

Helga Marisa Pais das Neves

**Avaliação ecotoxicológica da Barrinha de Esmoriz, utilizando
uma análise integrada de biomarcadores enzimáticos e
histopatológicos**

Universidade Fernando Pessoa

Faculdade de Ciência e Tecnologia

Porto 2012

Mestrado em Engenharia e Gestão Ambiental

Helga Marisa Pais das Neves

**Avaliação ecotoxicológica da Barrinha de Esmoriz, utilizando
uma análise integrada de biomarcadores enzimáticos e
histopatológicos**

Universidade Fernando Pessoa

Faculdade de Ciência e Tecnologia

Porto 2012

Mestrado em Engenharia e Gestão Ambiental

Mestrado em Engenharia e Gestão Ambiental

Avaliação ecotoxicológica da Barrinha de Esmoriz, utilizando uma análise integrada de biomarcadores enzimáticos e histopatológicos

Discente:

Helga Marisa Pais das Neves

Orientador:

Prof. Doutor Bruno André Fernandes de Jesus da Silva Nunes

Co-orientador:

Prof. Doutor Alberto Teodorico Correia

Dissertação apresentada à Universidade Fernando Pessoa como parte dos requisitos para obtenção do grau de mestre em Engenharia e Gestão Ambiental

Resumo

A degradação dos sistemas aquáticos é resultado das actividades antropogénicas que aumentam continuamente as pressões sobre o meio ambiente, através da introdução de compostos xenobióticos de origem industrial, agrícola e doméstica no biota. O presente estudo recorreu à utilização de uma bateria de biomarcadores enzimáticos e histopatológicos, ferramentas importantes na detecção precoce de efeitos causados pela contaminação química, para avaliar o estado dos organismos presentes na Barrinha de Esmoriz. O objectivo do presente estudo foi biomonitorizar e avaliar os efeitos da contaminação química na Barrinha de Esmoriz, um sistema estuarino, em peixes (*Gambusia holbrooki* e *Anguilla anguilla*) através da quantificação das actividades das enzimas acetilcolinesterase (AChE), catalase (CAT), glutathione-S-transferases (GSTs) e lactato desidrogenase (LDH), e da análise de alterações em tecidos biológicos, como as brânquias e o fígado. Para isso, foi seleccionado o Rio Minho como local de referência e a Pateira de Fermentelos como um local com diferente tipologia de contaminado, de modo a detectar as respostas à presença de contaminantes nos biomarcadores seleccionados. Os resultados sugerem a existência de contaminação na Barrinha de Esmoriz, observável pela inibição da actividade da enzima AChE, em ambas as espécies analisadas, onde os indivíduos analisados revelaram perturbações no sistema de neurotransmissão. Quanto à actividade das enzimas CAT e as GSTs, os indivíduos de *A. anguilla* da Barrinha de Esmoriz apresentaram sinais indicativos da ocorrência de stress oxidativo. No entanto, o mesmo não foi observado nos indivíduos de *G. holbrooki*. A inibição da actividade da enzima LDH, nos indivíduos de ambas as espécies, evidencia que estes estão sob stress químico, reflectido por alterações da actividade respiratória tecidular. Aparentemente, as alterações verificadas nas actividades nos biomarcadores enzimáticos podem ter sido causados pela exposição a agentes metálicos. Os biomarcadores histopatológicos reforçam este cenário, pois é possível observar uma tendência nos índices patológicos das brânquias e do fígado, com uma crescente incidência de patologias nos órgãos-alvo analisados. O grau de severidade das lesões observadas é leve a moderado, sugerindo que podem ser reversíveis, eliminando o agente causador. Os dados indicam de forma clara que existe um cenário de

contaminação na Barrinha de Esmoriz e com danos observáveis em *G. holbrooki* e *A. anguilla*.

Abstract

The degradation of aquatic systems is a result of anthropogenic activities that continually increase the pressures on the environment by introducing xenobiotic compounds from industrial, agricultural and domestic sources. This study used a battery of enzymatic and histopathological biomarkers, as an important tool for early detection of effects caused by contamination, to assess contamination effects in Barrinha of Esmoriz. The purpose of this study was biomonitoring and evaluating the effects of chemical contamination in the Barrinha of Esmoriz, an estuarine system, in two fish species (*Gambusia holbrooki* and *Anguilla anguilla*) by quantifying the activities of enzymes, such as acetylcholinesterase (AChE), catalase (CAT), glutathione-S-transferases (GSTs) and lactate dehydrogenase (LDH), and also by analyzing the alterations in biological tissues, namely liver and gills. Therefore, Minho River was selected as the reference site, and Pateira de Fermentelos was a third location with different pattern of anthropogenic contamination. The obtained results suggest the existence of contamination in Barrinha de Esmoriz, observable in the inhibition of AChE activity in both analyzed species; individuals of this estuarine lagoon revealed disturbances in neurotransmission. Considering CAT and GSTs enzyme activities, it is possible to suggest that individuals of *A. anguilla* of Barrinha the Esmoriz showed signs of oxidative stress. However, this was not observed in individuals of *G. holbrooki*. The inhibition of LDH activity in individuals of both species, suggested that these were under chemical stress. Apparently, the changes in enzyme activities may have been related to metal exposure. The results obtained for histological biomarkers reinforced this scenario, since it was possible to observe a trend in the rates of pathological alterations in gill and liver tissue. The relevance of the lesions was considered of minor to moderate importance, and may be reversible. The here obtained serie of data clearly indicate that there is a scenario of chemical contamination in Barrinha the Esmoriz, with the occurrence of potential damages, observable in both *G. holbrooki* and *A. anguilla*.

“Look deep, deep into nature, and then you will understand everything better”

Albert Einstein

(1879-1955)

Agradecimentos

A elaboração de uma dissertação de cariz académico, não resulta apenas do esforço do aprendiz, mas também de todo o apoio proporcionado por um conjunto de pessoas, pelo que gostaria de deixar o meu profundo agradecimento.

Ao Prof. Doutor Bruno Nunes pela sua orientação, disponibilidade, acompanhamento, boa disposição, pela transmissão de todo o seu conhecimento e experiência científica em biomarcadores enzimáticos, e pela forma exigente e rigorosa que sempre me incutiu.

Ao Prof. Doutor Alberto Teodorico Correia por me acolher no Centro Interdisciplinar de Investigação Marinha e Ambiental (CIIMAR), pela disponibilidade, simpatia e acompanhamento nas práticas laboratoriais histopatológicas e no processamento dos dados estatísticos.

Deste modo, gostaria de agradecer de forma especial ao Prof. Doutor Fernando Gonçalves por me ter proporcionado a oportunidade única em integrar a sua equipa de trabalho no Centro de Estudos do Ambiente e do Mar (CESAM), Laboratório Associado, e pelas excelentes condições para a realização do meu trabalho.

Queria agradecer de forma especial à Carina Caldeira que me guiou, explicou e ajudou de forma muito atenciosa nos meus primeiros passos no CESAM, sem ti seria tudo muito mais complicado e moroso. Às novas amigas que fiz na equipa LEADER, foram todos fantásticos comigo, nomeadamente a Ritinha, a Fatinha, a Sarinha, a Catarina, a Teresinha, a Marsinha, a Nini e a Ana Sofia. Vão ficar sempre no meu coração.

À Universidade Fernando Pessoa por ter colaborado e apoiado no meu trabalho científico e a todos os meus Professores que lapidaram a pessoa que hoje sou!!!!

Queria agradecer também aos Bombeiros Voluntários de Esmoriz, ao Sr. Ferrão por me ter auxiliado e fornecido as enguias na Barrinha de Esmoriz. Ao Sr. Gil pela sua prontidão em me fornecer enguias da Pateira de Fermentelos. À Sra. Duartina por gentilmente me fornecer enguias do Rio Minho. Muito obrigada, sem todos vocês não teria o material biológico para realizar o estudo.

Ao Bruno Costa, o meu apoio incondicional, suporte em todas as adversidades, sem ele não teria conseguido ultrapassar todas as barreiras que foram surgindo ao longo de mais de um ano e meio. Obrigada por me teres sempre acompanhado...

Índice

I: Introdução	1
1.1. Enquadramento	1
1.2. Objectivos	4
1.3. Organização e estrutura do texto.....	6
II: Biomarcadores	7
2.1. Contextualização	7
2.2. Biomarcadores enzimáticos como ferramentas de análise dos efeitos biológicos	10
2.3. Biomarcadores histopatológicos como ferramenta de análise ambiental.....	13
2.3.1. Brânquias	16
2.3.2. Fígado	18
2.4. Biomonitorização da poluição aquática	19
2.5. Utilização de peixes em ecotoxicologia	22
2.5.1. <i>Anguilla anguilla</i>	24

2.5.2.	<i>Gambusia holbrooki</i>	26
III:	Caracterização da área a analisar – Barrinha de Esmoriz	28
3.1.	Caracterização da bacia hidrográfica	28
3.2.	Importância ecológica da Barrinha de Esmoriz	30
3.3.	Focos de contaminação	31
IV:	Metodologia experimental	33
4.1.	Localização das zonas de capturas	33
4.2.	Estratégia, recolha e preparação das amostras	35
4.3.	Determinações enzimáticas	36
4.3.1.	Determinação da actividade da enzima acetilcolinesterase (AChE).....	36
4.3.2.	Determinação da actividade da enzima catalase (CAT)	37
4.3.3.	Determinação da actividade da enzima glutathione S-transferase (GST) ..	38
4.3.4.	Determinação da actividade da enzima lactato desidrogenase (LDH)	38
4.3.5.	Quantificação da proteína total	39
4.4.	Determinação histopatológica	39

4.5.	Análise estatística.....	40
V:	Resultados.....	41
5.1.	Biomarcadores enzimáticos	41
5.1.1.	<i>Anguilla anguilla</i>	41
5.1.2.	<i>Gambusia holbrooki</i>	45
5.2.	Biomarcadores histopatológicos	50
5.2.1.	<i>Anguilla anguilla</i>	50
5.2.2.	<i>Gambusia holbrooki</i>	59
VI:	Discussão	65
6.1.	Biomarcadores enzimáticos	69
6.1.1.	AChE	69
6.1.2.	CAT	71
6.1.3.	GST	74
6.1.4.	LDH	76
6.2.	Biomarcadores histopatológicos	79

6.2.1. Brânquias	79
6.2.2. Fígado	83
VII: Conclusões	86
VIII: Referências bibliográficas	90

Índice de figuras

- Figura 1** – Filamento branquial em corte transversal de um teleósteo (a barra de escala corresponde a 16,7 μm), onde: 1 – lamela primária; 2 – lamela secundária, 3 – célula epitelial; 4 – célula mucosa, 5 – célula pilar; 6 – lúmen capilar; 7 – eritrócitos; 8 – célula de cloreto; 9 – células basais (Extraído de Lins *et al.*, 2010).
..... 17
- Figura 2** – Fígado em corte transversal de um teleósteo (a barra de escala corresponde a 22,8 μm), onde: 1 – hepatócitos, 2 – ductos biliares; 3 – vasos sinusóides; 4 – vaso sinusóide; 5 – tecido conectivo; 6 – centro de melanomacrófagos; 7 – veia porta (Extraído de Lins *et al.*, 2010). 18
- Figura 3** – Ciclo de vida da enguia europeia (*Anguilla anguilla*), (Alves, 2008)..... 25
- Figura 4** – Representação de uma fêmea (na parte superior da figura) e um macho (na parte inferior da figura) de gambusia (*Gambusia holbrooki*), (Extraído de: <http://forums.flytyer.com/forum/31-freshwater-tying/17801-mylar-minnow-mosquito-fish-and-others-baitfish>). 26
- Figura 5** – Localização da bacia hidrográfica da Barrinha de Esmoriz e tipologia da sua envolvente (adaptado a partir de <http://ondaseventania.blogspot.com/2008/11/paisagem-protegida-da-foz-do-cster-e.html>). 29
- Figura 6** – Tipologia da biodiversidade e dos biótopos da Barrinha de Esmoriz (adaptado a partir de http://www.50espacos.campoaberto.org/espacos/lista/fichas/espinho/paramos/03/ficha_html/ficha.html). 31

Figura 7 – Mapa indicativo com os locais de captura deste estudo.....	34
Figura 8 – Variação dos vários parâmetros enzimáticos (AChE, CAT, GST e LDH) em enguia europeia nos três locais amostrados (Pateira de Fermentelos, Barrinha de Esmoriz e Rio Minho), nas quatro estações do ano (Verão de 2010 a Primavera de 2011). Os valores correspondem à média das determinações efectuadas por local e por estação, e as barras de erro correspondem ao erro-padrão (as diferenças significativas estão representadas por letras diferentes dentro de cada local, $p \leq 0,05$).	42
Figura 9 – Variação dos vários parâmetros enzimáticos (AChE, CAT, GST e LDH) em gambusia nos três locais amostrados (Pateira de Fermentelos, Barrinha de Esmoriz e Rio Minho), nas quatro estações do ano (Verão de 2010 a Primavera de 2011). Os valores correspondem à média das determinações efectuadas por local e por estação, e as barras de erro correspondem ao erro-padrão (as diferenças significativas estão representadas por letras diferentes dentro de cada local, $p \leq 0,05$).	46
Figura 10 – Secção de filamentos branquiais de <i>A. anguilla</i> do Rio Minho (10 A: filamentos branquiais com aparência normal no Verão; 10 B: levantamento epitelial generalizado – setas, na Primavera).....	50
Figura 11 – Secção de filamentos branquiais de <i>A. anguilla</i> da Barrinha de Esmoriz (11 A: vários aneurismas – setas e hiperplasia do epitélio filamentar com fusão lamelar – círculos, no Verão; 11 B: 1 aneurisma – seta, hiperplasia do epitélio filamentar com fusão lamelar – círculo superior e fusão das lamelas secundárias – círculo inferior, no Outono; 11 C: vários aneurismas – setas e várias hiperplasias do epitélio filamentar com fusão lamelar – círculos, no Inverno; 11 D: inúmeros aneurismas disseminados por todos os filamentos brânquias – setas, na Primavera).	52

