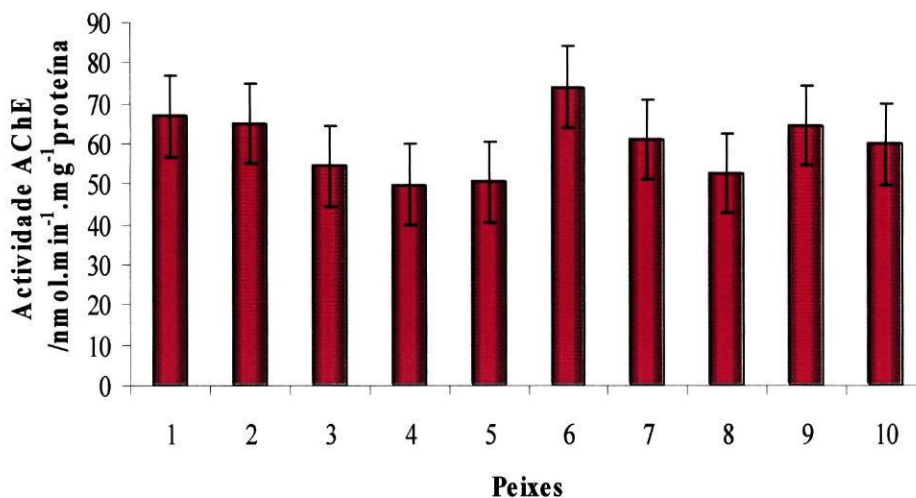


Figura 3.1.2 – Actividade enzimática da AChE em 10 trutas arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) mantidas durante pelo menos 15 dias em laboratório. Os valores correspondem à média de quatro determinações enzimáticas por cabeça de peixe, com respectivas barras de erro padrão.

Na figura 3.1.3, podemos observar a actividade da GST determinada em brânquias de dez enguias, efectuando quatro determinações enzimáticas por peixe. A média de valores obtidos em animais mantidos em laboratório e não expostos a sedimentos em suspensão foi de $65,7 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ proteína com um desvio padrão de $\pm 10,28$.

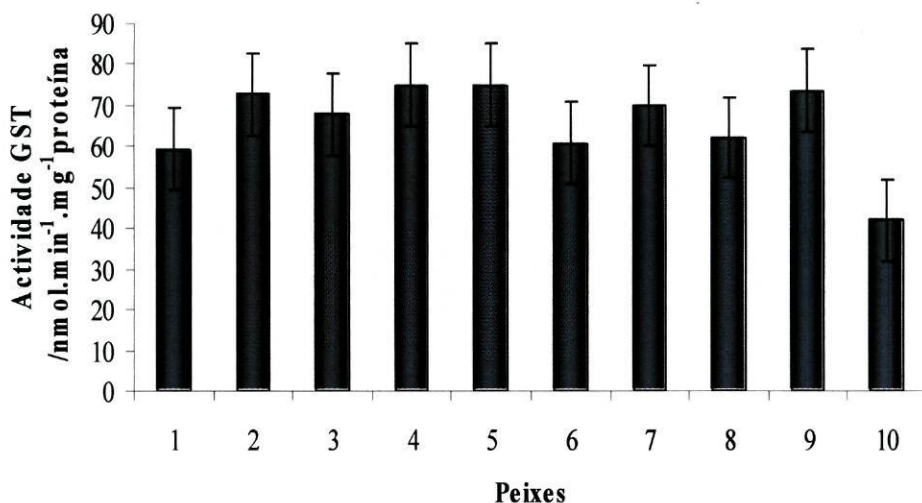


Figura 3.1.3 – Actividade enzimática da GST em 10 enguias de vidro (*Anguilla anguilla*) mantidas durante pelo menos 15 dias em laboratório. Os valores correspondem à média de quatro determinações enzimáticas por cabeça de peixe, com respectivas barras de erro padrão.

Na figura 3.1.4, podemos observar a actividade da GST determinada em brânquias de dez trutas, efectuando quatro determinações enzimáticas por peixe. A média de valores obtidos em animais mantidos em laboratório e não expostos a sedimentos em suspensão foi de 68,7 nmol.min⁻¹.mg⁻¹.proteína com um desvio padrão de ± 11,18.

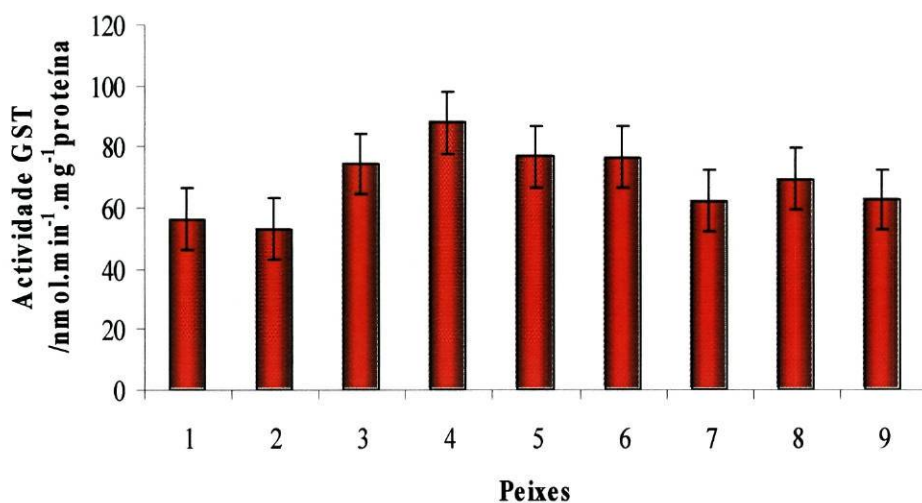


Figura 3.1.4 – Actividade enzimática da GST em 10 trutas arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) mantidas durante pelo menos 15 dias em laboratório. Os valores correspondem à média de quatro determinações enzimáticas por cabeça de peixe, com respectivas barras de erro padrão.

Na figura 3.1.5, podemos observar a actividade da LDH determinada em músculo de dez enguias, efectuando quatro determinações enzimáticas por peixe. A média de valores obtidos em animais mantidos em laboratório e não expostos a sedimentos em suspensão foi de $0,51 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}\text{proteína}$ com um desvio padrão de $\pm 0,25$.

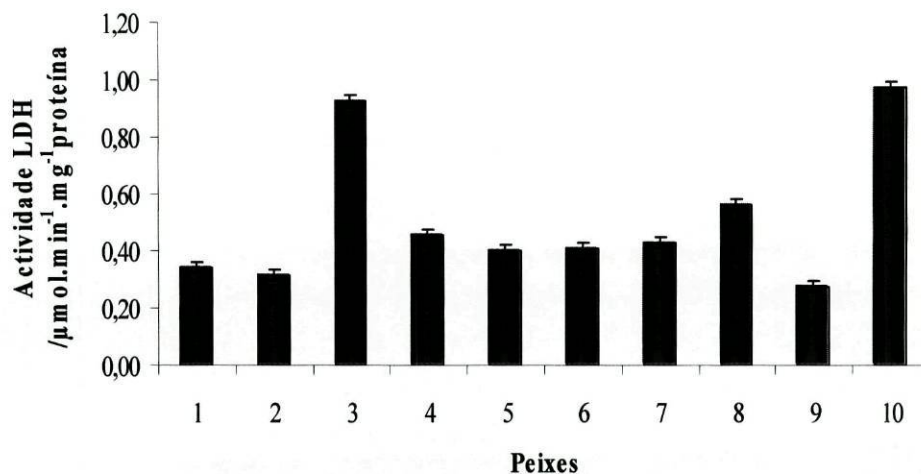


Figura 3.1.5 – Actividade enzimática da LDH em 10 enguias de vidro (*Anguilla anguilla*) mantidas durante pelo menos 15 dias em laboratório. Os valores correspondem à média de quatro determinações enzimáticas por cabeça de peixe, com respectivas barras de erro padrão.

Na figura 3.1.6, podemos observar a actividade da LDH determinada em músculo de dez trutas, efectuando quatro determinações enzimáticas por peixe. A média de valores obtidos em animais mantidos em laboratório e não expostos a sedimentos em suspensão foi de $0,14 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}\text{proteína}$ com um desvio padrão de $\pm 0,03$.

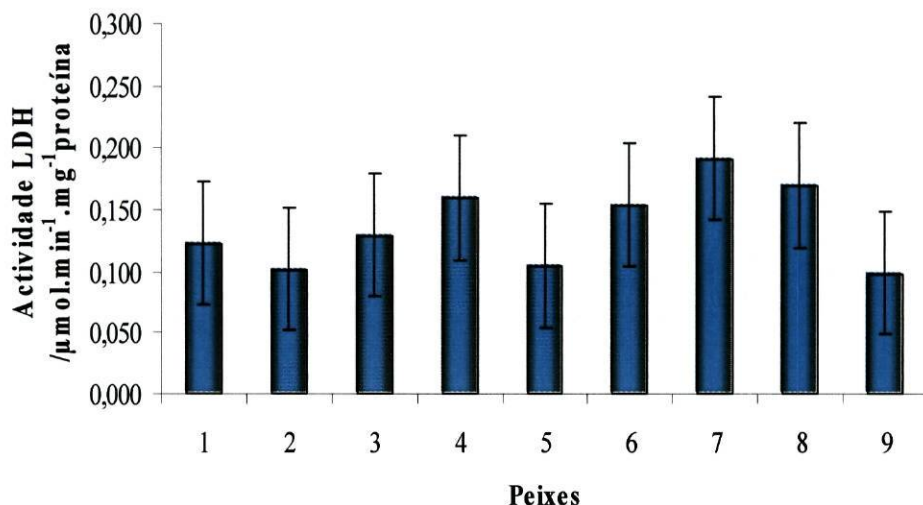


Figura 3.1.6 – Actividade enzimática da LDH em 10 trutas arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) mantidas durante pelo menos 15 dias em laboratório. Os valores correspondem à média de quatro determinações enzimáticas por cabeça de peixe, com respectivas barras de erro padrão.

Na figura 3.1.7, podemos observar a actividade da Na^+ , K^+ - ATPase em brânquias de cinco enguias, efectuando quatro determinações enzimáticas por peixe. A média de valores obtidos em animais mantidos em laboratório e não expostos a sedimentos em suspensão foi de $0,07 \mu\text{mol}/\text{mg}/\text{h}$ com um desvio padrão de $\pm 0,014$.