- Figura 12** – Secção de filamentos branquiais de *A. anguilla* da Pateira de Fermentelos (12 A: aneurismas – setas e hiperplasia do epitélio filamentar com fusão lamelar – círculos, no Verão; 12 B: aneurismas – setas estreitas, vasodilatação na linha central vascular lamelar – seta ampla e fusão das lamelas adjacentes – círculos, no Outono; 12 C: aneurismas com fusão vascular – seta e fusão de lamelas secundárias – círculo, no Inverno; 12 D: fusão de lamelas secundárias – círculo, na Primavera)..... 54
- Figura 13** – Arquitectura de secções de fígado de *A. anguilla* do Rio Minho sem alterações histopatológicas (13 A: melanomacrófagos – setas, no Verão; 13 B: sinusóides – setas, na Primavera). 55
- Figura 14** – Arquitectura de secções de fígado de *A. anguilla* da Barrinha de Esmoriz (14 A: sinal hemorrágico – seta, no Verão; 14 B: vacuolização hepática generalizada, no Outono)..... 56
- Figura 15** – Arquitectura de secções de fígado de *A. anguilla* da Pateira de Fermentelos (15 A: alargamento dos sinusóides – setas estreitas, melanomacrófagos – setas amplas, no Inverno; 15 B: vacuolização hepática na Primavera)..... 57
- Figura 16** – Índice patológico branquial e hepático em *A. anguilla*, com o respectivo valor médio e erro padrão na Pateira de Fermentelos, na Barrinha de Esmoriz e no Rio Minho. As barras de erro assinaladas com letras diferentes são significativas dentro do local ($p < 0,05$)..... 58
- Figura 17** – Secção de filamentos branquiais de *Gambusia holbrooki* no Rio Minho com aparência normal, no Inverno. 60
- Figura 18** – Secção de filamentos branquiais de *Gambusia holbrooki* (18 A: fusão de lamelas secundárias – círculos densos e hiperplasia do epitélio filamentar com fusão lamelar – círculo, na Barrinha de Esmoriz, no Verão; 18 B: hiperplasia do

epitélio filментар com fusão lamelar – círculos densos e fusão de lamelas secundárias – setas, na Pateira de Fermentelos, na Primavera).	61
Figura 19 – Arquitectura de secções de fígado de <i>G. holbrooki</i> do Rio Minho sem alterações histopatológicas (eritrócitos – setas), no Verão.	62
Figura 20 – Arquitectura de secções de fígado de <i>G. holbrooki</i> (20 A: vacuolização hepática generalizada e eritrócitos – setas, em animal capturado na Barrinha de Esmoriz, no Outono; 20 B: eritrócitos – setas amplas e alargamento dos sinusóides – setas estreitas, animal capturado na Pateira de Fermentelos, no Verão).	63
Figura 21 - Índice patológico branquial e hepático em <i>G. holbrooki</i> , com o respectivo valor médio e erro-padrão, de animais capturados na Pateira de Fermentelos, na Barrinha de Esmoriz e no Rio Minho. As barras de erro assinaladas com letras diferentes são significativas dentro do local ($p < 0,05$).	64

Índice de tabelas

Tabela 1 – Esquema de amostragem.....	35
Tabela 2 – Quadro-resumo da análise de variância bifactorial (Two-Way ANOVA) em <i>A. anguilla</i> para os vários parâmetros enzimáticos (AChE, CAT, GST e LDH). Para cada um dos factores, estão representados os graus de liberdade (g.l), a variância, o valor do teste de F, e o valor de probabilidade (p) associado. As diferenças estatisticamente significativas estão assinaladas a negrito.....	43
Tabela 3 – Quadro-resumo da análise de variância bifactorial (Two-Way ANOVA) em <i>G. holbrooki</i> para os vários parâmetros enzimáticos (AChE, CAT, GST e LDH). Para cada um dos factores, estão representados os graus de liberdade (g.l), a variância, o valor do teste de F, e o valor de probabilidade (p) associado. As diferenças estatisticamente significativas estão assinaladas a negrito.....	47
Tabela 4 – Quadro-resumo da análise de variância bifactorial (Two-Way ANOVA) em <i>A. anguilla</i> para os parâmetros histopatológicos (brânquias e fígado). Para cada um dos factores, estão representados os graus de liberdade (g.l), a variância, o valor do teste de F, e o valor de probabilidade (p) associado. As diferenças estatisticamente significativas estão assinaladas a negrito.....	59
Tabela 5 – Quadro-resumo da análise de variância bifactorial (TWO-WAY ANOVA) em <i>G. holbrooki</i> . Para cada um dos factores, estão representados os graus de liberdade (g.l), a variância, o valor do teste de F, e o valor de probabilidade (p) associado. As diferenças estatisticamente significativas estão assinaladas a negrito.	65

I: Introdução

1.1. Enquadramento

Ao longo das últimas décadas, é possível constatar um acréscimo, por parte dos cientistas e da comunidade em geral, da atenção dedicada às questões relacionadas com a protecção ambiental, privilegiando as acções preventivas em detrimento das acções correctivas (Ravera, 2001). A notoriedade destes acontecimentos acentuou-se recentemente, devido à necessidade de se aumentar a consciência ecológica; paralelamente, surgiu também a noção de que as actividades antrópicas necessitavam de ser compatibilizadas com o conceito de desenvolvimento sustentável dos recursos naturais (Siracusa *et al.*, 2004). Isto só é conseguido com o aprofundar dos conhecimentos sobre os vários compartimentos dos ecossistemas, designadamente, os recursos hídricos, o solo, a flora e a fauna. Sendo assim, neste contexto de protecção do ambiente e do fomento da qualidade de vida, devem ser tidos em consideração os estudos dos efeitos dos diferentes contaminantes com origem humana e a forma como se dispersam, ou acumulam, nos diversos compartimentos. Deste modo, poderá ser possível caracterizar os cenários de contaminação antropogénica, compreendendo as interacções entre compostos tóxicos e biota, e consequentemente compreender as melhores alternativas de remediação dos impactos causados pelo desenvolvimento industrial e o rápido crescimento demográfico (Köhne *et al.*, 2009).

O meio hídrico é um meio receptor vulgarmente utilizado para descargas de inúmeros xenobióticos, designadamente de origem industrial, doméstica e agrícola (Filser, 2008). Desta forma, os organismos presentes nos variados compartimentos aquáticos estão expostos a misturas muito complexas de agentes químicos, de natureza biogénica (metabolitos de plantas e animais, toxinas produzidas por fungos, plantas e animais), como antrópica (pesticidas, fármacos, químicos industriais), (Quintaneiro *et al.*, 2006). A entrada destes agentes no meio hídrico pode ocorrer por transferência do solo, através

de escoamento superficial e lixiviação, por deposição atmosférica, por descargas directas e ineficiência das estações de tratamento de águas residuais (Livingstone, 1998; Nunes *et al.*, 2004).

A exposição em contínuo dos organismos a esta mistura complexa de tóxicos, pode provocar danos nas suas estruturas e processos biológicos, e a sua intensidade depende fundamentalmente da concentração e persistência do tóxico, das suas características físico-químicas, mas também da permeabilidade da camada que protege o organismo do exterior (tegumento) e do estado fisiológico dos próprios organismos afectados (Burger *et al.*, 2007). Sendo assim, os processos de toxicidade podem seguir, geralmente, uma panóplia de cursos mais ou menos complexos. Num primeiro plano, o tóxico que está distribuído no ambiente contacta com um dado organismo exposto, passa pelos processos fisiológicos de absorção, sofre seguidamente distribuição no organismo, e dirige-se/actua num dado órgão, tecido ou célula-alvo. Aqui a substância química interage com uma molécula endógena, podendo desencadear uma série de eventos fisiológicos. Destes eventos poderão resultar perturbações nas estruturas e funções das células, que poderão por sua vez despoletar mecanismos de reparação ao nível dos tecidos, células ou moléculas. Porém, se essas alterações provocadas pelo tóxico ultrapassarem a capacidade de reparação do organismo ou por outro lado, se tornarem disfuncionais, surge a denominada toxicidade (Ravera, 2001).

Neste contexto, o estudo da relação dos efeitos adversos dos químicos dispersos pelo ambiente nos organismos vivos, permitiu o surgimento da Ecotoxicologia, com o intuito de perceber alterações induzidas pelos xenobióticos no meio ambiente (Chapman, 2002). Por “xenobiótico” entende-se qualquer substância que não foi produzida pelo biota, e que de alguma forma pode induzir efeitos deletérios sobre os organismos (Williams *et al.*, 2000). A Ecotoxicologia é uma área extremamente importante no que respeita à avaliação da toxicidade de uma substância com potencial presença ambiental,

em que se estudam os efeitos tóxicos causados em organismos, a vários níveis organizacionais. Contrariamente às análises químicas, que apenas permitem quantificar momentaneamente as espécies químicas de forma isolada (Pereira *et al.*, 2010), a abordagem ecotoxicológica permite conhecer os potenciais efeitos biológicos resultantes da presença continuada de um composto tóxico no ambiente, em concentrações reais, e simulando todas as potenciais interações que daí possam advir. A Ecotoxicologia utiliza ferramentas específicas de avaliação biológica, pelo que analisa frequentemente respostas bioquímicas que reflectem a tendência dos xenobióticos em provocar determinadas alterações em processos fisiológicos, que se denominam genericamente por *biomarcadores* (Walker *et al.*, 2001).

As substâncias xenobióticas surgem nos sistemas aquáticos e têm alvos específicos (tecidos, órgãos) onde causam determinados efeitos que podem ser monitorizados, como por exemplo a inibição de enzimas com determinadas especificidades para com esses mesmos tóxicos – biomarcadores enzimáticos. A avaliação de potenciais danos tecidulares em organismos expostos permite analisar alterações estruturais e celulares ao nível de diversos órgãos, em particular nas brânquias e no fígado de organismos aquáticos, devido à sua importância como interface de entrada do xenobiótico, e devido ao seu papel nos mecanismos de destoxicação corporal, respectivamente – biomarcadores histopatológicos (Costa *et al.*, 2009). A complementaridade destas ferramentas de avaliação de toxicidade são uma mais-valia na investigação científica e permitem avaliar a qualidade ambiental de ecossistemas e biomonitorizar eventuais alterações antropogénicas introduzidas nos mesmos (Wester, *et al.*, 2002; Au, 2004; Costa *et al.*, 2009).

1.2. Objectivos

Os estuários têm uma grande importância, não só a nível ecológico, mas também a nível económico, e representam uma enorme diversidade de ecossistemas hidrológicos na biosfera (Durou *et al.*, 2007). Os estuários suportam uma grande diversidade de espécies, servindo como fonte de nutrientes, refúgio e berçário, funcionando como suporte da cadeia alimentar marinha (Paerl, 2006; Quintaneiro *et al.*, 2006). Mas por outro lado, os estuários sofrem pressões antrópicas que perturbam os factores abióticos (temperatura, pH, compostos orgânicos, disponibilidade de oxigénio) e impõe restrições específicas às comunidades que vivem e se alimentam nestas áreas (Monserrat *et al.*, 2007; Padmini e Rani, 2009). É certo que a produtividade dos estuários depende de aportes de nutrientes, mas com a entrada excessiva de nutrientes de origem antrópica no sistema, pode ocorrer um desequilíbrio na produção primária, o que pode levar à eutrofização (Marín e Sanz-Lázaro, 2009). Um raciocínio similar pode ser elaborado para os compostos contaminantes, pois os estuários são frequentemente zonas altamente enriquecidas em compostos tóxicos de origem humana (Quintaneiro *et al.*, 2006). Por tudo isto, é fundamental efectuar estudos que avaliem os efeitos adversos potenciais destes compostos nos organismos. Deste modo, o objectivo fundamental deste estudo é avaliar a natureza e as dimensões dos efeitos eventualmente tóxicos em organismos estuarinos expostos, nomeadamente, o peixe eurihialino gambusia (*Gambusia holbrooki*) e a enguia europeia (*Anguilla anguilla*), de modo a quantificar e prever os resultados a médio e longo prazo, da manutenção deste cenário de contaminação no sistema estuarino da Barrinha de Esmoriz, em comparação com duas áreas (uma de referência, Foz do Rio Minho; uma segunda com reconhecido impacto antropogénico, a Pateira de Fermentelos). A escolha do estuário do Rio Minho deveu-se ao facto de ser um local de referência, muitas vezes utilizado em estudos ecotoxicológicos em Portugal (Moreira *et al.*, 2006; Rodrigues *et al.*, 2006; Quintaneiro *et al.*, 2006; Monteiro *et al.*, 2007; Gravato *et al.*, 2008; Guimarães *et al.*, 2009), por ser considerado um dos menos

contaminados ao longo da costa Portuguesa e que integra a Rede Natura 2000 (Antelo *et al.*, 1996). Desta feita, foram capturados indivíduos das duas espécies mencionadas, em todos os locais em estudo (Barrinha de Esmoriz, Pateira de Fermentelos e Rio Minho), no sentido de se avaliar diferenças nos padrões de respostas fisiológicas, que indiquem processos de toxicidade. A realização das referidas capturas decorreu durante o período de um ano, ao longo das estações, desde o Verão de 2010 até à Primavera de 2011.

Foi seleccionada uma série de biomarcadores enzimáticos, que envolveu as enzimas catalase (CAT), glutathione S-transferases (GSTs), acetilcolinesterase (AChE) e lactato desidrogenase (LDH). Estas enzimas estão envolvidas na sinalização de proliferação peroxissomal, de destoxificação, perturbações na neurotransmissão e de alteração do metabolismo aeróbio para anaeróbio, respectivamente. Adicionalmente, foram analisados biomarcadores histopatológicos, determinados no fígado e brânquias.

Assim sendo, este trabalho pretende auferir se os biomarcadores são uma mais-valia na avaliação da exposição a xenobióticos nas espécies seleccionadas para o estudo, e se de algum modo é sensível à diversidade natural de habitats, espécies e sazonalidade. Este estudo teve como finalidade dar resposta a determinadas questões tais como qual a contribuição geográfica e sazonal para a variação dos padrões de actividade enzimática, qual a sensibilidade dos parâmetros seleccionados para servirem de sinalização para a ocorrência de toxicidade, e por último, qual o impacto geral das actividades antrópicas sobre as espécies seleccionadas.

1.3. Organização e estrutura do texto

A presente dissertação é composta primeiramente pela introdução, onde é redigida uma pequena contextualização ao tema a desenvolver neste estudo e os objectivos correspondentes. Seguidamente é apresentado um capítulo com abordagem aos biomarcadores, onde são desenvolvidos alguns temas relacionados com o uso de biomarcadores enzimáticos como ferramenta de análise dos efeitos biológicos, e os biomarcadores histopatológicos como ferramenta de análise ambiental. Em seguida, são desenvolvidos os processos de biomonitorização ambiental, e a utilização de peixes como modelos em Ecotoxicologia. Adicionalmente são descritas as características biológicas e fisiológicas das espécies utilizadas no estudo (*Anguilla anguilla* e *Gambusia holbrooki*). Posteriormente segue um novo capítulo com ênfase à Barrinha de Esmoriz, onde são descritas as suas características hidrográficas, ecológicas e os seus focos e padrões de contaminação já documentados. No quarto capítulo são descritas as metodologias experimentais adoptadas para efectuar uma avaliação e quantificação da contaminação da Barrinha de Esmoriz, tendo como base de comparação a Pateira de Fermentelos (zona contaminada) e o Rio Minho (local de referência). No capítulo seguinte encontram-se os resultados obtidos em todo o processo de análise dos biomarcadores seleccionados, nas três zonas de análise. Em seguida, são discutidos os resultados obtidos e delineadas as conclusões relevantes a este estudo. Para terminar, seguem-se as referências bibliográficas consultadas e que dão suporte científico a este estudo.

II: Biomarcadores

2.1. Contextualização

A avaliação do risco ecológico que um determinado tóxico (ou mistura de tóxicos) coloca no ambiente, bem como a percepção de quais os efeitos deletérios potencialmente resultantes para os receptores biológicos pode ser uma tarefa particularmente complexa (van der Oost *et al.*, 2003). Este processo de interacção toxicológica inicia-se com a libertação do contaminante químico no meio receptor – água, solo, ar, e a exposição decorrente do contacto permanente dos seres vivos com os xenobióticos – dose externa que pode resultar em alterações fisiológicas e comportamentais (Scott e Sloman, 2004). A partir do momento em que o ser vivo internaliza contaminante por processos de absorção (como ingestão, inalação, ou mesmo permeação directa do tegumento, como acontece frequentemente nos casos de exposição aquática) a quantidade absorvida de tóxico passa a designar-se por dose interna. A necessidade de obter informações acerca da extensão dos efeitos provocados nos organismos individualizados conduziu à investigação de respostas bioquímicas adaptativas, que indicam o potencial do contaminante em provocar danos em determinados processos fisiológicos (Eason e O’Halloran, 2002). A avaliação destas respostas adaptativas permite avaliar quais as naturezas e extensões dos efeitos eventualmente tóxicos observados em organismos expostos, de modo a caracterizar e prever os resultados a médio e longo prazo na manutenção de cenários de contaminação (Hyne e Maher, 2003).

Nesse sentido, os biomarcadores são ferramentas que traduzem alterações induzidas pelos xenobióticos desde os níveis de organização celular mais baixa, como processos bioquímicos ou estruturais, ou em funcionalidades específicas num sistema biológico. O principal objectivo da sua utilização é o de estabelecer uma relação entre a presença dos contaminantes no meio receptor e os potenciais efeitos subsequentes no organismo (van

der Oost *et al.*, 2003; Jakšić *et al.*, 2008). Estes podem variar segundo a toxicidade inerente ao composto, a sua concentração e o grau de exposição (tempo e a quantidade) a que os indivíduos estão expostos. Outro factor importante na utilização de biomarcadores, para uma correcta interpretação das alterações nos ecossistemas por substâncias tóxicas, deve ser a sua aplicabilidade sobre variadas condições e sensibilidade a vários contaminantes ambientais (Nunes *et al.*, 2008).

Os biomarcadores podem ser classificados em três categorias, designadamente, os de exposição, de efeito e os de susceptibilidade (Timbrell, 1998; van der Oost *et al.*, 2003). Os biomarcadores de exposição estão relacionados com a detecção e a medição de uma substância exógena, dos seus metabolitos ou do produto de uma interacção entre o agente contaminante e determinadas moléculas ou células alvo, a medição é relativa a um dado local no interior do indivíduo – dose interna. Estes podem ser utilizados de forma a obter a confirmação e a avaliação da exposição de indivíduos para uma dada substancia ou mistura de substâncias, relacionando a dose externa com a dose interna. Nos biomarcadores de efeito estão englobadas as alterações bioquímicas, fisiológicas e/ou outras alterações que possam ser medidas em tecidos ou fluidos do corpo de um indivíduo, e que de algum modo possam ser relacionadas com alguma anomalia, lesão ou problema de saúde. Distinguem-se dos anteriores também por evidenciar os efeitos deletérios dos xenobióticos no indivíduo. Os biomarcadores de susceptibilidade reflectem a capacidade inata ou adquirida, de um determinado indivíduo em se adaptar à exposição a xenobióticos específicos, de forma a que este desenvolva respostas que podem ser desde alterações nos receptores que medeiam a sensibilidade do organismo ao xenobiótico, ou até mesmo factores genéticos. Não obstante, os biomarcadores de susceptibilidade permitem portanto reforçar o grau de resposta da exposição verificada entre diversos indivíduos (Timbrell, 1998; van der Oost *et al.*, 2003).

Embora existam autores que atribuem a classificação dos biomarcadores em três classes, outros por outro lado complementam esta divisão, considerando que as classes deveriam ser mais abrangentes e não tão estanques, uma vez que os biomarcadores acabam por estar todos interligados entre si (Hyne e Maher, 2003). Desta forma podemos ter ainda segundo uma visão fisiológica ou funcional: biomarcadores de alterações em proteínas reguladoras (níveis de metalotioneínas, proteínas de stress), de biotransformação (a indução de enzimas da fase I e fase II de biotransformação), de disrupção endócrina (níveis de estrogénio, anomalias no aparelho reprodutor), genotoxicidade (a quantificação de quebras no DNA), imunotoxicidade (concentração de imunoglobinas), de histopatologia (lesões tecidulares, necrose), do metabolismo energético (o teor de reservas lipídicas ou glicogénio), de neurotoxicidade (a actividade da acetilcolinesterase), de stress oxidativo (actividade de enzimas antioxidantes, como a superóxido dismutase), entre outros (Peakall, 1992).

Sendo assim, a escolha de um biomarcador adequado a aplicar em peixes deve possuir um procedimento de quantificação fiável, fácil de executar e relativamente barato; a resposta do biomarcador deve ser sensível à exposição de contaminantes e/ou efeitos dos mesmos, de modo a servir de sinal de alerta precoce; ter informação bibliográfica credível de modo a distinguir entre a variabilidade natural e a induzida por contaminantes; conhecer os padrões de resposta; conhecer os mecanismos subjacentes entre a resposta do biomarcador e a exposição a poluentes; conhecer a importância toxicológica do biomarcador, isto é, estabelecer as relações entre a resposta do biomarcador e o impacto a longo prazo para o organismo (van der Oost *et al.*, 2003).

Em suma, a aplicação de biomarcadores tem inúmeras vantagens, desde logo o facto de estes serem mensuráveis mesmo antes de se detectarem efeitos deletérios a níveis mais complexos e superiores no sistema biológico. As metodologias usadas na sua quantificação são, em regra, muito práticas, extremamente rápidas e relativamente

baratas, existindo padrões de medição muito fiáveis. Existem alguns marcadores bioquímicos que são específicos para um contaminante ou uma classe de contaminantes, permitindo deste modo detectar com facilidade as causas possíveis que levam à contaminação de sistemas. Os biomarcadores são capazes de estabelecer uma relação de dose-resposta entre o agente xenobiótico e o biomarcador, sendo possível aplicar a uma variabilidade de espécies (Newman, 2001).

2.2. Biomarcadores enzimáticos como ferramentas de análise dos efeitos biológicos

Os biomarcadores são ferramentas muito utilizadas e úteis em programas de monitorização de sistemas aquáticos, para relacionar a presença de substâncias tóxicas no meio com os efeitos no organismo (Sanchez *et al.*, 2010). No entanto, o uso desta ferramenta na biomonitorização ambiental envolve um conhecimento aprofundado das funções biológicas, de modo a identificar todas as alterações de via biogénica e que podem influenciar essas respostas, de modo a que seja possível padronizar o procedimento analítico. Com as flutuações desses parâmetros biogénicos conhecidos, cada variação significativa que ocorra acima do intervalo considerado natural, pode ser utilizado como um indicador da absorção do contaminante no organismo, mostrando a sua distribuição nos tecidos e o seu mecanismo de acção (Li *et al.*, 2010).

Na monitorização ambiental, um dos biomarcadores mais utilizados é a medição da inibição da acetilcolinesterase (AChE), isto porque muitos contaminantes têm como alvo o sistema nervoso central, provocando perturbações denominadas de neurotoxicidade (Nunes *et al.*, 2004; Ricciardi *et al.*, 2006; Rodrigues *et al.*, 2011). A inibição da AChE é usada como indicativa da exposição a compostos

anticolinesterásicos, como os pesticidas das classes dos organofosforados e dos carbamatos, (Sancho *et al.*, 2000) e mais recentemente, a alguns metais (Diamantino *et al.*, 2003). A enzima AChE pode ser encontrada tanto no cérebro como na junção neuromuscular de vertebrados, e tem um papel fundamental no controlo da acumulação da acetilcolina (mediador químico essencial para a transmissão do impulso nervoso). A AChE é a enzima responsável pela hidrólise do neurotransmissor acetilcolina em ácido acético e colina (Ellman *et al.*, 1961). Ao regular a presença do neurotransmissor, impede deste modo a hiperestimulação dos receptores da acetilcolina, que é fundamental e essencial para o bom funcionamento dos sistemas sensoriais e neuromusculares (Rodrigues *et al.*, 2011). A inibição provocada por alguns agentes tóxicos resulta na acumulação da acetilcolina em sinapses nervosas que originam perturbações das funções nervosas, podendo levar à morte do organismo (Monteiro *et al.*, 2005).

Os biomarcadores de stress oxidativo têm sido muito utilizados na avaliação dos efeitos induzidos por várias classes de contaminantes químicos em organismos. Durante o processo evolutivo, os organismos aeróbios adaptaram-se a concentrações altas de oxigénio, que são fundamentais para o seu metabolismo e crescimento, muito embora sejam prejudiciais para as biomoléculas devido ao seu potencial oxidativo. É muito importante o saldo entre as espécies pró-oxidantes e antioxidantes, e a eliminação das espécies reactivas de oxigénio (ROS) que se formam naturalmente durante o processo respiratório, para que seja mantida a homeostase das células (Lushchak, 2011). Um facto é que os organismos aquáticos são muito vulneráveis aos efeitos oxidativos de poluentes que estão presentes no meio ambiente, sobretudo quando estes interferem na produção de ROS (Vlahogianni *et al.*, 2007). Os organismos, quando expostos a poluentes com potencial oxidativo, exibem alterações nas defesas antioxidantes, que incluem enzimas como a catalase (CAT) e as glutathione S-transferases (GSTs), (Xilan *et al.*, 2011). A catalase é uma proteína que desempenha dupla função, incluindo a decomposição do peróxido de hidrogénio (H₂O₂) em água (H₂O) e oxigénio (O₂); está

também envolvida na oxidação de dadores de hidrogénio, como o metanol, o ácido fórmico e os fenóis, com consumo de peróxido – actividade peroxidica. A velocidade de decomposição enzimática do peróxido de hidrogénio é proporcional à quantidade de peróxido presente (Aebi, 1984). A enzima CAT tem assim a finalidade de decompor o peróxido de hidrogénio de modo a evitar a acumulação de peróxidos nas células (Atli *et al.*, 2006). Quando a concentração de peróxido de hidrogénio aumenta, constitui um alerta para a ocorrência de fenómenos de stress oxidativo. As actividades destas enzimas antioxidantes inicialmente aumentam para de alguma forma combater o stress oxidativo, mas a exposição de forma prolongada a compostos tóxicos pró-oxidantes diminui a sua produção levando a danos que incluem peroxidação lipídica (LPO), oxidação das proteínas e danos no DNA (Ogunji *et al.*, 2007).

Os biomarcadores de biotransformação também são muito utilizados em avaliações ecotoxicológicas, e estão envolvidos na destoxificação e eliminação de contaminantes, sendo o principal mecanismo para a manutenção da homeostasia durante a exposição a moléculas estranhas. A biotransformação de xenobióticos é conseguida por um número reduzido de enzimas, que têm especificidade para vários substratos. A destoxificação, e a conseqüente eliminação dos contaminantes, são uma mais-valia do processo de biotransformação de xenobióticos. Estes processos envolvem a alteração das propriedades físicas do xenobiótico, tornando mais fácil a sua excreção pelo aumento da sua hidrofília (Newman, 2001). As reacções catalisadas pelas enzimas envolvidas na biotransformação de xenobióticos são comumente divididas em duas fases (fase I e fase II). Nas reacções de fase I ocorrem hidrólises, reduções e oxidações, que têm como propósito aumentar um pouco a hidrofília do agente que foi absorvido pelo organismo. As reacções de fase II caracterizam-se pelo grande aumento da hidrofília, e envolvem reacções de conjugação, como a glucoronidação, sulfatação, acetilação, metilação, conjugação com a glutatona e conjugação com aminoácidos. Estas reacções de fase II são responsáveis pelo grande aumento da hidrofília de xenobióticos, promovendo desta forma a eliminação de químicos exógenos (Pennec e Penneç, 2003). As glutatonas S-

transferases (GSTs) são um grupo de enzimas que estão em elevada concentração no fígado e são das principais enzimas envolvidas na destoxificação de xenobióticos de fase II. Estas isoenzimas catalizam a conjugação da glutathione com diversos compostos que possuem centros electrofílicos. As GSTs interagem com diversos substratos, nomeadamente xenobióticos tóxicos, produtos reactivos de processos intracelulares, com peroxidação de lípidos, podendo diminuir a toxicidade de xenobióticos (Henson *et al.*, 2001).

Os biomarcadores que avaliam a exposição de organismos do sistema aquático ao stress químico também são muito utilizados, designadamente a enzima lactato desidrogenase (LDH). A LDH é uma enzima glicolítica muito importante e está presente em muitos tecidos (Diamantino *et al.*, 2001), como o músculo, e está envolvida na conversão de piruvato em lactato pela via anaeróbia nos processos de produção de energia celular, e em simultâneo converte o NADH em NAD⁺ (Vassault, 1983). As alterações na sua actividade têm sido utilizadas como um meio de estudar alterações nos processos de produção de energia, induzidos pelo stress químico. Esta enzima é induzida por níveis baixos de oxigénio, sendo uma ferramenta importante na avaliação do estado respiratório dos organismos aquáticos (Nathan *et al.*, 2006).

2.3. Biomarcadores histopatológicos como ferramenta de análise ambiental

A histopatologia é indispensável para efectuar uma avaliação adequada do equilíbrio dos ecossistemas aquáticos e tem sido cada vez mais frequente a sua utilização em programas de monitorização ambiental envolvendo peixes (Stentiford *et al.*, 2003; Matos *et al.*, 2007; Fernandes *et al.*, 2008a; Costa *et al.*, 2009). A análise

histopatológica incide no estudo das alterações em tecidos biológicos, nomeadamente em frequentes órgãos-alvo de toxicidade, como as brânquias e o fígado. Estes órgãos apresentam interesse acrescido devido às funções fisiológicas que desempenham. O fígado é o principal órgão envolvido na destoxificação nos vertebrados, e as brânquias constituem-se como a principal barreira contra a entrada de xenobióticos no organismo, desempenhando a primeira linha de eliminação de agentes nocivos (Koca *et al.*, 2005). Sendo assim, a presença de lesões a nível destes dois órgãos é utilizada como um biomarcador da exposição aguda ou crónica a diversos tóxicos e a sua aplicação é útil na avaliação da poluição dos sistemas aquáticos (Cengiz e Ünlü, 2003) e em programas de biomonitorização aquática (Stentiford *et al.*, 2003; Lang *et al.*, 2006; Triebkorn *et al.*, 2008). A histologia é um ramo da biologia e a sua aplicabilidade na avaliação da saúde dos peixes é extremamente importante, uma vez que a sua metodologia permite detectar condições ténues, ou sinais iniciais de doença, que não são facilmente reconhecidas pelo exame macroscópico. Alterações a nível celular e na função de órgãos importantes são os primeiros indícios de uma má adaptação a perturbações externas no indivíduo que pode eventualmente levar a problemas de saúde ou doença (Short e Meyers, 2001).