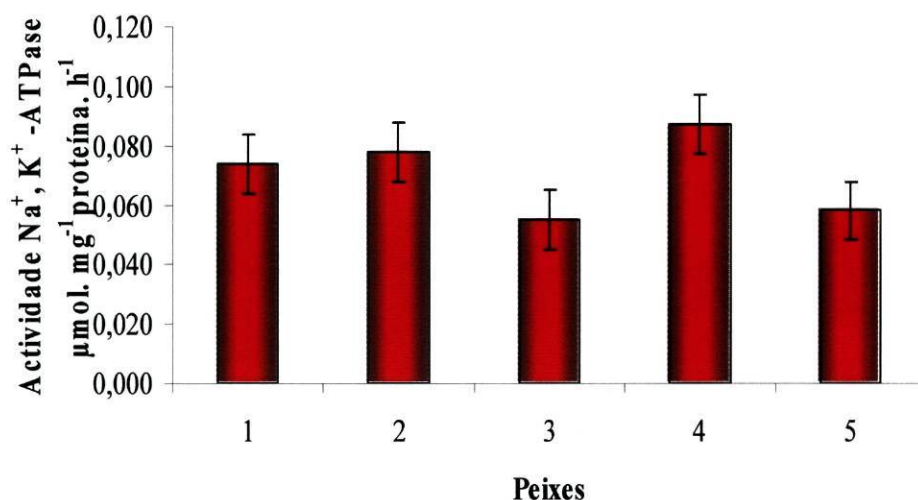


Figura 3.1.7 – Actividade enzimática da Na^+ , K^+ - ATPase em 5 enguias de vidro (*Anguilla anguilla*) mantidas durante pelo menos 15 dias em laboratório. Os valores correspondem à média de quatro determinações enzimáticas por cabeça de peixe, com respectivas barras de erro padrão.

Na figura 3.1.8, podemos observar a actividade da Na^+ , K^+ - ATPase em brânquias de oito trutas, efectuando quatro determinações enzimáticas por peixe. A média de valores obtidos em animais mantidos em laboratório e não expostos a sedimentos em suspensão foi de $0,17 \mu\text{mol}/\text{mg}/\text{h}$ com um desvio padrão de $\pm 0,187$.

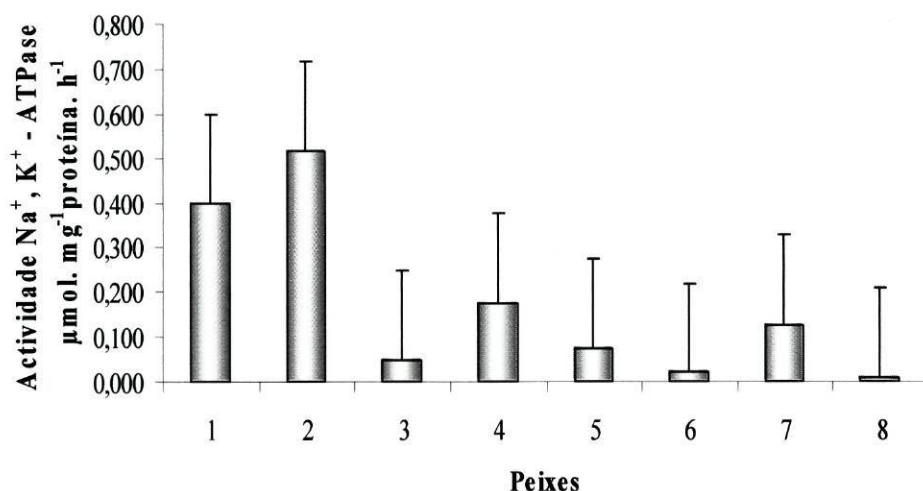


Figura 3.1.8 – Actividade enzimática da Na^+ , K^+ - ATPase em trutas arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) mantidas durante pelo menos 15 dias em laboratório. Os valores correspondem à média de quatro determinações enzimáticas por cabeça de peixe, com respectivas barras de erro padrão.

No que diz respeito à actividade EROD da enzima CYP1A não foi possível obter quaisquer resultados, apesar de se ter utilizado amostras compostas por um conjunto de nove fígados. Teria sido necessário aumentar grandemente o número de peixes utilizados em cada bioensaio, o que era impraticável no sistema de exposição concebido. Portanto não haverá qualquer referência à enzima nos resultados dos ensaios com sólidos em suspensão.

3.2 ENSAIOS COM SÓLIDOS EM SUSPENSÃO

Na tabela 3.2.1 é indicado o número de sobreviventes em cada silo passadas 96 horas. Pode observar-se que no silo 1 não houve qualquer morte; no silo 2 houve apenas 1 morte; no silo 3 morreram 2 indivíduos; no silo 4 morreram metade das enguias; no silo 5 morreu apenas 1 peixe; no silo 6 houve 1 sobrevivente; no silo 7 morreram 3 enguias e no silo 8 morreram 6 indivíduos.

Tanque	Concentração	Sobreviventes
1	Controlo	10
2	2 g/l	9
3	4 g/l	8
4	6 g/l	5
5	8 g/l	9
6	10 g/l	1
7	12 g/l	7
8	14 g/l	4

Tabela. 3.2.1 – Concentrações de sólidos em suspensão em cada silo e número de sobreviventes após 96 horas.

A tabela 3.2.2 mostra os resultados do CL_{50} após 96 horas.

CL_{50}	I.C. (95%)	g.l.	p
10,707	$6,669 < CL_{50} < 17,19$	4	0,481

Tabela 3.2.2 – Valores de CE_{50} para $\alpha = 0.05$.

I.C. (95%) – Intervalo de confiança 95%.

g. l. – Graus de liberdade.

p – Probabilidade.

Em relação à truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*), na tabela 3.2.3 podemos observar o número de sobreviventes passadas as 96 horas.

Tanque	Concentração	Sobreviventes
1	Controlo	10
2	0,055 g/l	9
3	0,875 g/l	8
4	1,75 g/l	7
5	3,5 g/l	4

Tabela 3.2.3 – Concentrações de sólidos em suspensão em cada silo e número de sobreviventes após 96 horas no segundo ensaio.

A tabela 3.2.4 apresenta os resultados do CL_{50} após 96 horas de exposição.

CL_{50}	I.C. (95%)	g.l.	p
2,916	2,004 < CL_{50} < 3,827	2	0,992

Tabela 3.2.4 – Valores de CL_{50} para $\alpha = 0.05$.

I.C. (95%) – Intervalo de confiança 95%.

g. l. – Graus de liberdade.

p – Probabilidade.

No final de cada ensaio, foram determinadas as actividades enzimáticas nos meixões sobreviventes, apresentando-se seguidamente os resultados obtidos.

Os efeitos de sólidos em suspensão na AChE de meixão são apresentados na figura 3.2.1. Não foram observadas diferenças significativas na actividade da AChE entre as várias concentrações de sólidos e o controlo.

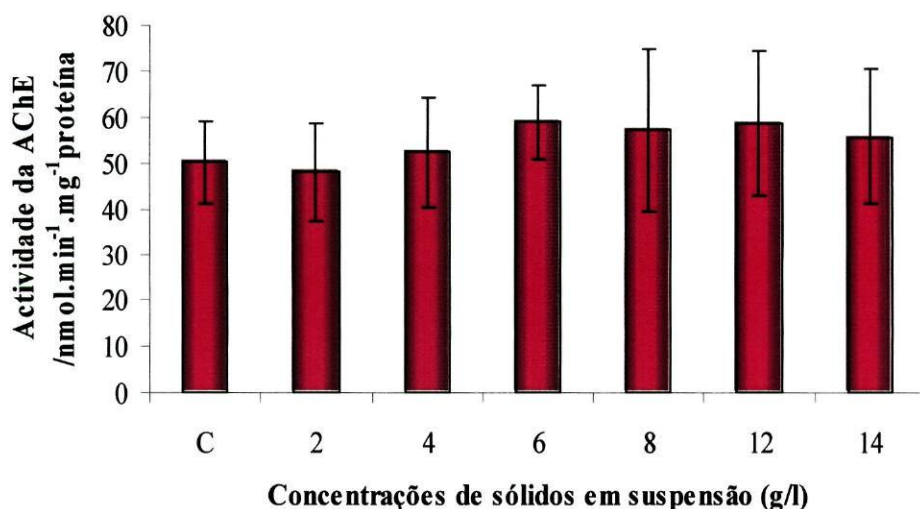


Figura 3.2.1 – Efeitos *in vivo* dos sólidos em suspensão na actividade da AChE no meixão *Anguilla anguilla* Linnaeus. Os valores apresentados são a média da actividade enzimática das enguias sobreviventes em cada tratamento com o respectivo EP (erro padrão). C= Controlo.

Na figura 3.2.2 são apresentados os efeitos de sólidos em suspensão na GST de meixão. Não foram observadas diferenças significativas na actividade da GST entre as várias concentrações de sólidos em suspensão e o controlo.

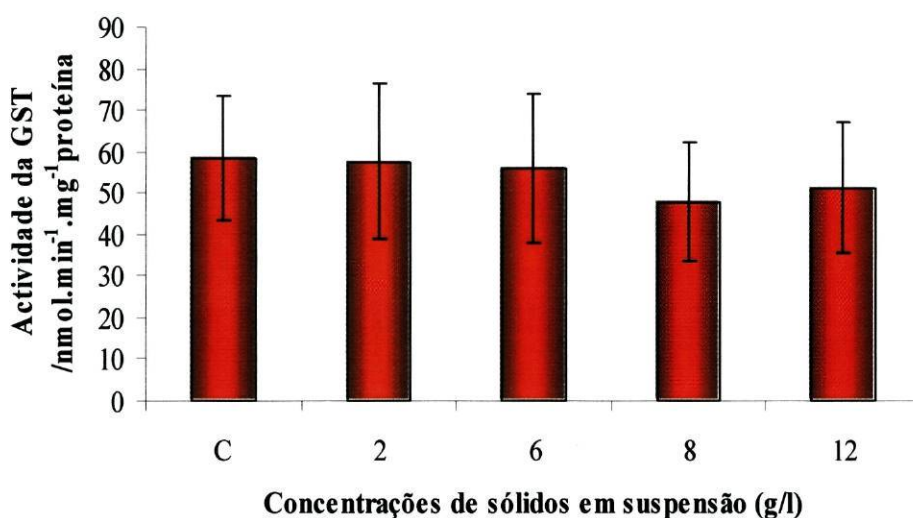


Figura 3.2.2 – Efeitos *in vivo* dos sólidos em suspensão na actividade da GST no meixão *Anguilla anguilla* Linnaeus. Os valores apresentados são a média da actividade enzimática das enguias sobreviventes em cada tratamento com o respectivo EP (erro padrão). C= Controlo.