A abordagem mais clássica na avaliação qualitativa histopatológica em organismos do sistema aquático, no seu estado natural, fornece informações acerca de lesões histopatológicas. Muito embora a ausência de dados numéricos torne muito complicado estabelecer relações de causa-efeito entre patologia e graus de contaminação, é sempre possível avaliar a significância dos dados obtidos (Schwaiger *et al.*, 1997). Sendo assim, existem actualmente abordagens histopatológicas mais direccionadas para a determinação de índices histopatológicos com dados numéricos, nomeadamente abordagens semi-quantitativas e quantitativas. As abordagens semi-quantitativas demonstram ser úteis na medida em que demonstram a progressão das lesões nos órgãos avaliados em inúmeros peixes, fornecendo índices individualizados (Nero *et al.*, 2006; Carrola *et al.*, 2009; Costa *et al.*, 2009). Os biomarcadores histopatológicos em peixes

são muito vantajosos sobre outro tipo de abordagens, uma vez que, é relativamente fácil a recolha de amostras e posterior processamento, e a sua utilização tem a possibilidade de avaliar vários sistemas e várias células num mesmo peixe. Por outro lado, permite investigar peixes de reduzidas dimensões, que seria muitas vezes impossível de fazer em estudos bioquímicos. Esta técnica é muito importante porque permite detectar e identificar os locais específicos de lesões celulares (Handy *et al.*, 2002).

Um dos problemas associados a estudos histopatológicos em peixes diz respeito à dificuldade em estabelecer a casualidade entre o efeito e as lesões e alterações histológicas encontradas em resultado da exposição a vários contaminantes. Uma forma de tentar mitigar este problema é o reforço acentuado de estudos que tentam estabelecer as especificidades das lesões que podem estar associadas a exposições a determinados contaminantes. Por outro lado, é difícil determinar qual o peso biológico real de cada lesão nos indivíduos, ou seja, de que forma determinadas lesões comprometem, mais ou menos, a saúde dos indivíduos (Costa *et al.*, 2009). Nesse sentido, podem ser aplicados índices de condição que indicam a importância relativa de lesões, pois desde logo algumas lesões implicam maior prejuízo para um órgão que outras. Desta forma foram criados índices ponderados, onde é atribuído um valor a uma lesão específica de acordo com o seu real impacto nos organismos dos peixes (Bernet *et al.*, 1999). Estas abordagens foram levadas a cabo com sucesso em vários estudos que avaliaram a progressão de lesões em órgãos importantes de peixes, com a inovação de auferir índices individuais (Triebkorn *et al.*, 2008; Costa *et al.*, 2009) e com a aplicação de análise estatística adequada.

Sendo assim, apesar das abordagens qualitativas serem as mais utilizadas no estudo de patologias originadas por xenobióticos em meio natural, são as abordagens semi-quantitativas e quantitativas que surtem melhores resultados acerca das reacções dos indivíduos à contaminação (Ayas *et al.*, 2007). As técnicas aplicadas em histopatologia

apresentam elevada sensibilidade e revelam previamente as alterações que possam surgir ao nível fisiológico e ao nível das funções bioquímicas (Nero *et al.*, 2006).

2.3.1. Brânquias

As brânquias são órgãos extremamente importantes nos peixes pois exercem várias funcionalidades vitais: sendo a estrutura responsável pelas trocas gasosas com a água (hematose branquial), estão envolvidas nos processos de osmorregulação, equilíbrio ácido-base e excreção de compostos nitrogenados (Wilson e Laurent, 2002). Nos peixes ósseos, as brânquias situam-se na cavidade opercular e a sua organização básica é formada por arcos branquiais, de onde saem filamentos que são constituídos por lamelas secundárias paralelas entre si. Nas lamelas, o sangue flui no sentido contrário ao da água, pois a água flui entre as lamelas, sendo deste modo possível efectuar as trocas gasosas mantendo entre a água e os capilares branquiais o gradiente de concentração entre os gases respiratórios (mecanismo de contra-corrente). As lamelas são muito vascularizadas, e revestidas por tecido epitelial pavimentoso simples, e são suportadas por células pilares, nas quais formam lacunas por onde se inserem os vasos capilares sanguíneos. Nos filamentos branquiais também podem ser encontradas as células de cloreto, as células mucosas, os melanócitos, macrófagos e linfócitos (Figura 1), (Genten *et al.*, 2009).

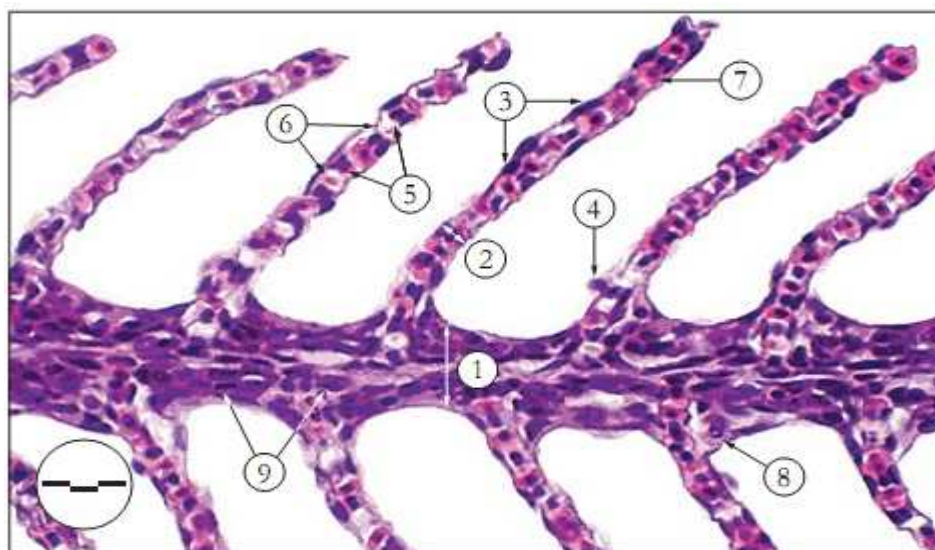


Figura 1 – Filamento branquial em corte transversal de um teleosteo (a barra de escala corresponde a 16,7 μm), onde: 1 – lamela primária; 2 – lamela secundária, 3 – célula epitelial; 4 – célula mucosa, 5 – célula pilar; 6 – lúmen capilar; 7 – eritrócitos; 8 – célula de cloreto; 9 – células basais (Extraído de Lins *et al.*, 2010).

Devido à multifuncionalidade das brânquias, ao seu permanente contacto com o meio aquático, à área superficial que dispõem e à sua localização face ao meio externo, este órgão é particularmente interessante como indicador da contaminação ambiental aquática. Uma vez que os contaminantes têm uma acção directa sobre as brânquias, estas reflectem em primeiro lugar os efeitos desfavoráveis da contaminação, sendo por isso as alterações histopatológicas nas brânquias utilizadas como um método viável e reconhecido em programas de monitorização (Wilson e Laurent, 2002). Desta forma, as brânquias na presença de contaminação podem manifestar alterações que podem ser consideradas como respostas de defesa, designadamente diminuição da área de contacto entre o meio externo e o meio interno (Bernet *et al.*, 1999; Cinar *et al.*, 2009). Quando existem perturbações no funcionamento das brânquias provocadas pela exposição continuada a xenobióticos, estas podem de algum modo comprometer a saúde do indivíduo, e até mesmo ter implicações na sua vida, pela diminuição da eficácia respiratória (Leonardo *et al.*, 2001).

2.3.2. Fígado

O fígado é um órgão multifuncional e muito importante nos peixes, sendo responsável pela transformação, acumulação e excreção de contaminantes, sendo o primeiro órgão envolvido nos processos de biotransformação de xenobióticos (Carola *et al.*, 2009). Este é composto por hepatócitos e por fibras com funcionalidades de sustentação. Os hepatócitos são células com um ou dois núcleos, de forma poliédrica e apresentam funções muito importantes no metabolismo de proteínas, lípidos e hidratos de carbono e também é um local de armazenamento de nutrientes. No fígado também é possível encontrar vasos sanguíneos de pequenas dimensões (vasos sinusóides), ductos biliares, tecido conjuntivo e centro de melanomacrófagos. Estes centros de melanomacrófagos são aglomerados de monócitos que por sua vez contêm melanossomas, que têm a funcionalidade de produzir radicais livres (Figura 2), (Genten *et al.*, 2009).

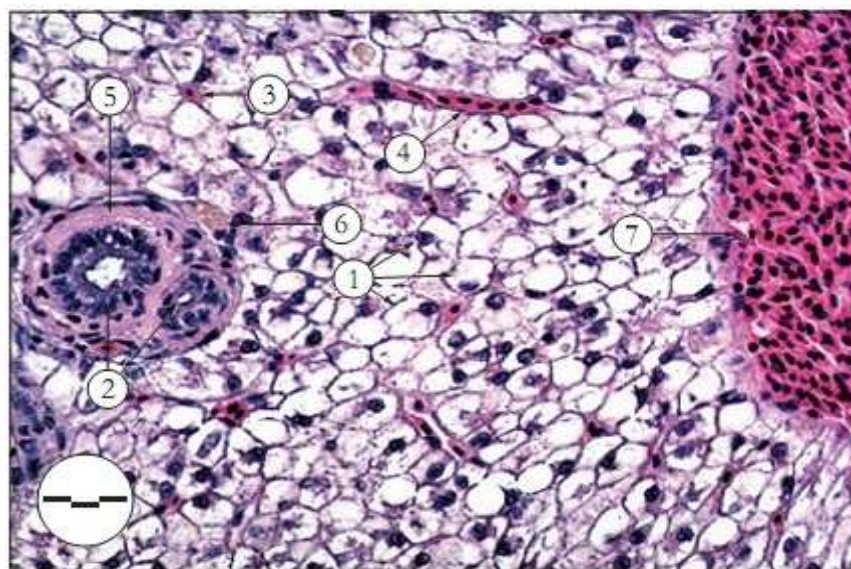


Figura 2 – Fígado em corte transversal de um teleosteo (a barra de escala corresponde a 22,8 μm), onde: 1 – hepatócitos, 2 – ductos biliares; 3 – vasos sinusóides; 4 – vaso sinusóide; 5 – tecido conectivo; 6 – centro de melanomacrófagos; 7 – veia porta (Extraído de Lins *et al.*, 2010).

Uma vez que o fígado está relacionado com a metabolização de xenobióticos e demonstra sensibilidade a estes no meio ambiente, o fígado revela ser um bom indicador histopatológico da qualidade do meio ambiente (Cengiz e Unlu, 2006; Matos *et al.*, 2007). O fígado pode funcionar como uma ferramenta em estudos de biomonitorização, pois é cada vez mais evidente uma relação de causa e efeito entre os contaminantes ambientais e as lesões nos fígados de peixes (Lang *et al.*, 2006). Sendo assim, a análise histopatológica do fígado permite relacionar os efeitos provocados pela contaminação de origem antropogénica nos indivíduos. Na presença de contaminação o fígado pode desenvolver alterações funcionais e estruturais que podem ser utilizadas na biomonitorização de efeitos de contaminantes em indivíduos no seu estado natural (Carola *et al.*, 2009; Matos *et al.*, 2007). O comprometimento das funções hepáticas tem consequências negativas na saúde, crescimento e reprodução dos indivíduos (Koehler, 2004). Cada vez mais estudos demonstram que os biomarcadores histopatológicos conseguem relacionar a saúde dos peixes de forma muito mais clara do que os biomarcadores bioquímicos, pois é muito mais fácil depois extrapolar as informações para a comunidade e o nível de organizacional dos efeitos tóxicos (Costa *et al.*, 2009).

2.4. Biomonitorização da poluição aquática

A biomonitorização de um sem número de compostos que representam efeitos deletérios para o ecossistema aquático é extremamente complexa. No entanto, é essencial conhecer rigorosamente o tipo e extensões dos efeitos decorrentes da sua presença. A biomonitorização ambiental consiste na avaliação e caracterização, de forma sistemática, de respostas biológicas verificadas em organismos expostos, por intermédio dos denominados biomarcadores (van der Oost *et al.*, 2003). Mas esta análise não é considerada uma medida directa de alterações das respostas biológicas causadas pela poluição, uma vez que essas alterações podem advir não só por causas de

stress natural, mas também de outra forma que não a contaminação. No entanto, a biomonitorização de uma comunidade ao longo do tempo pode detectar algumas modificações biológicas, que sugerem que a biota sofreu alterações. Sendo assim, a biomonitorização ambiental pode funcionar como um sinal de alerta útil (Ravera, 2001). Para além disso, o uso correcto de dados de biomonitorização implica definir um sistema de referência que permita uma clara distinção entre as variações responsáveis por factores naturais e aqueles causados por impactes de origem antropogénica sobre as respostas dos biomarcadores (Sanchez *et al.*, 2010).

Existem vários métodos de biomonitorização aplicados actualmente nos ecossistemas aquáticos. A escolha do método adequado na biomonitorização depende fundamentalmente dos objectivos do estudo e dos recursos disponíveis (económicos, logísticos e materiais). Nesses métodos estão contemplados por exemplo os índices de diversidade, os índices bióticos, avaliação da bioacumulação e caracterização da toxicidade de contaminantes, abordagens multivariadas e metodologias com caracterização biológica (Li *et al.*, 2010), bioensaios para a análise da comunidade e biomarcadores que funcionam como uma medida funcional de exposição a factores de stress no organismo, a nível fisiológico ou comportamental (van der Oost *et al.*, 2003).

A monitorização ambiental ganhou maior notoriedade com a Directiva Quadro da Água (DQA, 2000/60/CE) aprovada pelo Parlamento Europeu e o Conselho da União Europeia em Outubro de 2000, com a finalidade de alcançar uma gestão sustentável da água nos Estados-Membros da União Europeia através da implementação de programas de monitorização. Estes programas de monitorização visam avaliar o estado químico e ecológico das massas de água de modo a alcançar o bom estado químico e ecológico dos mesmos, até ao ano de 2015 (Sanchez e Porcher, 2009; Ricciardi *et al.*, 2010). Daqui também surgiu o conceito de avaliação de risco ambiental (van der Oost *et al.*, 2003; Ricciardi *et al.*, 2010).