Os efeitos de sólidos em suspensão na LDH de meixão são apresentados na figura 3.2.3. Não foram observadas diferenças significativas na actividade da LDH entre as várias concentrações de sólidos e o controlo.

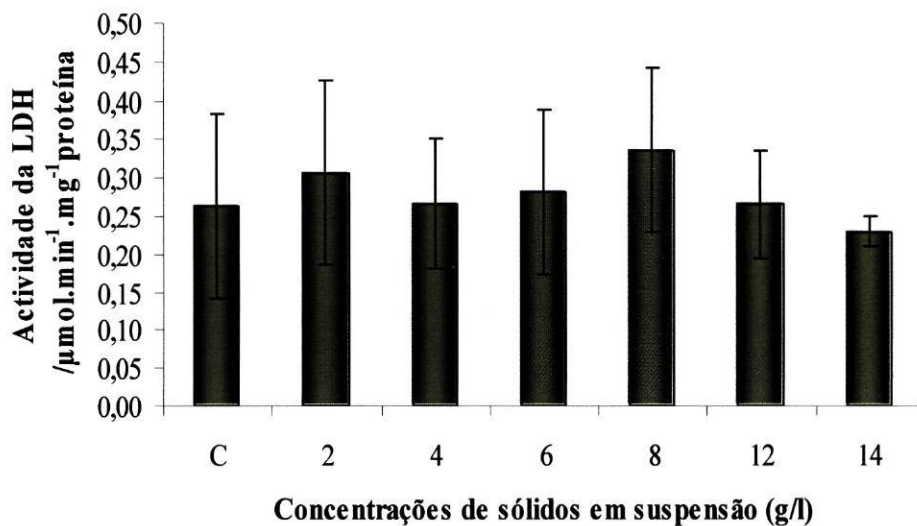


Figura 3.2.3 – Efeitos *in vivo* dos sólidos em suspensão na actividade da LDH no meixão *Anguilla anguilla* Linnaeus. Os valores apresentados são a média da actividade enzimática das enguias sobreviventes em cada tratamento com o respectivo EP (erro padrão). C= Controlo.

Na figura 3.2.4 são apresentados os efeitos de sólidos em suspensão na Na⁺, K⁺ - ATPase de meixão. Não foram observadas diferenças significativas na actividade da Na⁺, K⁺ - ATPase entre as várias concentrações de sólidos em suspensão e o controlo.

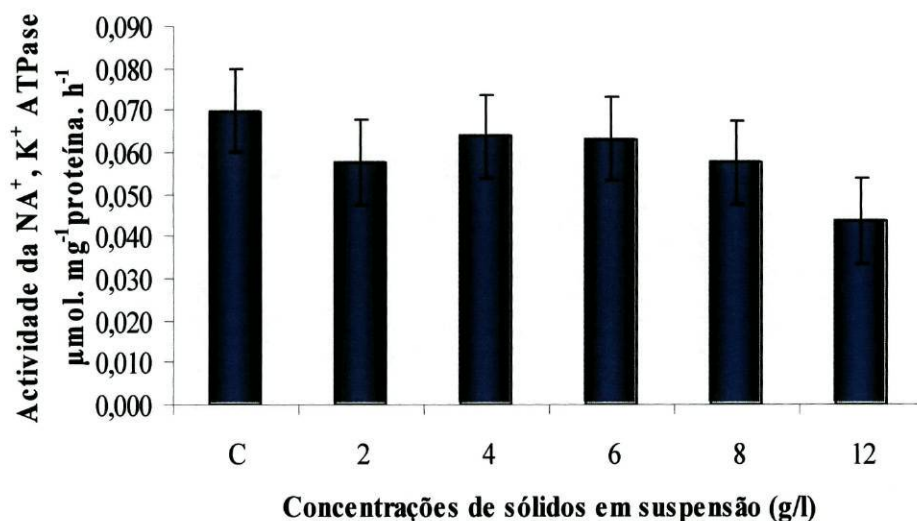


Figura 3.2.4 – Efeitos *in vivo* dos sólidos em suspensão na actividade da Na⁺, K⁺ - ATPase no meixão *Anguilla anguilla* Linnaeus. Os valores apresentados são a média da actividade enzimática das enguias sobreviventes em cada tratamento com o respectivo EP (erro padrão). C= Controlo.

Os efeitos de sólidos em suspensão na AChE de truta são apresentados na figura 3.2.5. Não foram observadas diferenças significativas na actividade da AChE entre as várias concentrações de sólidos e o controlo.

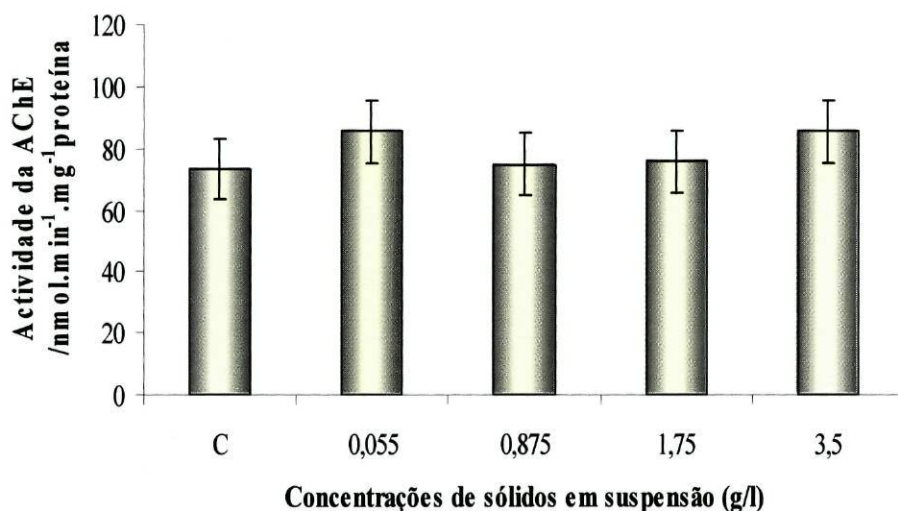


Figura 3.2.5 – Efeitos *in vivo* dos sólidos em suspensão na actividade da AChE na truta arco-íris *Oncorhynchus mykiss*. Os valores apresentados são a média da actividade enzimática das enguias sobreviventes em cada tratamento com o respectivo EP (erro padrão). C = Controlo.

Na figura 3.2.6 são apresentados os efeitos de sólidos em suspensão na GST de truta. Não foram observadas diferenças significativas na actividade da GST entre as várias concentrações de sólidos em suspensão e o controlo.

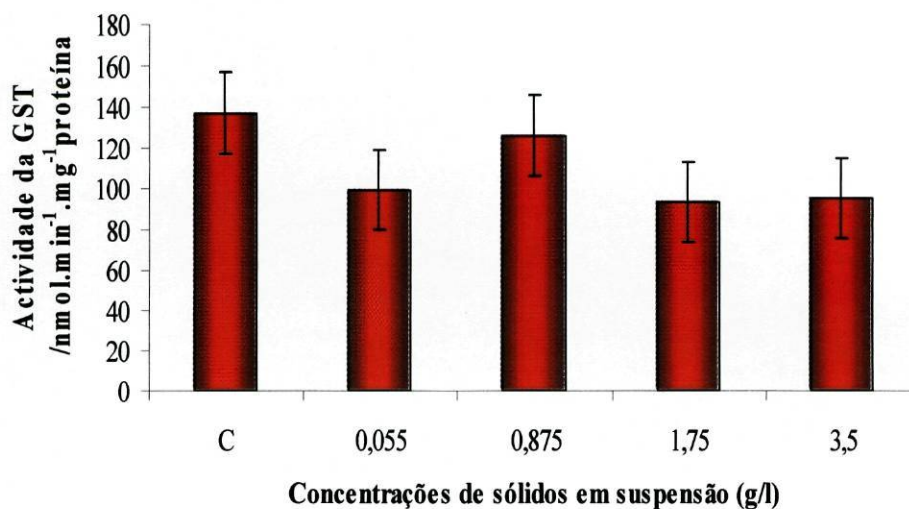


Figura 3.2.6 – Efeitos *in vivo* dos sólidos em suspensão na actividade da GST na truta arco-íris *Oncorhynchus mykiss*. Os valores apresentados são a média da actividade enzimática das enguias sobreviventes em cada tratamento com o respectivo EP (erro padrão). C = Controlo.

Os efeitos de sólidos em suspensão na LDH de truta são apresentados na figura 3.2.7. Não foram observadas diferenças significativas na actividade da LDH entre as várias concentrações de sólidos e o controlo.

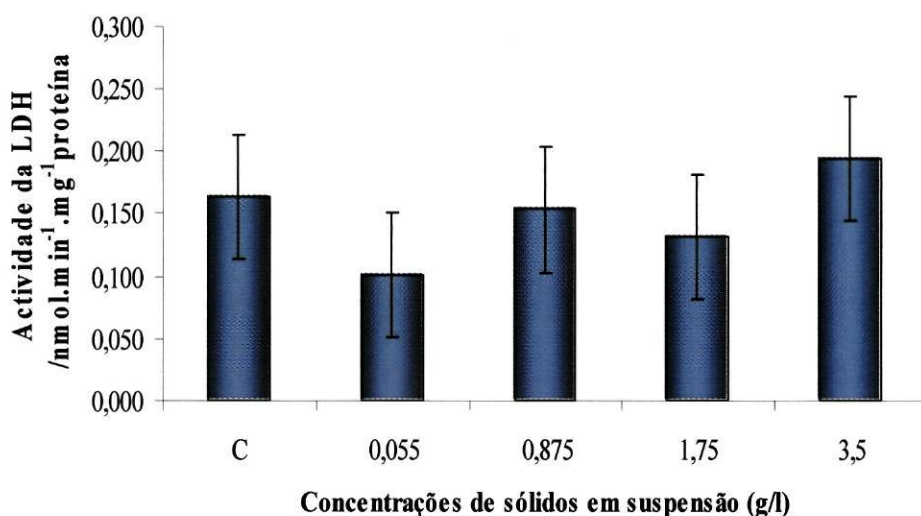


Figura 3.2.7 – Efeitos *in vivo* dos sólidos em suspensão na actividade da LDH na truta arco-íris *Oncorhynchus mykiss*. Os valores apresentados são a média da actividade enzimática das enguias sobreviventes em cada tratamento com o respectivo EP (erro padrão). C = Controlo.

Na figura 3.2.8 são apresentados os efeitos de sólidos em suspensão na Na⁺, K⁺ - ATPase de truta. Não foram observadas diferenças significativas na actividade da Na⁺, K⁺ - ATPase entre as várias concentrações de sólidos em suspensão e o controlo.

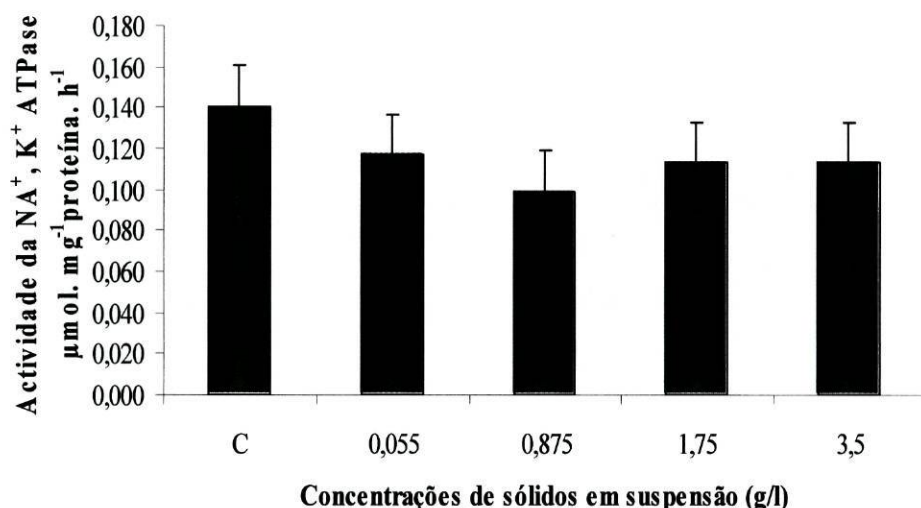


Figura 3.2.8 – Efeitos *in vivo* dos sólidos em suspensão na actividade da Na⁺, K⁺ - ATPase na truta *Oncorhynchus mykiss*. Os valores apresentados são a média da actividade enzimática das enguias sobreviventes em cada tratamento com o respectivo EP (erro padrão). C= Controlo.

3.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As tabelas 3.3.1 e 3.3.2 apresentam os resultados da ANOVA para as diferentes enzimas referentes à enguia europeia e truta arco-íris.

	AChE	GST	LDH	NA ⁺ , K ⁺ ATPase
g.l. do efeito	7	4	6	5
g.l. do erro	45	17	39	14
F	0,727	0,872	0,689	0,216
P	0,650	0,500	0,659	0,950

Tabela 3.3.1 - Resultados da Anova referentes à actividade de cada enzima para a enguia europeia em cada um dos tratamentos para $\alpha= 0.05$.

g. l. – Graus de liberdade.

F – Constante F.

p – Probabilidade.

	AChE	GST	LDH	NA ⁺ , K ⁺ ATPase
g.l. do efeito	4	4	4	4
g.l. do erro	33	33	32	29
F	2,377	2,587	1,965	0,198
P	0,072	0,055	0,124	0,938

Tabela 3.3.2 - Resultados da Anova referentes à actividade de cada enzima para a truta arco-íris em cada um dos tratamentos para $\alpha= 0.05$.

g. l. – Graus de liberdade.

F – Constante F.

p – Probabilidade.

4. DISCUSSÃO

Quando toxicologistas aquáticos, usando a reprodução, crescimento e sobrevivência como pontos de referência, começaram a colaborar com bioquímicos e fisiologistas, elaborou-se uma nova aproximação para detectar e avaliar factores de stress ambiental de acordo com mudanças bioquímicas e fisiológicas. Desta colaboração emergiu o campo de pesquisa de biomarcadores ambientais. De um ponto de vista prático, os parâmetros bioquímicos, fisiológicos e histológicos provaram ser úteis para a detecção de exposição a químicos e avaliação dos seus efeitos em organismos aquáticos. Esses parâmetros passaram a ser referidos por biomarcadores (Cormier e Daniel, 1994). Os biomarcadores representam a tentativa do organismo para compensar ou tolerar factores de stress no seu meio. Peakall (1994) definiu biomarcador como sendo “uma resposta biológica a um químico ou químicos da qual advém um grau ou medida de exposição e por vezes, também, um efeito tóxico. Os níveis de resposta biológica que podem ser considerados vão desde a estrutura molecular à estrutura da comunidade e até ao funcionamento e estruturação do ecossistema”.

O grande interesse que ao longo dos anos os biomarcadores têm suscitado advém das limitações da abordagem tradicionalmente utilizada em toxicologia ambiental, que consiste em medir a quantidade do químico presente no organismo ou ambiente e relacioná-la, através de experiências com animais, a efeitos adversos. No que diz respeito à exposição existem dificuldades, especialmente em sistemas terrestres, em saber quanto material está disponível: por exemplo, metais pesados em solos e exposição de vertebrados selvagens a pesticidas. Depois existe o problema da toxicidade de compostos complexos, cuja composição varia tanto em termos de tempo como de espaço. Em muitas situações, existem também dificuldades em extrapolar as condições laboratoriais para o campo. Estão presentes vários factores ecológicos que podem confundir os resultados, sendo também difícil prever a variabilidade em relação à sensibilidade entre espécies (Peakall, 1994). Os biomarcadores fisiológicos e metabólicos, sendo indicadores de stress, podem fornecer informação acerca do grau de exposição ao nível do organismo ajudando a estabelecer a ligação com potenciais causadores de stress específicos como por exemplo, xenobióticos. De acordo com este ponto de vista é possível ponderar que os biomarcadores têm um papel importante na ligação de mudanças na estrutura da comunidade junto com as funções específicas de potenciais factores de stress,

caracterizando ao mesmo tempo a saúde das populações ao nível do indivíduo (Cormier e Daniel, 1994). Os biomarcadores são, em suma, de importância crítica para a compreensão de como o ambiente físico e químico pode afectar organismos e portanto alterar o bem estar das populações, comunidades e ecossistemas.

O objectivo central deste trabalho foi investigar se a exposição por períodos de curta duração a partículas sólidas em suspensão na coluna de água, resultantes da extracção de inertes que é prática comum em rios e cursos de água nacionais e se destina sobretudo a fornecer matéria-prima para a construção civil, pode provocar mortalidade e ter efeitos em parâmetros bioquímicos determinantes para a sobrevivência da enguia europeia e da truta arco-íris. Para o efeito, foi desenvolvido um sistema de exposição que se revelou adequado para avaliar efeitos de sólidos em suspensão em duas espécies de peixes migradores: a enguia e a truta arco-íris. O dispositivo poderá também ser utilizado para avaliação da toxicidade de agentes químicos, apresentando a vantagem relativamente aos ensaios convencionalmente utilizados, de poder combinar a exposição a sólidos em suspensão e a exposição a substâncias químicas.

Numa primeira fase do trabalho, foram determinadas as actividades das enzimas AChE, LDH, GST e Na⁺, K⁺-ATPase em peixes mantidos em laboratório durante um período de pelo menos 15 dias. Comparando as actividades das diferentes enzimas nas duas espécies de peixes, verifica-se que a actividade média da AChE é superior na truta, que a actividade da GST é similar em ambas as espécies, que a actividade média da LDH da enguia é superior à da truta e que a actividade da Na⁺, K⁺ ATPase da enguia é ligeiramente inferior à actividade média desta enzima na truta. Fenet *et al.* (1998) também observaram actividades semelhantes na GST nestas duas espécies num estudo em que analisou as actividades da GST e EROD em ambas as espécies. Os valores da actividade da GST obtidos por estes autores, cerca de 1000 nmol.min⁻¹.mg⁻¹proteína para a enguia e cerca de 1400 nmol.min⁻¹.mg⁻¹proteína para a truta, são superiores aos observados neste estudo, 65,7 nmol.min⁻¹.mg⁻¹proteína para a enguia e 68,7 nmol.min⁻¹.mg⁻¹proteína para a truta, provavelmente pelo facto de Fenet *et al.* (1998) terem utilizado animais de dimensões superiores. A idade é um dos factores que afecta a actividade desta enzima, verificando-se geralmente um aumento da actividade da GST à medida que os indivíduos crescem (Thompson, 1999). Também Frasco e Guilhermino (2002) observaram valores da mesma ordem de grandeza, cerca de 90 nmol.min⁻¹.mg⁻¹proteína para GST no guppy, *Poecilia reticulata*.

Os valores de actividade da AChE para a enguia, 39,3 nmol.min⁻¹.mg⁻¹proteína e para a truta, 59,8 nmol.min⁻¹.mg⁻¹proteína, determinados neste estudo, são próximos dos valores referidos na literatura para outras espécies de peixes. Por exemplo, Strum *et al.* (2000) referem um valor de cerca de 150 nmol.min⁻¹.mg⁻¹proteína para o esgana-gata, *Gasterosteus aculeatus*, e Frasco e Guilhermino (2002) indicam um valor de cerca de 100 nmol.min⁻¹.mg⁻¹proteína da AChE no guppy.

Conforme referido anteriormente, a actividade média da LDH é mais elevada na enguia do que na truta. Sendo conhecida a resistência da enguia europeia a níveis de oxigénio baixos e emersão temporária, poder-se-á levantar a hipótese de que os elevados níveis de LDH da enguia poderão contribuir para a sua resistência a condições de hipoxia. Lushchak *et al.* (1997) encontraram comportamento semelhante no mexilhão, *Mytilus galloprovincialis*. Os autores observaram que a actividade da LDH aumentava nas primeiras seis horas de anaerobiose e diminuía caso os organismos continuassem expostos ao ar.