Para avaliar o estado ecológico das massas de água, várias abordagens e programas têm sido propostos e fundamentados, como sejam estudos que avaliam o potencial dos biomarcadores na avaliação do estado ecotoxicológico, quando aplicados em programas de monitorização da DQA (Sanchez e Porcher, 2009). Os biomarcadores acabam por funcionar como ferramentas no processo de biomonitorização, onde representam uma avaliação quantitativa dos efeitos de contaminantes (van der Oost *et al.*, 2003). Nomeadamente, o programa do serviço Geológico dos Estados Unidos da América *BEST* (Biomonitoring of Environmental Status and Trends) que demonstra ser um bom exemplo da aplicabilidade dos biomarcadores na biomonitorização de recursos hídricos. Sendo assim, no estudo anterior foram seleccionados uma série de biomarcadores (actividade da enzima etoxiresorufina-O-deetilase, actividade da lisozima, alterações histopatológicas, entre outras) analisados em várias espécies de peixes de água doce. Outro programa, mas desta vez aplicado a espécies de água salgada, é o *JAMP* (Joint Assessment and Monitoring Programme) que pretendeu avaliar as concentrações e os efeitos de contaminantes (metais pesados, hidrocarbonetos policíclicos aromáticos e tributilestanho) no ecossistema marinho. Para isso, recorreram a uma serie de parâmetros bioquímicos como a actividade da EROD, quantificação do citocromo-P450, determinação da actividade da AChE, entre outras; como complemento ao estudo, efectuou-se uma análise histopatológica e a determinação dos índices somáticos, entre outros. Tal como no programa *MEDPOL* (Program for the Assessment and Control of Pollution in the Mediterranean) foi utilizada uma abordagem com aplicabilidade de vários biomarcadores (Sanchez e Porcher, 2009).

Os métodos de biomonitorização ambiental a produtos químicos podem ser realizados a vários níveis utilizando para isso os biomarcadores (sub-organizacional), os bioensaios (organismos), os bioindicadores (populações) e os indicadores ecológicos (ecossistemas). No nível sub-organizacional podem-se utilizar técnicas de análise de processos bioquímicos e fisiológicos que permitem detectar situações anómalas; ao nível do organismo podem ser avaliados parâmetros de ecotoxicidade que reflectem o

crescimento, reprodução e sobrevivência dos indivíduos; nas populações os programas de biomonitorização podem analisar alterações na estrutura genética, na estrutura etária e abundância de uma população; nos ecossistemas, são observáveis alterações como composição das espécies, abundância e diversidade pode indiciar efeitos da poluição sobre as comunidades (Gestel e Brummelen, 1996). A compreensão adequada das relações entre as respostas dos biomarcadores e os de sobrevivência, crescimento, ou reprodução é considerado algo indispensável para o uso de biomarcadores na avaliação do risco ambiental. Deste modo é notório que deve-se aliar à biomonitorização química uma análise integrada de biomarcadores, para que a avaliação do risco ambiental seja credível (van der Oost *et al.*, 2003).

2.5. Utilização de peixes em ecotoxicologia

Os peixes são bons indicadores da poluição ambiental uma vez que através das suas respostas biológicas e bioquímicas é possível relacionar a presença de determinados xenobióticos no meio. Como consumidores que são, desempenham um papel primordial nas cadeias alimentares no sistema aquático devido à sua função no transporte de matéria e energia de níveis tróficos inferiores (produtores) para os superiores (consumidores), (van der Oost *et al.*, 2003). Tendo em conta que estes vertebrados se encontram em diversos habitats aquáticos (lagos, rios, estuários, mares e oceanos), apresentam grande diversidade de espécies e adaptabilidade a diversas condições, pelo que são frequentemente usados no estudo de um sem número de contaminantes sobre variadíssimas condições de exposição. A capacidade de se adaptar ao meio ambiente reside numa série de respostas que conduzem a alterações fisiológicas, hormonais e ou metabólicas, que podem constituir bons indicadores da interacção do indivíduo com o(s)

agente(s) químico(s) que de algum modo compromete(m) a saúde ambiental (Zhou *et al.*, 2008).

Para além destes factores, os peixes são fundamentais em estudos ecotoxicológicos porque revelam capacidades que desencadeiam acções adaptativas que tendem a auxiliar na manutenção da homeostasia corporal, permitindo-lhes desta forma sobreviver, reproduzir-se e colonizar novos sistemas aquáticos. A sua permanência prolongada em sistemas aquáticos sujeitos a contaminação pode desencadear alterações comportamentais, funcionais e fisiológicas que comprometem a sua sobrevivência (espécies mais intolerantes à contaminação) e alguns aspectos fundamentais, como capacidade de se alimentar, fugir dos predadores e capacidade de se reproduzir (Zhou *et al.*, 2008).

Um factor limitador na utilização de espécies de peixes (mas não relevante) é o facto de algumas apresentarem grande mobilidade, mas mesmo assim são considerados os organismos mais adequados para a monitorização de contaminação em sistemas aquáticos (van der Oost *et al.*, 2003). Para um organismo ser considerado um bom bioindicador na biomonitorização este deve: ser representativo de um determinado local; apresentar uma elevada abundância e distribuição, de modo a que as capturas não prejudiquem a espécie; apresentar uma longevidade que permita comparação entre diferentes estágios etários; apresentar suficiente material biológico (tecidos/células) que permita efectuar análises múltiplas em laboratório; ser de fácil amostragem e manutenção em laboratório; apresentar posição determinante na cadeia alimentar; poder acumular grande quantidade de contaminantes sem morrer; e apresentar uma boa relação dose-efeito. Sendo complicado identificar um bioindicador que englobe todas estas características, a selecção deve ter em linha de conta o objectivo primordial da biomonitorização (Zhou *et al.*, 2008).

2.5.1. *Anguilla anguilla*

A enguia caracteriza-se como tendo um corpo alongado e cilíndrico, com similitudes serpentiformes, possui barbatanas peitorais, dorsais e anais e muco muito abundante espalhado por todo o corpo. Apresenta maior actividade durante a noite, alimentando-se de crustáceos, moluscos, larvas de insectos aquáticos e de pequenos peixes. Os indivíduos podem atingir os 140 cm e pesar mais de 10 kg (Neto, 2008).

A enguia europeia é um peixe que apresenta um ciclo de vida muito particular. É uma espécie migradora catádroma (passa a maior parte da sua vida em água doce), migrando depois para o Mar dos Sargaços onde inicia a sua reprodução (Neto, 2008). As larvas depois de eclodirem são transportadas pelas correntes do Golfo e do Atlântico Norte e chegam passados 2 a 3 anos ao talude continental da Europa e Norte de África (Tesch, 2003). Depois sofrem uma metamorfose e transformam-se em enguias de vidro, também designadas de meixão, e é nesta fase que iniciam a sua migração para sistemas aquáticos de água doce (Rodríguez *et al.*, 2005). Após se estabelecerem em locais apropriados para o seu desenvolvimento, adquirem uma tonalidade amarelada – enguia amarela - e é nestes locais que passam a maior parte da sua vida (6 a 12 anos) até à fase onde se tornam enguias prateadas e atingem a maturidade sexual (Tesch, 2003). Posteriormente iniciam uma nova migração até ao Mar dos Sargaços, para a reprodução. Esta migração pode durar alguns meses e durante todo este percurso as enguias não comem, o que resulta na sua morte após a reprodução (Figura 3), (McCleave e Arnold, 1999; Tesch, 2003).

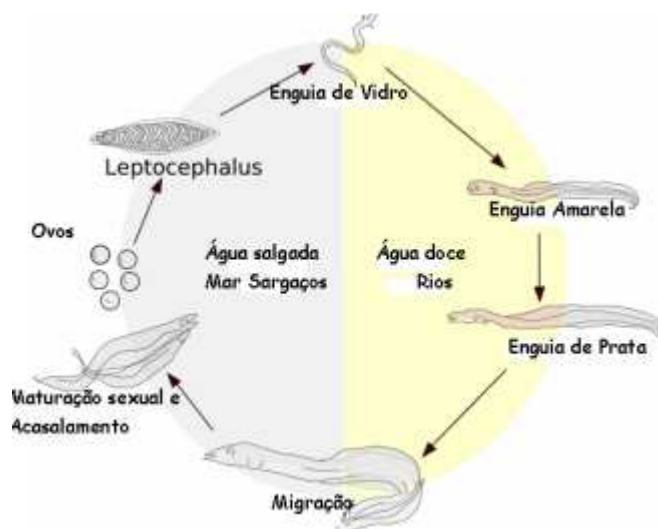


Figura 3 – Ciclo de vida da enguia europeia (*Anguilla anguilla*), (Alves, 2008).

A enguia pode ser encontrada em todas as bacias hidrográficas em Portugal, desde ao Rio Minho até ao Rio Guadiana, mas nos últimos 25 anos a sua abundância tem diminuído drasticamente. Os principais factores que têm levado ao seu declínio são diversos, desde já a pesca excessiva na costa continental em todos os estágios do seu ciclo de vida, perda de habitat, obstáculos à sua migração (barragens, açudes), parasitas, doenças bacterianas e virais e claro a níveis elevados de contaminação (Marohn *et al.*, 2008). As enguias são frequentemente utilizadas em estudos ecotoxicológicos porque são organismos que demonstram sensibilidade em termos de actividade enzimática (ex.: AChE na detecção de pesticidas) (Valbonesi *et al.*, 2011), em biomarcadores de stress oxidativo (Ahmad *et al.*, 2006), um possível bioindicador na contaminação por metais (Langston *et al.*, 2002), sendo sugerida a sua utilização em estudos de biomonitorização (van der Oost *et al.*, 1996).

2.5.2. *Gambusia holbrooki*

A gambusia (*Gambusia holbrooki*) é uma espécie de peixe de água doce, pertencente à família Poecillidae, possui uma tonalidade cinza e pequenos pontos espalhados pelo corpo e barbatanas, e as barbatanas são incolores ou amareladas. As fêmeas distinguem-se dos machos – dimorfismo sexual (Figura 4), por apresentarem um ventre arredondado e são de maior dimensão, enquanto que os machos dispõem da barbatana anal com raios mais alongados, funcionando como órgão reprodutor. A gambusia alimenta-se de ovos e larvas de anfíbios, peixes e insectos e por vezes pode até mesmo alimentar-se de indivíduos da sua espécie. Normalmente são indivíduos que habitam em água doce com pouca agitação, sistemas lânticos, lagos, lagoas, estuários e albufeiras (Cabral e Marques, 1999).



Figura 4 – Representação de uma fêmea (na parte superior da figura) e um macho (na parte inferior da figura) de gambusia (*Gambusia holbrooki*), (Extraído de: <http://forums.flytyer.com/forum/31-freshwater-tying/17801-mylar-minnow-mosquito-fish-and-others-baitfish>).

É classificada como uma espécie invasora de acordo com o Decreto-Lei n.º 565/99, de 21 de Dezembro. Esta espécie é nativa das zonas costeiras da América Central e foi sendo introduzida em determinados países com o intuito de combater determinadas

pragas de insectos aquáticos, que são vectores de transmissão da malária (Jakšić *et al.*, 2008), tendo sido esse o motivo que a levou a ser introduzida em Portugal por volta do século XIX. Esta espécie de água doce deve ser provavelmente a que se encontra distribuída pela maior área, tornando-se uma das 100 piores espécies invasoras de acordo com o Programa Global de Espécies Invasoras (GISP), (Alcarz e García-Berthou, 2007). Dada a sua capacidade em se adaptar facilmente a diferentes condições como águas com pouco oxigénio, à variação do teor de salinidade e a temperaturas altas, e a rapidez com que reproduzem, faz com que cause grande perturbação do funcionamento do ecossistema ao longo das cadeias tróficas. Vários estudos suportam que esta espécie compete por alimento com outras espécies nativas, levando ao declínio de espécies anfíbias (Stanback, 2008).

A gambusia é utilizada em Ecotoxicologia pelo facto de apresentar características intrínsecas muito vantajosas para práticas laboratoriais. Designadamente, é uma espécie de reduzidas dimensões (2-2,5 cm nos machos e até 5-6 cm nas fêmeas), adapta-se perfeitamente às condições de trabalho laboratorial (fotoperíodo, temperatura, alimentação) e condições experimentais (exposição), o seu ciclo de vida é relativamente curto, grande capacidade de disseminação (podendo ser encontrada em inúmeras bacias hidrográficas), adaptabilidade a condições de salinidade diversas (pode ser encontrada em ecossistemas de água doce, mas também se adapta a ecossistemas estuarinos – espécie eurihalina), (Nunes *et al.*, 2008). Esta espécie é representativa da classe trófica dos consumidores secundários, é uma espécie abundante e de fácil captura o que permite manter muitos indivíduos em pequenos aquários (Nunes *et al.*, 2004).

III: Caracterização da área a analisar – Barrinha de Esmoriz

A Barrinha de Esmoriz é uma lagoa costeira com imensos problemas ambientais, que incluem a contaminação das linhas de água que a alimentam, contaminação dos sedimentos e diminuição gradual da biodiversidade (mais visíveis), (Fernandes, 2007). Embora tenha sido utilizada como local de captura de organismos para alimentação humana com o passar dos tempos e com o avanço do tecido urbano, a poluição foi-se intensificando, tendo sido impossibilitado o contacto da população com este sistema lagunar. A Barrinha de Esmoriz assume-se como um caso de degradação acentuada, pelo que é de extrema importância identificar os efeitos biológicos passíveis de surgir em virtude da sua contaminação (Fernandes, 2007).

3.1. Caracterização da bacia hidrográfica

Por forma a enquadrar melhor a Barrinha de Esmoriz, é extremamente importante conhecer todo o domínio hídrico na sua envolvente. Deste modo, a bacia hidrográfica da laguna tem uma superfície de 78 km² e engloba os concelhos de Ovar, Espinho e Santa Maria da Feira. É alimentada pela ribeira de Paramos, que desagua na parte Norte da Barrinha, e pela vala de Maceda, que desagua na parte Sul. As linhas de água descritas têm problemas associados a descargas de efluentes domésticos e industriais. Na área envolvente à laguna costeira existe o predomínio de zonas urbanas intercaladas por zonas florestais e zonas industriais, e alguma actividade agrícola próxima das linhas de água (Figura 5), (Fernandes, 2007), sendo considerada uma zona de grande importância para a conservação da natureza. A sua importância foi reconhecida em 2000, onde foi inserida na lista nacional de Sítios de Interesse para a Conservação, decretada pela

Resolução do Conselho de Ministros de 76/2000 de 15 de Junho, integrando deste modo a lista nacional de Sítios da Rede Natura 2000.