A enzima Na⁺, K⁺ ATPase cria gradientes iónicos e eléctricos que são utilizados para a secreção de sais em água do mar e possivelmente para a absorção de iões em água doce (McCormick, 1993). Quando um peixe passa de água doce para água salgada, o que acontece com peixes anádromos como é o caso do salmão, deixa de ser feita a absorção dos iões Na⁺ e Cl⁻ através do epitélio branquial de um meio hiposmótico e passa a ser feita a excreção dos mesmos iões para um meio hiperosmótico. As mudanças na actividade da enzima Na⁺, K⁺ ATPase aquando da passagem dos animais para água do mar foram já extensivamente documentadas em peixes eurihalinos com um aumento de actividade observado poucos dias após a mudança para água do mar. A razão da baixa actividade da enzima Na⁺, K⁺ ATPase no caso dos animais mantidos em laboratório, tanto para a enguia como para a truta, pode ser devida ao facto de os animais se encontrarem num ambiente de equilíbrio osmótico e portanto não ser requerida uma actividade muito acentuada da enzima. Os valores de actividade da Na⁺, K⁺ ATPase em salmão-prateado, *Oncorhynchus kisutch*, cerca de 1 μmol. mg⁻¹proteína. h⁻¹ (McCormick e Bern, 1989; Wilson *et al.*, 2002), são superiores aos determinados neste estudo, 0,17 μmol/mg/h para a truta. Contudo, os peixes utilizados nesses estudos encontravam-se numa fase de desenvolvimento mais avançado do que as trutas utilizadas neste estudo, uma vez que foram analisadas as alterações na actividade enzimática aquando da transferência dos peixes da água doce para água salgada, altura em que os peixes já têm cerca de um ano e pesam entre 20 e 30 gramas. Em relação à enguia, Mayer-Gostan e

Lemaire (1991) referem valores de 11,95 $\mu\text{M Pi/h.mg}$ proteína que são ligeiramente superiores aos encontrados neste estudo, 0,07 $\mu\text{mol/mg/h}$. Os autores não especificam em que estado de desenvolvimento se encontrava a enguia quando o estudo foi realizado. Wilson *et al.* (2003) ao analisar a plasticidade osmoreguladora da enguia de vidro encontrou valores de cerca de 0,3 $\mu\text{mol. mg}^{-1}\text{proteína. h}^{-1}$ para a actividade da Na^+ , K^+ ATPase, similares ao valor por nós determinado.

Os efeitos de sólidos em suspensão têm sido estudados em diversas espécies de peixes, parecendo verificar-se uma maior mortalidade em animais de níveis tróficos baixos como as anchovas, peixes-rei ou juvenis de robalo-do-norte (Morton, 1976). Os estudos efectuados referem ainda diferenças de sensibilidade entre as espécies e entre estados de desenvolvimento da mesma espécie, assim como diferenças de sensibilidade ao tipo de partícula, granulometria e concentração de sólidos usada. As espécies mais resistentes à presença de sólidos em suspensão parecem ser as que vivem no sedimento ou a ele associadas (Sherk *et al.*, 1974). Provavelmente estas espécies foram sujeitas a pressão selectiva durante a sua evolução e desenvolveram mecanismos que lhes permitem resistir à presença de elevadas concentrações de sólidos na água.

Têm sido também referidos efeitos subletais que incluem o aumento da actividade dos organismos, a redução nas reservas de energia, a redução das trocas gasosas a nível das brânquias e a presença de quantidades consideráveis de sedimento no conteúdo estomacal (Sherk *et al.*, 1974).

Garric *et al.* (1990) analisaram os efeitos letais de dragagens na truta comum (*Salmo trutta*) e observaram que as mortalidades estavam relacionadas com o aumento dos sólidos em suspensão e com a diminuição da concentração de oxigénio dissolvido. Os autores referem que a diminuição da concentração de oxigénio dissolvido na água que pode levar a situações de hipoxia parece ter uma importância decisiva na mortalidade observada. Num outro estudo realizado com salmonídeos em que foram analisados os movimentos e condição física dos peixes aquando da descarga de sedimentos numa barragem, verificou-se que os peixes residentes nos locais de descarga, a jusante da barragem, apresentavam danos físicos e taxas de mortalidade superiores aos dos que viviam a montante da barragem (Bergstedt e Bergersen, 1997). Os autores referem um aumento da locomoção dos peixes nos locais de descarga que poderá ser devido a uma tentativa de fuga às partículas em suspensão ou à perda de pontos de referência visuais devido à obscuridade provocada pelas descargas. Os autores observaram, ainda, lesões provocadas pelos sedimentos em suspensão nas brânquias e na pele dos peixes,

concluindo que apenas 27% dos peixes a jusante da barragem tinham brânquias totalmente normais, contra 76% dos peixes a montante da barragem. Estas lesões parecem ter sido uma das principais causas de mortalidade, uma vez que tornam os seus portadores mais vulneráveis a doenças e a efeitos de poluentes.

Em 1974, Sherk e colaboradores efectuaram bioensaios com três espécies estuarinas, o robalo-do-norte (*Morone americana*), a roncadeira-de-pinta (*Leiostomus xanthurus*) e o menhadem (*Brevoortia tyrannus*) durante os quais os peixes foram expostos a “fuller’s earth”, caulinite e sedimentos naturais do rio Patuxent (EUA). A partir dos resultados obtidos, os autores propuseram uma escala de sensibilidade a sólidos em suspensão para peixes, com base na sua resposta à exposição a “fuller’s earth”. Nesta escala, espécies com valores de Concentração Letal a 10% (CL₁₀) superiores a 10 g/l⁻¹ são consideradas espécies tolerantes, espécies com valores de CL₁₀ entre 1 e 9,9 g/l⁻¹ são consideradas espécies sensíveis e espécies com valores de CL₁₀ inferiores a 0,9 g/l⁻¹ são consideradas muito sensíveis.

Os nossos resultados indicam que os valores de CL₁₀ serão próximos de 2 g/l⁻¹ e 0,055 g/l⁻¹ para a enguia e truta respectivamente. Utilizando a escala elaborada por Sherk *et al.* (1974) para classificar a sensibilidade de peixes à suspensão de sedimentos, pode-se concluir que a enguia é uma espécie tolerante aos sólidos em suspensão enquanto a truta é uma espécie altamente sensível.

Sherk *et al.* (1974) observaram, também, uma redução no consumo de oxigénio em espécies expostas a “fuller’s earth”. O robalo-muge e o robalo-do-norte, por exemplo, quando foram expostos a “fuller’s earth” e a sedimentos naturais do rio Patuxent reduziram o seu consumo de oxigénio. A concentrações mais elevadas, observaram que os sedimentos naturais afectavam os peixes do mesmo modo que o “fuller’s earth” (Morton, 1976), o que parece indicar que a composição química do sedimento também tem uma papel importante nos efeitos observados. Outro factor que estes investigadores observaram foi a influência do tamanho e a forma da partícula no bem estar dos peixes. Os sedimentos mais finos podem formar uma espécie de cobertura que afecta toda a estrutura branquial e isola o epitélio respiratório da água, provocando asfixia. Partículas maiores podem ficar presas nos filamentos branquiais diminuindo as trocas de gás e desenvolvendo anóxia. Quando as brânquias são afectadas as espécies com grandes exigências de oxigénio são as primeiras a morrer. Espécies com necessidades de oxigénio baixas só morrem a concentrações de sedimentos em suspensão muito elevadas. Sherk *et*

al. (1974) sugerem que as espécies menos tolerantes em relação a sólidos em suspensão deverem ser utilizadas em estudos para avaliação do impacto de dragagens.

Rogers (1969), também analisou a influência de diferentes partículas de sólidos em suspensão na saúde de três espécies de peixes, o bodião-do-norte (*Tautoglabros adspersus*), o espinhela (*Apeltes quadracus*) e o fundulo (*Fundulus heteroclitus*) usando diatomáceas e vasa. O autor observou que uma espécie como o fundulo podia suportar uma concentração de 300 g/l⁻¹, enquanto o espinhela apenas suportava 50 g/l⁻¹, aumentando a mortalidade com o aumento do tempo de exposição. O autor relata ainda que para as duas primeiras espécies as partículas com granulometria mais elevada eram as mais tóxicas. No caso de *F. heteroclitus*, observou-se o oposto. As diatomáceas, para este peixe, embora mais pequenas, são mais tóxicas que a vasa. Neste caso, o tamanho da partícula não é o único factor importante, tendo-se verificado que a forma da partícula também é importante. Efectivamente, a toxicidade elevada de diatomáceas apesar da sua granulometria baixa sugere que a forma da partícula também é um factor importante. As diatomáceas são caracterizadas por serem formadas por estruturas pontiagudas de sílica, em forma de agulha, enquanto as partículas de vasa, apesar de terem uma forma angular, não têm estruturas pontiagudas. Por esta razão, as diatomáceas poderão causar mais danos físicos (e.g. nas brânquias) do que as partículas de vasa.

Stickney (1973) não observou mortalidade em populações de peixes durante dragagens na costa Atlântica dos EUA. Notou ainda que, embora os peixes evitassem local de dragagem, não o abandonavam por completo. Stickney sugeriu que tal se devia a um aumento em invertebrados bênticos, fonte de alimento para muitos peixes, após as dragagens. Stickney também alertou para o facto de os impactos de dragagens em águas costeiras limpas não se podia comparar ao impacto de dragagens de sedimentos poluídos.

Ingle *et al.* (1955) analisaram os efeitos de elevadas concentrações de sedimentos em suspensão em três espécies de peixes: *Mugil curema*, *Fundulus similis* e *Cyprinidon variegatus*. Os autores observaram que a tainha (*M. curema*) era a espécie mais sensível. As brânquias deste peixe ficavam repletas de sedimento e o peixe morria por asfixia. No entanto, peixes moribundos colocados em água limpa conseguiam limpar as brânquias e recuperar.

A turbidez parece também ser factor determinante. Num estudo realizado em São Francisco, analisou-se a tolerância à turbidez de duas espécies de perca (*Phanerodon furcatus* e *Cymatogaster aggregata*), do robalo-muge (*Morone saxatilis*) e do cantarilho-bolina (*Sebastes auriculatus*). Observou-se que as duas espécies de perca eram as

menos tolerantes à turbidez enquanto as outras duas espécies toleravam bem uma turbidez elevada. Observou-se, ainda que peixes expostos a níveis de turbidez entre 500 e 2500 JTU (Jackson Turbidity Units) tinham tendência para concentrar DDT e os seus metabolitos (DDE e DDD) em tecidos adiposos (U. S. Fish and Wildlife Service 1970; *in* Morton, 1976).

Durante dragagens pode ocorrer uma mudança na composição do sedimento assim como na distribuição das suas partículas. Esta mudança pode interferir com a capacidade reprodutiva das espécies de peixes por destruição de ovos submersos ou impossibilitando o peixe de escavar o sedimento afim de neles depositar os ovos. Em experiências laboratoriais, Bayliss (1968) observou um elevado número de posturas por parte do robalo-muge em sedimento grosseiro enquanto que em sedimentos finos esse número era muito baixo. Uma redução significativa na capacidade reprodutiva de uma espécie resultante de danos provocados nos locais de postura pode constituir uma ameaça maior à sobrevivência da espécie do que efeitos induzidos na população já existente (Ricker, 1945). No entanto, nem sempre as alterações do sedimento são nefastas. Por exemplo, a criação de um leito arenoso ou vasosos pode ter efeitos benéficos em algumas espécies de peixe. Richards (1963) analisou os conteúdos estomacais de indivíduos de uma espécie de solha, *Pseudopleuronectes americanus*, e do sargo da América do Norte, *Stenotomus chrysops*, tendo verificado que poliquetas, comuns em leitos vasosos constituíam grande parte de suas dietas. Saila *et al.* (1972) sugerem que se este género de animais, típicos de leitos vasosos se desenvolvessem após a realização de dragagens, estas espécies de peixes e outras que tenham o mesmo tipo de dietas podem beneficiar com as dragagens.