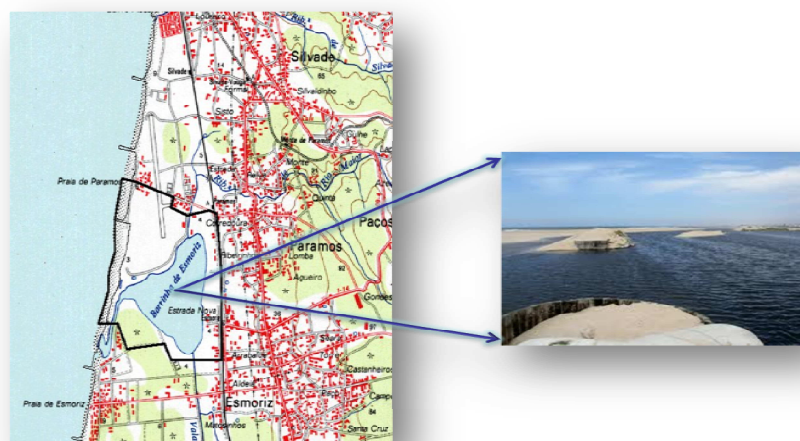


Figura 5 – Localização da bacia hidrográfica da Barrinha de Esmoriz e tipologia da sua envolvente (adaptado a partir de <http://ondaseventania.blogspot.com/2008/11/paisagem-protetida-da-foz-do-cster-e.html>).

A Barrinha de Esmoriz corresponde a uma zona estuarina altamente impactada por actividades antropogénicas, sejam elas as descargas provenientes de actividades industriais, agrícolas e o lançamento de efluentes de origem doméstica. Situa-se no litoral Norte de Portugal, nomeadamente entre os concelhos de Espinho (Norte) e Ovar (Sul). É uma laguna costeira com dimensões consideráveis (396 ha), e é alimentada por dois afluentes principais, altamente contaminados – ribeira de Paramos (Norte) e vala de Maceda (Sul). A Barrinha efectua ligação com o mar através de um canal artificial e de largura variável, com cerca de 600 m de comprimento. O contacto com o mar é interrompido durante a época balnear, devido ao elevado interesse turístico que apresentam os seus extensos areais. Sendo assim, durante o Verão a Barrinha de Esmoriz funciona como um sistema isolado e é alimentada apenas pelos seus afluentes, não estando sujeita ao regime de marés. Nesta altura a Barrinha de Esmoriz apresenta

um volume aproximado de 230.000 m³ de água e apresenta uma profundidade média de 1.5- 2 m, podendo em algumas zonas atingir cotas na ordem dos 2,5 m (SIMRIA, 2002).

3.2. Importância ecológica da Barrinha de Esmoriz

Os ecossistemas estuarinos, de uma forma geral, apresentam biótopos fundamentais para albergar diversas espécies de origem vegetal, animal e microbiológica (Figura 6). Não obstante, a Barrinha de Esmoriz é considerada como a zona húmida do litoral Norte, entre o estuário do rio Minho e a ria de Aveiro, com maior significância. Sendo assim, esta laguna costeira apresentou 11 habitats com atribuição de protegidos na Directiva Habitats. Este local é de extrema importância e pela sua particularidade é classificada como uma área sensível, o que faz com que esteja contida na Reserva Ecológica Nacional, na qual integra a Rede Natura 2000. A sua classificação como área protegida advém principalmente pelo facto de ser uma zona de estadia e/ou de passagem de aves, tendo muitas delas cariz de espécies em risco, ou em vias de extinção. Actualmente, a Barrinha de Esmoriz serve de suporte a uma menor diversidade de espécies, nomeadamente de origem piscícola, pelo facto das espécies com maior exigências de qualidade ecológicas terem desaparecido, ficando espécies com maiores resistências à contaminação e com menor potencial económico, como é paradigmático o exemplo da tainha (Fernandes *et al.*, 2008a). No entanto, ocorrem igualmente espécies como a enguia e a gambusia.



Figura 6 – Tipologia da biodiversidade e dos biótopos da Barrinha de Esmoriz (adaptado a partir de http://www.50espacos.campoaberto.org/espacos/lista/fichas/espinho/paramos/03/ficha_html/ficha.html).

3.3. Focos de contaminação

A descarga de fontes poluentes na Bacia Hidrográfica da Barrinha de Esmoriz sucede através de descargas não controladas de águas residuais domésticas, industriais e de origem difusa com origem nas actividades agrícolas e agropecuária. A maior parte dessas descargas têm origem no concelho de Santa Maria da Feira e são na sua maior parte de origem industrial, designadamente descargas directas, e ou indirectas, sem tratamento. As descargas são efectuadas por empresas de pequena e média dimensão. Estas situam-se de forma dispersa e muito próximas dos aglomerados populacionais e utilizam frequentemente, quando existem, as redes de drenagem de águas residuais para efectivarem as descargas de efluentes industriais (Fernandes, 2007).

O sector de actividade mais representativo associado às descargas poluentes na Barrinha de Esmoriz é maioritariamente da indústria da cortiça. Mas sectores como a indústria do calçado, indústria do papel e de cartão, indústria da madeira e do imobiliário, e a indústria de transformação de pedra também são responsáveis pelo agravar deste cenário. Existem também pequenas instalações, dispersas e em grande número, designadas de estações de serviço e de reparação automóvel e uma unidade de fabricação de produtos alimentares à base de carne (SIMRIA, 2002).

Sendo assim, a indústria da cortiça é caracterizada pela produção de efluentes ricos em SST (sólidos suspensos totais), CQO (carência química de oxigénio), CBO₅ (carência bioquímica de oxigénio), taninos e valores de pH geralmente ácidos. Ao longo das operações características deste sector são utilizadas soluções de cloro, ácido oxálico, hipoclorito de hidrogénio, ácido nítrico ou peróxido de hidrogénio. A indústria da pasta de papel é descrita como sendo grande consumidora dos recursos hídricos e por conseguinte grande produtora de efluentes líquidos. Os efluentes líquidos deste sector de actividade apresentam valores significativos de SST, CBO₅, de compostos clorados (álcoois, dioxinas, fenóis, metanol, acetona e clorofórmio), cloreto de metileno e dissulfito de carbono. Por outro lado, a indústria de transformação de madeira é caracterizada pela produção elevada dos parâmetros CBO₅ e CQO e quantidades significativas de creosato, sais metálicos de crómio, cobre, arsénio e boro, substâncias perigosas como etilbenzeno, amoníaco, antraceno, arsénio, compostos orgânicos de silício, crómio e diclorometano. Relativamente à actividade de transformação de metais, os efluentes líquidos gerados apresentam uma elevada toxicidade e são tipicamente caracterizados pelo baixo ou alto pH, dependendo se utilizam ácidos ou bases nas operações e presença de bases, cianetos, amoníaco, antimónio, bário, boro, cádmio, chumbo, cianetos, cobre, sílica, crómio e níquel. Aquando de determinadas operações são produzidos efluentes carregados com substâncias perigosas como benzeno, percloroetileno, tricloroetileno, 1,2-dicloroetano, 1,2-dicloropropano e 2-cloroetanol. Na indústria de produção de produtos químicos (tintas e vernizes) são originados

efluentes com pequenas quantidades de PCB's (bifenilos policlorados), benzeno, metais pesados (cádmio, chumbo, crómio, prata e níquel) acetato de trifenilestanho, tolueno, tricloroetileno e xileno. Quanto à indústria de transformação e corte de pedra, as águas residuais produzidas têm elevadas concentrações de SST. A unidade de produção de produtos à base de carne produz efluentes líquidos ricos em gorduras e matérias gordas biodegradáveis. Por último, as unidades caracterizadas de estações de serviço e de reparação automóvel produzem efluentes líquidos contendo óleos, produtos lubrificantes e aditivos, solventes, detergentes, cloronaftaleno, benzeno, amoníaco, metais pesados (berílio, níquel, chumbo, estanho, cobalto, cobre e molibdénio), (SIMRIA, 2002).

IV: Metodologia experimental

4.1. Localização das zonas de capturas

Os locais de amostragem seleccionados neste estudo foram a Barrinha de Esmoriz, a Pateira de Fermentelos e o Rio Minho (Figura 7). A Barrinha de Esmoriz situa-se mais precisamente no concelho de Espinho, freguesia de Paramos (a Norte) e no concelho de Ovar, freguesia de Esmoriz (a Sul), com coordenadas geográficas 40°58'N, 08°38'W. A Pateira de Fermentelos (40°34'30''N; 8°30'56''W) localiza-se no concelho de Águeda, distrito de Aveiro, distanciando-se cerca de 20 km da linha costeira. É uma lagoa situada a Norte de Requeixo e a Sul de Fermentelos, sendo alimentada a Sul pelo rio Cértima e a Noroeste pela ribeira do Pano, desaguando no rio Águeda. A Pateira de Fermentelos tem aproximadamente entre 3 km² (época seca) a 9 km² (época húmida). Esta lagoa de água doce tem sofrido um agravamento na qualidade da água devido a problemas relacionados com a eutrofização causada por efluentes domésticos, pelo

escoamento superficial de nutrientes e lixiviação de pesticidas de origem agrícola (Teles *et al.*, 2007). O estuário do Rio Minho localiza-se na fronteira entre Portugal e Espanha e é considerado uma das zonas menos contaminadas da costa portuguesa, sendo frequentemente utilizado como uma zona de referência em vários estudos científicos (Guimarães *et al.*, 2009; Gravato *et al.*, 2008; Monteiro *et al.*, 2007; Moreira *et al.*, 2006; Rodrigues *et al.*, 2006; Quintaneiro *et al.*, 2006).



Figura 7 – Mapa indicativo com os locais de captura deste estudo.

4.2. Estratégia, recolha e preparação das amostras

As espécies aquáticas seleccionadas neste estudo foram a gambusia (*Gambusia holbrooki*) e a enguia europeia (*Anguilla anguilla*) e foram capturadas nos três locais indicados (ver 4.1.) ao longo das quatro estações do ano. As gambusias foram capturadas com o auxílio de uma rede de mão, enquanto que as enguias foram gentilmente cedidas por pescadores artesanais locais e/ou foram adquiridas na loja de Caminha, onde foram capturadas com galrrichos e pesca de anzol. O esquema de capturas (Tabela 1) foi seguido durante todo o período de amostragem excepto nas estações do Outono e Inverno, no Rio Minho, devido ao facto da pesca da enguia estar legalmente interdita.

Tabela 1 – Esquema de amostragem.

Espécie	Biomarcadores enzimáticos (nº indivíduos por local e por estação do ano)	Biomarcadores histopatológicos (nº indivíduos por local e por estação do ano)	Nº total de indivíduos amostrados
<i>Anguilla anguilla</i>	10*	10*	100
<i>Gambusia holbrooki</i>	10	6	192

*As enguias utilizadas nos biomarcadores enzimáticos e biomarcadores histopatológicos foram as mesmas, não sendo necessário sacrificar mais animais, uma vez que estes disponham de material suficiente para utilizar em ambas as técnicas laboratoriais.

Após a captura/aquisição dos indivíduos, estes foram devidamente acondicionados e transportados, em arcas distintas (para cada uma das espécies), para o laboratório, onde foram seleccionados indivíduos com dimensões similares. Em seguida, os indivíduos foram sacrificados, por decapitação, sobre tampão fosfato gelado, e imediatamente dissecados. As 100 enguias capturadas foram medidas (comprimento total do indivíduo) e de seguida isolaram-se as brânquias, o fígado, músculo, cérebro e olhos e foram pesadas individualmente. Este procedimento foi necessário para auxiliar na definição das condições experimentais a utilizar aquando do processo de homogeneização. Os

Órgãos extraídos serviram para a quantificação dos biomarcadores enzimáticos e histopatológicos, nomeadamente: o cérebro e olhos destinaram-se à determinação da actividade da enzima acetilcolinesterase (AChE), uma parte das brânquias foi utilizada para a determinação da actividade da enzima catalase (CAT), uma parte do fígado destinou-se à determinação da actividade das isoenzimas glutathione-S-transferases (GSTs) e por fim, o músculo destinou-se à determinação da actividade da enzima lactato desidrogenase (LDH). Posteriormente, estas amostras biológicas foram conservadas em arca congeladora a temperatura de -20°C. As porções remanescentes, tanto de tecido hepático como branquial, foram destinadas à determinação do estado histopatológico dos tecidos, com recuso a técnica clássica da Hematoxilina-Eosina (HE).

4.3. Determinações enzimáticas

4.3.1. Determinação da actividade da enzima acetilcolinesterase (AChE)

Neste trabalho adoptou-se por determinar e quantificar a actividade da AChE no cérebro e olhos das gambusias e das enguias por ser esta a forma de colinesterase que se apresenta preferencialmente na cabeça destas espécies de peixes (Nunes *et al.*, 2005). O material biológico foi homogeneizado em tampão fosfato 0,1 M a pH 7,2 e durante todo este processo, as amostras foram mantidas em gelo. Após a homogeneização, as amostras foram centrifugadas a 4°C durante 3 minutos a 6000 rpm, e o sobrenadante foi armazenado e congelado a - 20°C para futura utilização. Ao retomar o procedimento experimental, seguiu-se a diluição da amostra e a determinação da actividade enzimática num espectrofotómetro leitor de microplacas, seguindo o protocolo descrito por Ellman *et al.* (1961). A acetilcolinesterase (AChE) é uma enzima que degrada o substrato

acetiltiocolina (análogo estrutural do neurotransmissor acetilcolina), em tiocolina e acetato. Por sua vez, a tiocolina complexa com o ditiobisnitrobenzoato (DTNB) produzindo um composto de coloração amarelada, cuja formação pode ser monitorizada a um comprimento de onda de 412 nm. A actividade da AChE é expressa em μmol de substrato hidrolisado por minuto, por mg de proteína.

4.3.2. Determinação da actividade da enzima catalase (CAT)

A actividade da catalase foi determinada no tecido branquial, tanto das gambusias como das enguias, e para esse efeito procedeu-se à homogeneização a frio das amostras em tampão fosfato 50mM, a pH 7,0 com 0,1% de Triton X-100. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 4°C durante 10 minutos, a 14000 rpm e o sobrenadante resultante deste procedimento foi armazenado e congelado (- 20 °C) para futura utilização. Posteriormente, foi efectuada a diluição adequada da amostra e a actividade da catalase nas brânquias foi determinada no espectrofotómetro UV/VIS., através da leitura da decomposição do peróxido de hidrogénio (H_2O_2) a um comprimento de onda de 240 nm, durante 30 segundos (Aebi, 1984). Para cada amostra foram efectuadas três leituras no espectrofotómetro. Sendo assim, as actividades das amostras foram expressas em μmol de H_2O_2 consumido por mg de proteína.