Do acima referido, pode concluir-se que existem vários factores que influenciam os efeitos da presença de sólidos em suspensão em populações de peixes, pelo que a sua avaliação deve ser efectuada de forma cuidada, tendo em consideração a espécie em causa, as componentes bióticas e abióticas do ecossistema e, no caso da extracção de inertes, a metodologia utilizada.

A grande maioria dos trabalhos efectuados para avaliação dos efeitos de sólidos em suspensão em populações de peixes baseia-se na mortalidade e nos danos físicos induzidos. A utilização de biomarcadores neste tipo de avaliação tem sido escassa e os estudos efectuados pretendem sobretudo diagnosticar ou avaliar efeitos de agentes químicos eventualmente presentes no sedimento. Por exemplo, Regoli *et al.* (2002) num estudo com material dragado no mediterrâneo, observaram uma indução nas enzimas

EROD e GST, o que levou os investigadores a concluir que nos locais de dragagens existiam substâncias nocivas, possivelmente HAP ou PCB, entre outros, uma vez que a indução das referidas enzimas está relacionada com a presença desses compostos no meio.

Como foi já referido, neste estudo estudou-se o efeito de sólidos em suspensão em parâmetros bioquímicos da enguia europeia e da truta, nomeadamente na actividade das enzimas AChE, GST, LDH e Na^+ , K^+ ATPase. Os resultados obtidos indicam que não houve efeitos significativos em nenhuma das enzimas em peixes de ambas as espécies expostos a sólidos em suspensão. Este resultado é importante, indicando que a presença de sólidos em suspensão não interfere com estes parâmetros, pelo que estes poderão ser utilizados para diagnosticar a presença ou avaliar efeitos de agentes químicos presentes em sedimentos dragados ou na coluna de água na sequência de dragagens.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

As concentrações de sólidos em suspensão necessárias para provocar a morte de peixes são geralmente muito mais elevadas do que as encontradas no meio natural. Embora pontualmente, se possam verificar elevadas concentrações de sólidos em suspensão aquando da realização de dragagens, os peixes são normalmente capazes de evitar a exposição deslocando-se para zonas com menores concentrações.

A morte devida a sólidos em suspensão parece depender de vários factores, incluindo a espécie, as condições abióticas do local, o tipo e as características das partículas. A causa de morte mais frequente parece ser por anóxia que pode ser devida a danificação das brânquias, redução do consumo de oxigénio ou outras causas. O tipo, a dimensão e a forma das partículas parecem exercer grande influência nos efeitos provocados pelas partículas em suspensão nos peixes. A temperatura da água e composição química da água também parecem ser factores importantes.

Alguns efeitos subletais de sólidos em suspensão referidos na literatura para peixes são reduções de trocas gasosas ao nível das brânquias, lesões nas brânquias e na pele, presença de elevadas quantidades de sedimento no sistema digestivo, redução das reservas metabólicas e aumento da locomoção. Deve, no entanto, ser referido que estes estudos se referem sobretudo a experiências laboratoriais onde os peixes foram submetidos a concentrações de sólidos em suspensão muito superiores às observadas em situações reais, nomeadamente durante dragagens ou tempestades violentas, sendo também os períodos de exposição de modo geral consideravelmente mais longos. Concentrações observadas de sólidos em suspensão em estuários e rios raramente ultrapassa 0,5 g/l e os períodos de dragagem raramente ultrapassam as duas horas. É também preciso ter em conta que os peixes durante as experiências estão confinados a um espaço reduzido e fechado. Se estivessem no rio ou estuário, os peixes poderiam evitar o local de dragagem ou simplesmente abandonar esse local. Seriam precisos mais estudos para correlacionar estes resultados. Praticamente toda a literatura existente é referente aos Estados Unidos da América, é antiga e cada exemplo é único. Por esse motivo, é conveniente desenvolver mais estudos com espécies europeias e, se possível, em condições semelhantes às que se verificam nos nossos ecossistemas.

Duas observações que merecem consenso na literatura é que as espécies bentónicas toleram melhor os sólidos em suspensão que espécies filtradoras e que numa mesma espécie os juvenis são mais sensíveis que os adultos.

Os resultados deste estudo estão de acordo com os resultados encontrados na literatura. Não foram encontrados efeitos significativos por parte dos sólidos em suspensão na enguia europeia e na truta arco-íris, exceptuando em concentrações muito elevadas onde ocorreu a morte dos animais. É de referir que essas concentrações são muito superiores às encontradas em condições naturais, mesmo durante a extracção de inertes. O facto de não terem sido observados efeitos significativos nas enzimas AChE, GST, LDH e Na^+ , K^+ -ATPase indica que estas enzimas poderão ser utilizadas para diagnosticar a presença e/ou efeito de agentes químicos em sedimentos dragados ou na coluna de água em zonas de dragagem.

A avaliação dos impactos de dragagens em peixes é complexa, pois muitas espécies vivem em cardumes, têm uma distribuição variada e são animais extremamente móveis. Devido a essa mobilidade, os peixes podem, e têm tendência a evitar as zonas de dragagem, minimizando os efeitos dessa actividade, ao contrário do que acontece com outros organismos. É preciso, no entanto, salientar que a extracção de inertes pode ter um impacto negativo considerável em zonas de posturas, zonas de crescimento ou zonas de alimentação.

O conhecimento do ciclo de vida, ecologia e padrões de distribuição dos peixes permite adoptar medidas que possam mitigar os efeitos das dragagens em populações de peixes, incluindo a selecção de locais de dragagem, época e duração das dragagens e locais de deposição do material dragado.

6. Referências Bibliográficas

- Almeida-Val, V., M. e Val, A., L. (1993) **Evolutionary trends of LDH isoenzymes in Fishes.** *Comp. Biochem. Physiol.* **105B**: 21-28.
- Antunes, J. C. (2002) **Monitoring of glass eel recruitment in Portugal.** *In*: Dekker W. (ed) *Monitoring of glass eel recruitment.* Netherlands Institute of Fisheries Research, IJmuiden, the Netherlands, report C007/02-WD, 2B: 219-226.
- Armknecht, S. L., Kaattari, S. L., e Van Veld, P. A. (1998) **An elevated glutathione S-transferase in creosote-resistant mummichog (*Fundus heteroclitus*).** *Aquat. Toxicol.* **41**, 1-16.
- Bastian, D. F. (1974) **Effects of open-water disposal of dredge material on bottom topography along Texas Gulf Coast.** U. S. Army Eng. Waterw. Exp. Stn., Vicksburg, Miss. DMRP [Dredged Mater. Res. Program] Misc. Pap. **D-74-13**. 1-22.
- Bassoullet, P. e Guillaud J. F. (1999) **Les techniques de dragage et de rejet.** *In*: *Dragages et environnement marin: État des connaissances.* Nantes: Ifremer. 17-23.
- Bayliss, J., D. (1968) **Stripped bass hatching and hybridization experiments.** *Proc. Annu. Conf. Southeast. Game Fish Comm.* **21**: 233-244.
- Bergstedt, L. C. e Bergersen, E. P. (1997) **Health and movements of fish in response to sediment sluicing in the Wind river, Wyoming.** *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* **54**: 312-319.
- Bernardo, J. M. A. O. (1990) **Dinâmica de uma lagoa costeira eutrófica (Lagoa de Santo André).** *Tese de Doutoramento,* Universidade de Lisboa, Faculdade de Ciências.

- Bessa, R. (1996) **A espécie *Anguilla anguilla* Linnaeus, 1758 (Enguia Europeia), sua importância em aquacultura e metodologia do cultivo.** *Relat. Cient. Téc. Inst. Port. Invest. Marít.*, **28**, 1-45.
- Boëtius, J. e Harding, E. F. (1985a) **A re-examination of Johannes Schmidt's Atlantic eel investigations.** *Dana*. **4**: 129-162.
- Boyd, M. B., Saucier, R T., Keeley, J. W., Montgomery, R. L., Brown, R. D., Manthis, D. B. e Guice, C. J. (1972) **Disposal of dredge spoil problem identifications and assessment and research program development.** U. S. Army Eng. Waterw. Exp. Stn., Vicksburg, Miss. DMRP Miss. Tech. Rep.. **H-72-8**. 1-121.
- Bradford, M. (1976) **A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.** *Anal. Biochem.*, **72**: 248-254.
- Broustal, D. (1988) **Les secrets de la civelle.** *France Pêche Internationale*, **326**: 36-37
- Brown, C. L., e Clark, R. (1968) **Observations on dredging and dissolved oxygen in a tidal waterway.** *Water Resour. Res.* **4**:1381-1384.
- Cantrelle, I. (1984) **Les populations de civelles d'*Anguilla anguilla* L. en Migration dans l'estuaire de la Gironde.** *Vie Milieu*, 1984, **34**: 109-116.
- Carricker, M. R. (1967) **Ecology of estuarine benthic invertebrates: a perspective.** *In*: G. H. Lauff, ed. *Estuaries Am. Assoc. Adv. Sci. Publ.* **83**. Washington, D. C. 442-487.
- Carvalho, A. M. G. (1967) **Significado Geológico dos Minerais das Argilas.** Volume IX, Fasc. III-IV, Lisboa.
- Coles, B. e Ketterer, B. (1990) **The role of glutathione and glutathione transferases in chemical carcinogenesis.** *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **25**: 47-70.

- Cormier, S. M. e Daniel, F. B. (1994) **Biomarkers: Taking the science forward.** *Environ. Toxicol. Chem.* **13**: 1011-1012.
- Corotto, F. S. e Holliday, C. W. (1996) **Branchial Na, K - ATPase and osmoregulation in the purple shore crab, *Hemigrapsus nudus* (Dana).** *Comp. Biochem. Physiol.*, **113A**: 361-368.
- Crisp, D. T. (1993a) **Population densities of juvenile trout (*Salmo trutta*) in five upland streams and their effects upon growth, survival and dispersal.** *J. App. Ecol.* **30**: 759-771.
- Crisp, D. T. (2000) Trout and Salmon – Ecology, Conservation and Rehabilitation. (1st Edition) Fishing News Books. A division of Blackwell Science Ltd.
- Crisp, D. T. e Carling, P. A. (1989) **Observations on sitting, dimensions and structure of salmonid redds.** *J. Fish Biol.* **34**: 119-34.
- Deeler, C. L. (1985) **Exposé synoptique des données biologiques sur l'anguille.** FAO, synopsis sur les pêches, (80), Révision I.
- Diamantino, T. C., Almeida, E., Soares, A. M. V. M. e Guilhermino, L. (2001) **Lactate dehydrogenase activity – an effective parameter in aquatic toxicity tests.** *Chemosphere.* **45**: 553-560.
- Domingos, I. M. M. (2003) **A enguia europeia *Anguilla anguilla* (L., 1758), na bacia hidrográfica do Rio Mondego.** *Tese de doutoramento.* Universidade de Lisboa, Faculdade de Ciências.
- Elliot, J. M. (1994) Quantitative Ecology and the Brown Trout. Oxford University Press, Oxford.
- Ellman, G. L., Courtney, K. D., Andres, V. e Featherstone, R.M. (1961) **A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity.** *Biochem. Pharmacol.* **7**: 88-95.

- Fahy, E. (1983) **Food and gut parasite burden of migratory trout *Salmo trutta* L. in the sea.** *Irish Naturalists Journal*. **21**: 11-18.
- Fahy, E. (1985) **Feeding, growth and parasites of trout *Salmo trutta* L. from Mulroy Bay, an Irish sea lough.** *Irish Fishery Investigations*. **25**: 1-12.
- Fenet, H., Casellas, C. e Bontoux, J. (1998) **Laboratory and field-caging studies on hepatic enzymatic activities in European eel and rainbow trout.** *Ecotox. Environ. Saf.* **40**: 137-143.
- Finiger, R. e Yahyaoui, A. (1989) **La microstructure de l'otolithe au service de la connaissance du développement larvaire de l'Anguille européenne *Anguilla anguilla*.** *C. R. Acad. Sci. Paris*. **308**: 1-7.
- Finney, D. J. (1971) *Probit Analysis*. Third Edition. New York: Cambridge press.
- Frasco, M. F. e Guilhermino, L. (2002) **Effects of dimethoate and beta-naphthoflavone on selected biomarkers of *Poecilia reticulata*.** *Fish Physiol. Biochem.* **26**: 149-156.
- Gandolfi, G., Pesaro, M. e Tongiorgi, P. (1984) **Environmental factors affecting the ascent of elvers, *Anguilla anguilla* (L.), into the Arno River.** *Oebalia*, Vol. X, N. S.: 17-35.
- Garric, J., Migeon, B. e Vindimian, E. (1990) **Lethal effects of draining on brown trout. A predictive model based on field and laboratory studies.** *Wat. Res.* **24**: 59-65.
- Gault, J. (1986) **L'élevage de l'anguilla.** *In*: *Aquaculture* (G. BARNABÉ). Technique et Documentation (Lavoisier), Paris. 739-741.
- Gousset, B. (1992) **Eel culture in Japan.** *Bulletin de l'Institut Océanographique* (Monaco). Numéro spécial, **10**: 1-128.

- Guilhermino, L., Lopes, M. C., Carvalho, A. P. e Soares, A. M. V. M. (1996) **Inhibition of acetylcholinesterase activity as effect criterion in acute tests with Juvenile *Daphnia magna*.** *Chemosphere*. **32**: 727-738.
- Habig, W. H., Pabst, M. J. e Jakoby, W. B. (1974) **Glutathione S-transferases – The first enzymatic step in mercapturic acid formation.** *J. Biol. Chem.* **249**: 7130-7139.
- Hellier, T. R. Jr., e Kornicker, L. S. (1962) **Sedimentation from a hydraulic dredge in a bay.** *Publ. Inst. Mar. Sci., Univ. Tex.* **8**:212-215.
- Hodson, P. V., Klopper-Sams, P. J., Munkittrick, K. R., Lockhart, W. L., Metner, D. A., Luxon, P. L., Smith, I. R., Gagnon, M. M., Servos, M. e Payne, J. F. (1991) **Protocols for measuring mixed function oxygenases of fish liver.** *Canadian Technical Report of Fisheries and Aquatic Sciences* 1829.
- Horisberger, J. D., Lemas, V., Kraehenbuhl, J. P. e Rossier, B., C. (1991) **Structure-function relationship of Na⁺, K⁺ - ATPase.** *A. Rev. Physiol.* **53**: 565-584.
- Huntingford, F. A. e De Laeniz, C. G. (1997) **Social dominance and the acquisition of profitable feeding sites in juvenile Atlantic salmon.** *J. Fish Biol.* **51**: 1009-1014.
- Ingle, R. M., Ceurvels, A. R. e Leinecker, R. (1955) **Chemical and biological studies of the muds of Mobile Bay.** *In Report to the division of seafood, Alabama Department of Conservation. Univ. Mani Contrib.* **139**: 1-14.
- Jokiel, P. L. (1989) **Effects of Marine Mining Dredge Spoils on Eggs and Larvae of a Commercially Important Species of Fish, the Mahimahi (*Coruphaena hippurus*).** *Marine Mining.* **8**: 303-315.
- Jones, J. W. e Ball, J. N. (1954) **The spawning behavior of Brown trout and salmon.** *J. Animal Behav.* **2**: 103-14.

- Jorge, I. e Sobral, M. (1989) **Contribuição para o conhecimento da pescaria do meixão (*Anguilla anguilla* L.) – Dados preliminares sobre a eficiência das principais artes de pesca e importância das capturas acessórias no estuário do Mondego.** Relat. Téc. Cient. INIP, Lisboa. 16: 1-82.
- Kaplan, E. H., Welker, J. R. e Kraus, M. G. (1974) **Some effects of dredging on populations of macro benthic organisms.** U.S. Natl. Mar. Fish. Serv., *Fish. Bull.* 72: 445-480.
- Keeley, J. W. e Engler, R. M. (1974) **Discussion of regulatory criteria for ocean disposal of dredged materials: elutriate test rationale and implementation guidelines.** U. S. Army Eng. Waterw. Exp. Stn., Vicksburg, Miss. DMRP Misc. Pap. D-74-14. 1-18.
- Kennedy, G. J. A. (1982) **Factors affecting the survival and distribution of salmon (*Salmo salar* L.) stocked in upland trout (*Salmo trutta* L.) streams in Northern Ireland.** *E.I.F.A.C. Technical Paper*, 42: 227-42.
- Kleckner, R. C. e McCleave, J. D. (1988) **The northern limit of spawning by Atlantic eels (*Anguilla* spp.) in the Sargasso Sea in relation to thermal fronts and surface water masses.** *J. Mar. Res.* 46: 647-667
- Knights, B. (1991) **Contamination of eels by organochlorine and heavy metal residues.** EIFAC Working Party on Eel, Dublin, May, 1-6.
- Knights, B. (1994) **Contamination of eels, Review 1993 – 4.** EIFAC Working Party on Eel, Oviedo, September, 1-4.
- Kracht, R. e Tesch, F. W. (1981) **Progress report on the eel expedition of R. V. ‘Anton Dohrn’ and R. V: ‘Friedrich Heinecke’ to the Sargasso Sea 1979.** *Environ. Biol. Fish.* 6: 371-375.

- Leaver, M. J., Clarke, D. J. e George, S. G. (1992) **Molecular studies of the phase II xenobiotic conjugative enzymes of marine Pleuronectid flatfish.** *Aquat. Toxicol.* **22**: 265-278.
- Lecomte-Finiger, R. (1984) **Cycle biologique et problématique de l'anguille européenne *Anguilla anguilla* L. 1758.** Point actuel des connaissances. *Année Biol.*, **23**: 339-366.
- Lecomte-Finiger, R. (1991) **Situation actuelle des méthodes d'évaluation de l'âge de l'anguille, *Anguilla anguilla*.** Colloque National, Bondy, France, 4 – 6 Mars, ORSTOM – NRA, 103-108.
- Lecomte-Finiger, R. (1992a) **Growth history and age at recruitment of European glass eels (*Anguilla anguilla*) as revealed by otolith microstructure.** *Mar. Biol.* **114**: 205-210.
- Lecomte-Finiger, R. (1994) **Les stades larvaires (leptocéphales et civelles) de l'anguille européenne (*Anguilla anguilla* L. 1758) : migrations et métamorphose.** *Ann. Biol.* **33**: 1-17.
- Lee, G. F., e Plumb, R. H. (1974) **Literature review on research study for the development of dredged material disposal criteria.** Inst. Environ. Stud., Univ. Texas, Dallas. . U. S. Army Eng. Waterw. Exp. Stn., Vicksburg, Miss. DMRP [Dredged Mater. Res. Program] Misc. Pap. **D-74-1**. 1-145.
- Lushchak, V. I., Bahnjukova, T. V. e Spichenkov, A. V. (1997) **Modification of pyruvate kinase and lactate dehydrogenase in foot muscle of the sea mussel *Mytilus galloprovincialis* under anaerobiosis and recovery.** *Braz. J. Med. Biol. Res.* **30**: 381-385.
- Mackin, J. G. (1961) **Canal dredging and silting in Louisiana bays.** Publ. Inst. Mar Sci., Univ. Tex. **7**:262-314.

- Markert, C. L. (1984) **Lactate dehydrogenase – biochemistry and function of lactate dehydrogenase.** *Cell. Biochem. Function.* **2**: 131-134.
- Maurer, D., Biggs, R., Leethem, W., Kinner, P., Treasure, W., Otley, M., Watling, L. e Klemas V. (1974) **Effect of spoil disposal on benthic communities near the mouth of Delaware Bay.** College of Marine Studies, Univ. of Delaware, Lewes and Newark. 1-231.
- May, E. B. (1973b) **Environmental effects of hydraulic dredging in estuaries.** *Ala. Mar. Resour. Bull.* **9**:1-85.
- Mayer-Gostan, N. e Lemaire, S. (1991) **Measurements of fish gill ATPases using microplates.** *Comp. Biochem. Physiol.* **9**: 323-326.
- McCleave, J. D. (1993) **Physical and behavioural controls on the oceanic distribution and migration of leptocephali.** *J. Fish Biol.* **43** (Suppl. A): 243-273.
- McCleave, J. D., Kleckner, R.C. e Castonguay, M. (1987) **Reproductive sympatry of American and European eels and implications for migration and taxonomy.** *American Fisheries Society Symposium*, **1**: 286-297
- McCleave, J. D., Brickley, P. J., O'Brien, K. M., Kistner, D. A., Wong, M. W., Gallagher, M. e Watson, S. M. (1998) **Do leptocephali of the European eel swim to reach continental waters? Status of the question.** *J. Mar. Biol. Assoc. U. K.* **78**: 285-306.
- McCormick, S. D. e Bern, H. A. (1989) **In vitro stimulation of Na⁺, K⁺- ATPase activity and ouabain binding by cortisol in coho salmon gill.** *A. J. Physiol.* **256**: R707-R715.
- McCormick, S. D. (1993) **Methods for nonlethal gill biopsy and measurement of Na⁺, K⁺ - ATPase activity.** *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* **50**: 656-658.