4.3.3. Determinação da actividade da enzima glutathione S-transferase (GST)

A actividade das isoenzimas GSTs foi determinada no fígado dos indivíduos capturados, após a homogeneização das amostras em tampão fosfato 50mM, a pH 7,0 com 0,1% de Triton X-100 e mantidas em gelo, e de seguida centrifugadas a 4°C durante 10 minutos a 14000 rpm. O sobrenadante foi posteriormente armazenado e congelado (a -20°C) para futura utilização. Após retomar o procedimento experimental foram efectuadas as respectivas diluições das amostras e foi efectuada a quantificação da actividade das GSTs, espectrofotometricamente num leitor de microplacas. A técnica utilizada foi desenvolvida por Habig *et al.* (1974). As GSTs catalisam a reacção de conjugação do substrato clorodisnitrobenzoato (CDNB) com a glutathione reduzida (GSH), formando-se um tioéter, que pode ser monitorizado pelo aumento da absorvância a 340nm. Os resultados obtidos foram expressos em nmoles de tioéter produzido por minuto, por mg de proteína.

4.3.4. Determinação da actividade da enzima lactato desidrogenase (LDH)

A enzima lactato desidrogenase (LDH) foi determinada no tecido muscular dos indivíduos capturados e as amostras foram homogeneizadas em tampão Tris/NaCl a pH 7,2 e mantidas em gelo. Após a homogeneização seguiram-se três ciclos consecutivos de congelamento e descongelamento das amostras a -20°C e à temperatura ambiente, de modo a facilitar a ruptura da membrana da célula muscular e deste modo externalizar o conteúdo enzimático que interessa determinar. Em seguida as amostras foram

centrifugadas a 4°C durante 3 minutos a 6000 rpm, e o sobrenadante daí resultante foi armazenado e congelado (-20°C). À semelhança das restantes enzimas, a actividade da LDH foi determinada no espectrofotómetro com leitor de microplacas Labsystem Multiskan Ex, tendo como linha orientadora a técnica descrita por Vassault (1983), com uma pequena adaptação para leitura em microplaca (Diamantino *et al.*, 2001). Este processo metodológico pode ser monitorizado a 339 nm durante cerca de 5 minutos, e verifica-se numa diminuição da absorvância da amostra, devido à redução do piruvato (substrato) em simultâneo com a oxidação do β -NADH na presença da enzima LDH. A actividade da LDH foi expressa em μmol de substrato hidrolisado, por minuto, por mg de proteína.

4.3.5. Quantificação da proteína total

A quantificação das proteínas totais foi determinada pela metodologia descrita por Bradford (1976), e a sua concentração foi determinada a 595 nm, com o intuito de normalizar os resultados das análises enzimáticas dos diversos organismos, e assim expressar a actividade enzimática em função da quantidade de proteína nas amostras analisadas.

4.4. Determinação histopatológica

O processamento histológico consistiu em fixar quimicamente (Bouin solution, Sigma) as amostras biológicas durante 24 horas, tendo sido posteriormente descalcificadas durante 12 horas (Declacifying solution-lite, Fluka). Foram seguidamente desidratadas, através de uma série de soluções de álcool com concentrações crescentes (álcool a 70%, 80%, 90% e 100%). Seguidamente, procedeu-se à diafanização com xilol durante duas

horas, sucedendo-se a submersão das amostras em parafina I, II e III a uma temperatura de aproximadamente 59°C. Os blocos de parafina foram posteriormente seccionados (6 a 7 µm) no micrótomo manual rotativo. Na fase posterior à colagem dos cortes nas lâminas, estas foram coradas em hematoxilina-eosina e visualizadas no microscópio óptico. As brânquias das gambusias foram estudadas com uma ampliação de 200 x, enquanto que os fígados a 400 x. As brânquias das enguias foram visualizadas a 100 x e os fígados a 400 x. Foram tiradas microfotografias com o auxílio de uma câmara USB (Olympus, SC30) acoplada ao microscópio óptico composto (Olympus, CX41).

Posteriormente foram avaliadas as alterações histopatológicas de forma qualitativa e semi-quantitativa nos órgãos-alvo (brânquias e fígado), segundo o método elaborado por Bernet *et al.*, (1999). Para isso foi necessário classificar as alterações histopatológicas em seis categorias distintas, designadamente: distúrbios circulatórios, citoplasmáticos, degenerativos, estruturais, inflamatórios e proliferativos. Além da classificação das alterações, foi-lhes atribuído um grau de severidade, de 1 a 6, que permitiu assim obter o índice patológico tendo em linha de conta a extensão da área afectada. Seguidamente, foram atribuídos factores de importância, de 1 a 3, a cada alteração encontrada, de modo a avaliar o grau de afectação sobre o peixe. O cálculo dos índices branquial (Ig) e dos índices hepático (II) resultou no somatório dos factores anteriormente descritos.

4.5. Análise estatística

Após a verificação da homogeneidade de variâncias e normalidade dos dados, optou-se por realizar testes paramétricos. A detecção de eventuais “outliers”, por via do teste de

Grubb's, resultou na sua eliminação. Realizou-se uma análise de variância bifactorial (Two-Way ANOVA) para verificar a existência de diferenças entre a estação do ano, local de captura e a interação entre estes dois factores, relativamente às médias dos vários parâmetros analisados. No caso de obtenção de diferenças significativas, aplicou-se um teste de Dunnet. O nível de significância adoptado nas várias análises foi de $p < 0,05$, e utilizou-se o software estatístico SigmaPlot 11.0.

V: Resultados

5.1. Biomarcadores enzimáticos

5.1.1. *Anguilla anguilla*

A Figura 8 representa os resultados obtidos nos biomarcadores analisados (AChE, CAT, GST e LDH) em *Anguilla anguilla* (Figura 8 e Tabela 2) na Barrinha de Esmoriz, na Pateira de Fermentelos e no Rio Minho, durante as quatro estações do ano (Verão, Outono, Inverno e Primavera).

Avaliação ecotoxicológica da Barrinha de Esmoriz, utilizando uma análise integrada de biomarcadores enzimáticos e histopatológicos

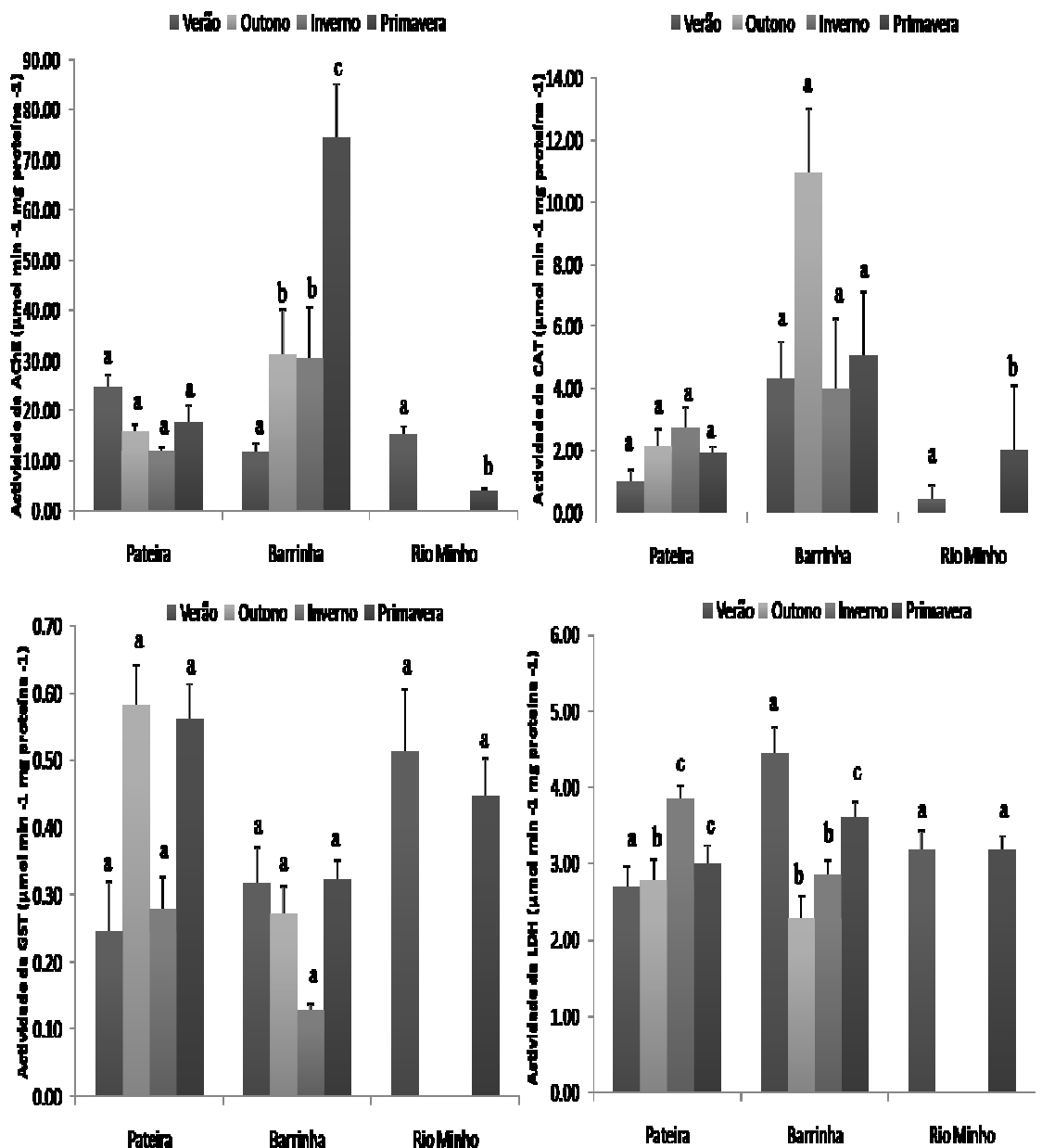


Figura 8 – Variação dos vários parâmetros enzimáticos (AChE, CAT, GST e LDH) em enguia europeia nos três locais amostrados (Pateira de Fermentelos, Barrinha de Esmoriz e Rio Minho), nas quatro estações do ano (Verão de 2010 a Primavera de 2011). Os valores correspondem à média das determinações efectuadas por local e por estação, e as barras de erro correspondem ao erro-padrão (as diferenças significativas estão representadas por letras diferentes dentro de cada local, $p \leq 0,05$).

Ao visualizar a Tabela 2 verifica-se que os dados apresentam alguma variabilidade, que pode ser observada sobretudo entre os locais. No entanto, existem diferenças significativas entre as estações do ano, para os biomarcadores enzimáticos AChE, GST e LDH, ou seja, é possível observar o contributo da sazonalidade. Verificam-se também variações significativas nas interacções local-estação, para as actividades das enzimas AChE e LDH.

Tabela 2 – Quadro-resumo da análise de variância bifactorial (Two-Way ANOVA) em *A. anguilla* para os vários parâmetros enzimáticos (AChE, CAT, GST e LDH). Para cada um dos factores, estão representados os graus de liberdade (g.l), a variância, o valor do teste de F, e o valor de probabilidade (p) associado. As diferenças estatisticamente significativas estão assinaladas a negrito.

Biomarcador	Fonte de Variação	g.l	Variância	F	P
AChE (cérebro e olhos)	Local	1	0,611	11,712	0,001
	Estação	3	0,361	6,926	<0,001
	Interacção (local * estação)	3	0,684	13,115	<0,001
	Residual	60	0,0522	–	–
CAT (brânquias)	Local	1	4,416	21,322	<0,001
	Estação	3	0,307	1,484	0,227
	Interacção (local * estação)	3	0,079	0,383	0,765
	Residual	66	0,207	–	–
GST (fígado)	Local	1	0,604	27,383	<0,001
	Estação	3	0,164	7,438	<0,001
	Interacção (local * estação)	3	0,043	1,949	0,130
	Residual	68	0,0221	–	–
LDH (músculo)	Local	1	0,008	0,616	0,435
	Estação	3	0,095	7,113	<0,001
	Interacção (local * estação)	3	0,136	10,199	<0,001
	Residual	70	0,0124	–	–

Analisando a evolução da actividade da AChE, verificou-se que não seguiu um padrão consistente entre os locais amostrados ao longo das estações do ano, tendo sido muito variável, sobretudo na Barrinha de Esmoriz. Na Pateira de Fermentelos a actividade da AChE é maior no Verão e na Primavera. Observaram-se diferenças significativas entre as estações Verão, Inverno e Outono, relativamente ao pico de actividade que se observa na Primavera, na Barrinha de Esmoriz (Figura 8). Relativamente à comparação entre os locais Barrinha de Esmoriz e Pateira de Fermentelos e a estação do ano Verão, Inverno e Primavera, não se verificaram diferenças significativas entre as actividades na AChE. Ao passo que no Rio Minho a actividade da AChE é relativamente inferior na Primavera em relação aos outros dois locais (Figura 8). A Tabela 2 permite observar que existem diferenças significativas na interacção local-estação, nomeadamente no Verão, Inverno e Primavera entre a Pateira de Fermentelos e a Barrinha de Esmoriz.

A actividade da CAT foi superior na Barrinha de Esmoriz no Outono e na Primavera, enquanto que na Pateira de Fermentelos seguiu um padrão regular com menor actividade no Verão, subindo depois sempre até ao Inverno, com uma descida na Primavera (Figura 8). Verificam-se contudo diferenças significativas entre o local (Tabela 2) Barrinha de Esmoriz e o local Pateira de Fermentelos para a actividade desta enzima. O Rio Minho apresenta o mesmo padrão na actividade da CAT, comparativamente com a Pateira nas estações para as quais existem resultados.

Relativamente à actividade das GSTs verifica-se que existe uma actividade significativamente superior no Outono e na Primavera face ao Inverno, quer na Barrinha de Esmoriz quer na Pateira de Fermentelos. Existem também diferenças significativas na actividade das GSTs entre os locais Barrinha de Esmoriz e a Pateira de Fermentelos. O Rio Minho por sua vez apresenta grande actividade na GST quer no Verão, quer na Primavera (Figura 8).

A actividade da LDH apresenta um padrão consistente sobretudo na Barrinha de Esmoriz, onde apresenta maior actividade no Verão e na Primavera, face ao Outono e Inverno. Pode-se verificar que existem diferenças significativas na Barrinha de Esmoriz relativamente às estações do ano, designadamente diferenças na actividade da LDH entre o Inverno e o Verão, entre o Verão e o Outono e entre a Primavera e o Outono. Na Pateira de Fermentelos também se verificam diferenças estatisticamente significativas entre as estações, nomeadamente, entre o Inverno e o Verão e o Inverno e o Outono (Figura 8). Quanto à análise entre a interacção do local e a estação, existem diferenças significativas entre a estação do ano Verão e Inverno nos locais Barrinha de Esmoriz e Pateira de Fermentelos (Tabela 2), onde se verifica maior actividade da LDH na Barrinha de Esmoriz, no Verão, face à Pateira de Fermentelos (Figura 8).