- McDowall, R. M. (1988) **Diadromy in Fishes: Migrations between Freshwater and Marine Environments**. Croom Helm, London, 1-308.
- Metcalf, N. B. e Thorpe, J. E. (1992) **Anorexia and defended energy levels in overwintering juvenile salmonids**. *J. Animal Ecol.*, **61**: 175-81.
- Moniz, B. (1999) **Diálogo com interlocutores a nível nacional. Pescas e conservas de peixe**. Observatório do Emprego e Formação Profissional.
- Moore, A. e Scott, A. (1988) **Observations on recently emerged sea trout, *Salmo trutta* L., fry in chalk stream using a low-light underwater camera**. *J. Fish Biol.* **33**: 959-969.
- Morton, J. W. (1976) **Ecological impacts of dredging and dredge spoil disposal**. A literature review. M. S. Thesis. Cornell University, Ithaca, N. Y., 1-112.
- Nelson, J. S. (1994) **Fisheries of the World**. John Wiley & Sons, New York, 1-600.
- Netboy, A. (1978) **Mysteries of eel migrations**. *The International Wildlife Magazine*, **2**: 83-85.
- Oertel, G. F. (1975) **Report of the hydraulic and sedimentologic study of the offshore spoil disposal area, Savannah, Georgia**. Final Report to U.S. Army Corps of Engineers District, Savannah, Skidway Institute of Oceanography, Savannah, Ga.
- Peakall, D. B. (1992) **Animal biomarkers as pollution indicators**. First Edition. London: Chapman and Hall.
- Peakall, D. B. (1994) **The role of biomarkers in environmental assessment (1). Introduction**. *Ecotoxicology*. **3**: 157-160.
- Pemberton, R. A. (1976b) **Sea trout in North Argyll sea lochs: 2. Diet**. *J. Fish Biol.* **9**: 195-208.

- Pratt, S. D. e O'Connor T. P. (1973) **Burial of dredge spoil in Long Island Sound. Marine Science Experiment Station.** Graduate School of Oceanography, Univ. Rhode Island, for Normandeau Assoc., Inc., Manchester, N.H. 1-37.
- Quinn, T. R. e Tallman, R. F. (1987) **Seasonal environment predictability and homing in riverine fishes.** *Environ. Biol. Fishes*, **18**: 155-9.
- Radford, A. F., Hatcher, A. e Whitmarsh, D. (1991) **An Economic evaluation of salmon fisheries in Great Britain.** Report prepared by University of Portsmouth Centre for the Economics and Management of Aquatic Resources for the Ministry of Agriculture, Fisheries and Food. **Volume I, 1-292; II, 1-54;** and Summary, 1-32.
- Regoli, F., Pellegrini, D., Winston, G. W., Gorbi, S., Giuliani, S., Virno-Lamberti, C. e Bompadre, S. (2002) **Application of biomarkers for assessing the biological impact of dredged materials in the Mediterranean: the relationship between antioxidant responses and susceptibility to oxidative stress in the red mullet (*Mullus barbatus*).** *Mar. Poll. Bull.* (in press).
- Richards, S. W. (1963) **The demersal fish population of Long Island Sound. II. Food of the juveniles from a sand-shell locality. III. Food of the juveniles from a mud locality.** *Bull. Bingham Oceanogr. Collect.* Yale Univ. **18**: 32-101.
- Ricker, W. E. (1945) **Natural mortality among Indiana bluegill sunfish.** *Ecology*. **26**: 111-121.
- Rochon, R. (1985) **Problems associated with dredging operations on the St. Lawrence.** Report EPS4/MA/1.
- Rodriguez, O. e Alvarino, A. (1951) **Anguilas y anguilas – Biología, Pesca y Consumo.** Madrid, 1-95.
- Rogers, B. A. (1969) **The tolerance of fishes to suspended solids.** M.S. Thesis, Univ. Rhode Island, Kingston.

- Saila, S. B., Pratt, S. D. e Polgar, T. T. (1972) **Dredge spoil disposal in Rhode Island Sound. Univ. Rhode Island. Mar. Tech. Rep. 2:** 1-48.
- Schmidt, J. (1906) **Contributions to the life-history of the eel (*Anguilla vulgaris*, Flem.).** *Rapports et Procès-verbaux des Réunions du Conseil International pour l'Exploration de la Mer*, **5:** 137-264.
- Schmidt, J. (1922) **The breeding places of the eel.** *Philosophical Transactions of the Royal Society of London, Series B.* **211:** 179-208.
- Schmidt, J. (1925) **The breeding places of the eel.** *Annual Report of the Smithsonian Institution.* **1924:** 279-287.
- Sherk, J. A., O'Connor, J. M., Neumann, D. A., Prince, R. D. e Wood K.V. (1974) **Effects of suspended and deposited sediments on estuarine organisms.** Final Rep. No. 74-20. Univ. Maryland, Nat. Resour. Inst., Prince Frederick. 1-259.
- Shikano, T. e Fujio, Y. (1998) **Relationships of salinity tolerance to immunolocalization of Na⁺, K⁺ - ATPase in the gill epithelium during seawater and freshwater adaptation of the guppy, *Poecillia reticulata*.** *Zool. Sci.* **15:** 35-41.
- Sinha, V. R. e Jones, J. W. (1975) **The European freshwater eel.** Liverpool Univ. Pr., 1-146.
- Simmons, H. B. (1965) **Channel depth as a factor in estuarine sedimentation.** In Proceedings of the Federal Inter-Agency Sedimentation Conference 1963, U. S. Dep. Agric. Misc Publ. 970. 722-730.
- Sleiderink, H. M., Oostingh, I., Goksøyr, A. e Boon, J. P. (1995) **Sensitivity of Cytochrome P450 1A Induction in Dab (*Limanda limanda*) of Different Age and Sex as a biomarker for Environmental Contaminants in the Southern North Sea.** *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **28:** 423-430.

- Slotta, L. S., Sollit, C. K., Bella, D. A., Hancock, D. R., McCauley, J. E., e Parr, R. (1973) **Effects of hopper dredging and in channel spoiling in Coos Bay, Oregon.** Oregon State Univ., Corvallis. 1-141.
- Sousa Lopes, A. S. J., Melo Cabral, C. M. F. e Silva, R. M. C. (1999) Resíduos de Quimioterápicos na Aquacultura – Perigos para a Saúde Pública. Universidade Técnica de Lisboa.
- Stickney, R. R. (1973) **Effects of hydraulic dredging on estuarine animal studies.** World Dredging Mar. Const. 34-37.
- Strum, A., Wogram, J., Segner, H. e Liess, M. (2000) **Different sensitivity to organophosphates of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase from three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus*): application in biomonitoring.** *Environ. Toxicol. Chem.* **19**: 1607-1615.
- Tesch, F. W. (1977) *The eel: biology and management of anguillid eels.* Chapman and Hall Ltd, London, 1-434.
- Tesch, F. W. (1991) **Anguillidae.** In: H. Hoestlandt (ed.), *The Freshwater Fishes of Europe.* Vol. 2. Aula-Verlag, Wiesbaden. 388-447.
- Tesch, F. W. (2003) **The Eel.** Fifth Edition. Blackwell Science Ltd, a Blackwell Publishing Company.
- Tesch, F. W. e Deeler, C. L. (1978) **Catches of metamorphosing eel larvae (*Anguilla anguilla* L.) between Europe and Açores and some remarks on their development under laboratory conditions.** I.C.E.S. C.M. 1978/M : 21.
- Thompson, H., M. (1999) **Esterases as Markers of Exposure to Organophosphates and Carbamates.** *Ecotoxicology.* **8**: 369-384.
- Thorpe, J. E. (1994) **Significance of straying in salmonids and implications for ranching.** *Aquaculture and Fisheries Management,* **25**: 183-190.

- Usdin, E. (1970) Reactions of cholinesterases with substrates, inhibitors and reactivators. In Karczmar AG, ed, *Anticholinesterase Agent*. Pergamon, Elmsford, NY. USA, 47-354.
- Usui, A. (1974) Eel culture. Fish. News (Books) Ltd. London, 1-185.
- Van der Weiden, M. E. J., de Vries, L. P., Fase, K., Celander, M., Seinen, W. e Van der Berg, M. (1994) **Relative potencies of polychlorinated dibenzo-p-dioxins (PCDDs), dibenzofurans (PCDFs) and biphenyls (PCBs) for cytochrome P4501A induction in the mirror carp (*Cyprinus carpio*)**. *Aquat. Toxicol.* **29**: 163-182.
- Vassault, A. (1983) **Lactate dehydrogenase**. In: *Methods of Enzymatic Analysis, Vol. III, Enzymes: Oxireductases, Transferases*; 3rd ed.; Academic Press, NY; 118-126.
- Vontas, J. G., Small, G. J. e Hemingway, J. (2001) **Glutathione S-transferases as antioxidant defense agents confer pyrethroid resistance in *Nilaparvata lugens***. *Biochem. J.* **357**: 65-72.
- Wakeman, T. H. (1974) **Release of trace constituents from sediments resuspended during dredging operations**. U.S. Army Corps of Engineers, San Francisco. American Chemical Society Conference, Atlantic City, N.J., 11 Sept. 1-9.
- Westin, L. (1998) **The spawning migration of European eel (*Anguilla anguilla* L.) with particular reference to stocked eel in the Baltic**. *Fisheries Research.* **38**: 257-270.
- Williams, G. C. e Koehn, R. K. (1984) **Population genetics of North Atlantic catadromous eels (*Anguilla*)**. In B. J. Turner (ed.), *Evolutionary genetics of fishes*. Plenum Press, New York, 229-560.

Wilson, J. M., Whiteley, N. M. e Randall, D. J. (2002) **Ionoregulatory changes in the gill epithelia of coho salmon during seawater acclimation.** *Physiol. Biochem. Zool.* **75**: 237-249.

Wilson, J. M., Antunes, J. C., Bouça, P. D. e Coimbra, J. (2003) **Osmoregulatory plasticity of the glass eel (*Anguilla anguilla*): Freshwater entry and changes in branchial ion transport protein expression.** *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* (in press).

Windom, H. L. (1973) **Processes responsible for water quality changes during pipeline dredging in marine environments.** Proc. World Dredging Conf. (WODCON Assoc., San Pedro, Calif.) **5**: 761-806.