5.1.2. *Gambusia holbrooki*

Os dados obtidos nos biomarcadores analisados (AChE, CAT, GST e LDH) em *Gambusia holbrooki* (Figura 9) na Barrinha de Esmoriz, Pateira de Fermentelos e no Rio Minho, durante as quatro estações do ano (Verão, Outono, Inverno e Primavera) apresentam, em geral, uma elevada variabilidade.

Avaliação ecotoxicológica da Barrinha de Esmoriz, utilizando uma análise integrada de biomarcadores enzimáticos e histopatológicos

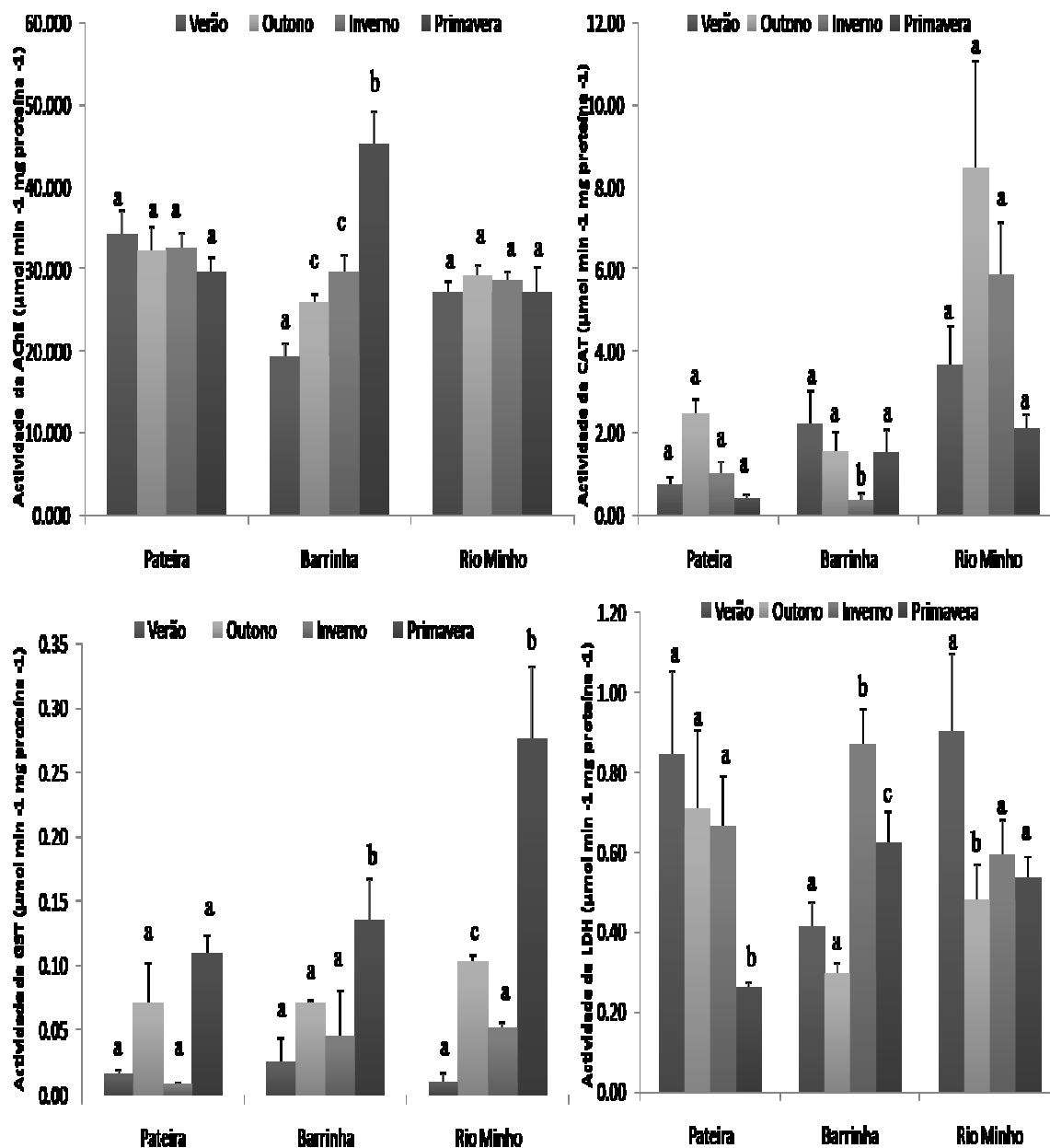


Figura 9 – Varia\u00e7\u00e3o dos v\u00e1rios par\u00e2metros enzim\u00e1ticos (AChE, CAT, GST e LDH) em gambusia nos tr\u00eas locais amostrados (Pateira de Fermentelos, Barrinha de Esmoriz e Rio Minho), nas quatro esta\u00e7\u00f5es do ano (Ver\u00e3o de 2010 a Primavera de 2011). Os valores correspondem \u00e0 m\u00e9dia das determina\u00e7\u00f5es efectuadas por local e por esta\u00e7\u00e3o, e as barras de erro correspondem ao erro-padr\u00e3o (as diferen\u00e7as significativas est\u00e3o representadas por letras diferentes dentro de cada local, $p \leq 0,05$).

O maior contributo para a variabilidade global dos dados foi a sazonalidade (Tabela 3). A variabilidade entre locais contribuiu menos para a variabilidade total dos dados (Tabela 3). No entanto, verifica-se que existiu uma variação significativa na interacção entre o local e a estação do ano em todas as determinações enzimáticas, evidenciando que os dados apresentam o mesmo padrão de variabilidade. Denotam-se semelhanças entre a enguia europeia e a gambusia nos padrões de resposta observados, designadamente nas variações significativas ao longo das estações do ano (nos casos da AChE, GST e LDH) e nas interacções local-estação (nos casos da AChE e da LDH).

Tabela 3 – Quadro-resumo da análise de variância bifactorial (Two-Way ANOVA) em *G. holbrooki* para os vários parâmetros enzimáticos (AChE, CAT, GST e LDH). Para cada um dos factores, estão representados os graus de liberdade (g.l), a variância, o valor do teste de F, e o valor de probabilidade (p) associado. As diferenças estatisticamente significativas estão assinaladas a negrito.

Biomarcador	Fonte de Variação	g.l	Variância	F	p
AChE (cérebro e olhos)	Local	2	0,035	4,420	0,014
	Estação	3	0,052	6,524	<0,001
	Interacção (local * estação)	6	0,090	11,305	<0,001
	Residual	105	0,008	–	–
CAT (brânquias)	Local	2	1,053	27,064	<0,001
	Estação	3	0,258	6,635	0,005
	Interacção (local * estação)	6	0,209	5,363	0,005
	Residual	14	0,039	–	–
GST (fígado)	Local	2	0,007	6,550	0,012
	Estação	3	0,029	25,962	<0,001
	Interacção (local * estação)	6	0,003	3,168	0,042
	Residual	12	0,001	-	-
LDH (músculo)	Local	2	0,034	0,799	0,453
	Estação	3	0,261	6,147	<0,001
	Interacção (local * estação)	6	0,273	6,421	<0,001
	Residual	110	0,061	–	–

Analisando a evolução da actividade da AChE, verificou-se que na Barrinha de Esmoriz existe um padrão, uma vez que a actividade desta enzima é inferior no Verão e vai crescendo progressivamente até à Primavera (Figura 9). Observam-se portanto diferenças significativas entre a Primavera e as restantes estações do ano. Quanto à Pateira de Fermentelos, verifica-se um cenário oposto ao da Barrinha de Esmoriz no que respeita à evolução da actividade da AChE (Figura 9). Deste modo verificam-se diferenças significativas na actividade da AChE na interacção entre o local e a estação do ano (Tabela 3), existindo diferenças significativas entre os 3 locais de amostragem, na estação do ano Verão.

Quanto à actividade da CAT, verifica-se um padrão consistente entre a Pateira de Fermentelos e o Rio Minho, relativamente à evolução da actividade ao longo das estações do ano; sendo a actividade da catalase no Rio Minho superior em relação aos outros dois locais. Sendo assim, existem diferenças significativas na actividade da CAT na Barrinha de Esmoriz nas estações do ano Verão, Outono e Primavera, face ao Inverno. Na Pateira de Fermentelos existem diferenças significativas na actividade da CAT entre as estações do ano Outono e Primavera (Figura 9). No entanto também a actividade da enzima catalase foi diferente, no Verão, entre animais capturados nas estações do Rio Minho e da Barrinha de Esmoriz, quando comparados com animais capturados na Pateira de Fermentelos. (Tabela 3). O mesmo sucedeu para a estação do ano Primavera e Outono. Quanto ao Inverno, existiram diferenças significativas para a actividade desta enzima entre animais do Rio Minho, da Barrinha de Esmoriz e da Pateira de Fermentelos e entre organismos da Pateira de Fermentelos e da Barrinha de Esmoriz.

A actividade das GSTs foi relativamente consistente entre animais provenientes de todos os locais amostrados, com a excepção da Pateira de Fermentelos no Inverno, onde a actividade nesta estação do ano foi inferior, comparativamente com as actividades

determinadas nos outros locais. Sendo assim, a actividade das GSTs na Pateira de Fermentelos apresentou maior actividade na Primavera e no Outono, à semelhança com a Barrinha de Esmoriz e o Rio Minho. Não obstante, observam-se diferenças significativas na actividade das GSTs no Rio Minho entre a estação do ano Primavera e as restantes estações do ano. Em animais da Barrinha de Esmoriz, existem diferenças significativas na actividade da GSTs entre a Primavera e o Verão. Na Pateira de Fermentelos não se verificaram diferenças significativas entre as estações do ano (Figura 9). No entanto, verificaram-se diferenças significativas na interacção entre o local e estação do ano (Tabela 3), designadamente na Primavera entre o Rio Minho e a Pateira de Fermentelos e o Rio Minho e a Barrinha de Esmoriz.

A actividade da LDH na Pateira de Fermentelos foi superior no Verão, e foi decrescendo do Verão até à Primavera. O mesmo não sucede na Barrinha de Esmoriz, onde a actividade da LDH foi superior no Inverno e menor no Outono. Relativamente ao Rio Minho, a actividade da LDH foi superior no Verão e inferior no Outono. A actividade da LDH apresenta diferenças significativas em todos os locais amostrados ao longo das estações do ano. Assim, animais do Rio Minho apresentaram diferenças significativas na actividade desta enzima entre a estação do ano Verão e Outono. Indivíduos capturados na Barrinha de Esmoriz apresentaram igualmente fortes diferenças na actividade deste biomarcador. Por outro lado, organismos da Pateira de Fermentelos apresentaram diferenças significativas entre o Verão e a Primavera, entre o Outono e a Primavera, e entre o Verão e a Primavera (Figura 9). Quanto ao local de captura, foram registadas diferenças nomeadamente entre o Rio Minho e a Barrinha e a Pateira e a Barrinha no Verão; entre a Pateira e a Barrinha no Outono; entre a Barrinha de Esmoriz e a Pateira de Fermentelos, o Rio Minho e a Pateira de Fermentelos na Primavera.

5.2. Biomarcadores histopatológicos

5.2.1. *Anguilla anguilla*

A quantificação dos biomarcadores em tecidos de enguia no local de referência evidencia alterações qualitativas nas secções de filamentos branquiais na Primavera, com levantamento epitelial (Figura 10), embora de forma pontual. Contudo, as amostras recolhidas no Rio Minho apresentaram, de uma forma geral, uma boa preservação da sua estrutura.

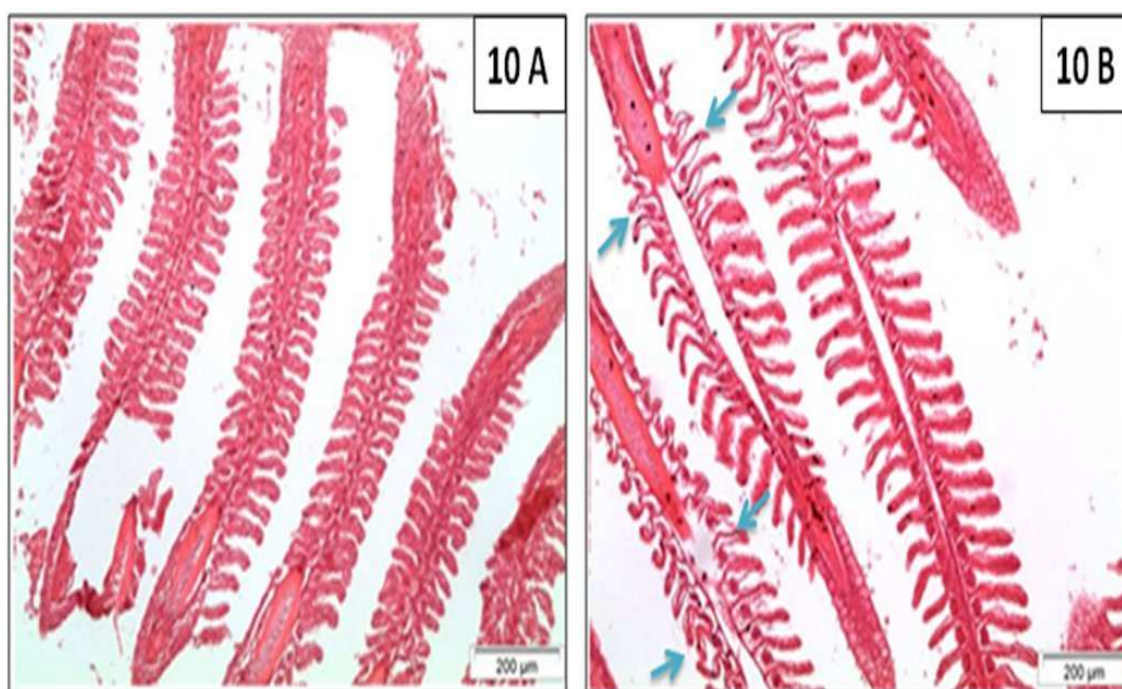


Figura 10 – Secção de filamentos branquiais de *A. anguilla* do Rio Minho (10 A: filamentos branquiais com aparência normal no Verão; 10 B: levantamento epitelial generalizado – setas, na Primavera).

Relativamente às amostras de *A. anguilla* recolhidas na Barrinha de Esmoriz, estas notoriamente apresentaram alterações patológicas diversificadas e mais extensas que as

observadas no local de referência. As patologias encontradas foram aneurismas de várias dimensões ao longo de todo o filamento branquial (Figura 11), fusão de lamelas branquiais (Figura 11 (B)) e hiperplasia do epitélio filamentar em grande parte das amostras (Figura 11 (A), (B) e (C)).

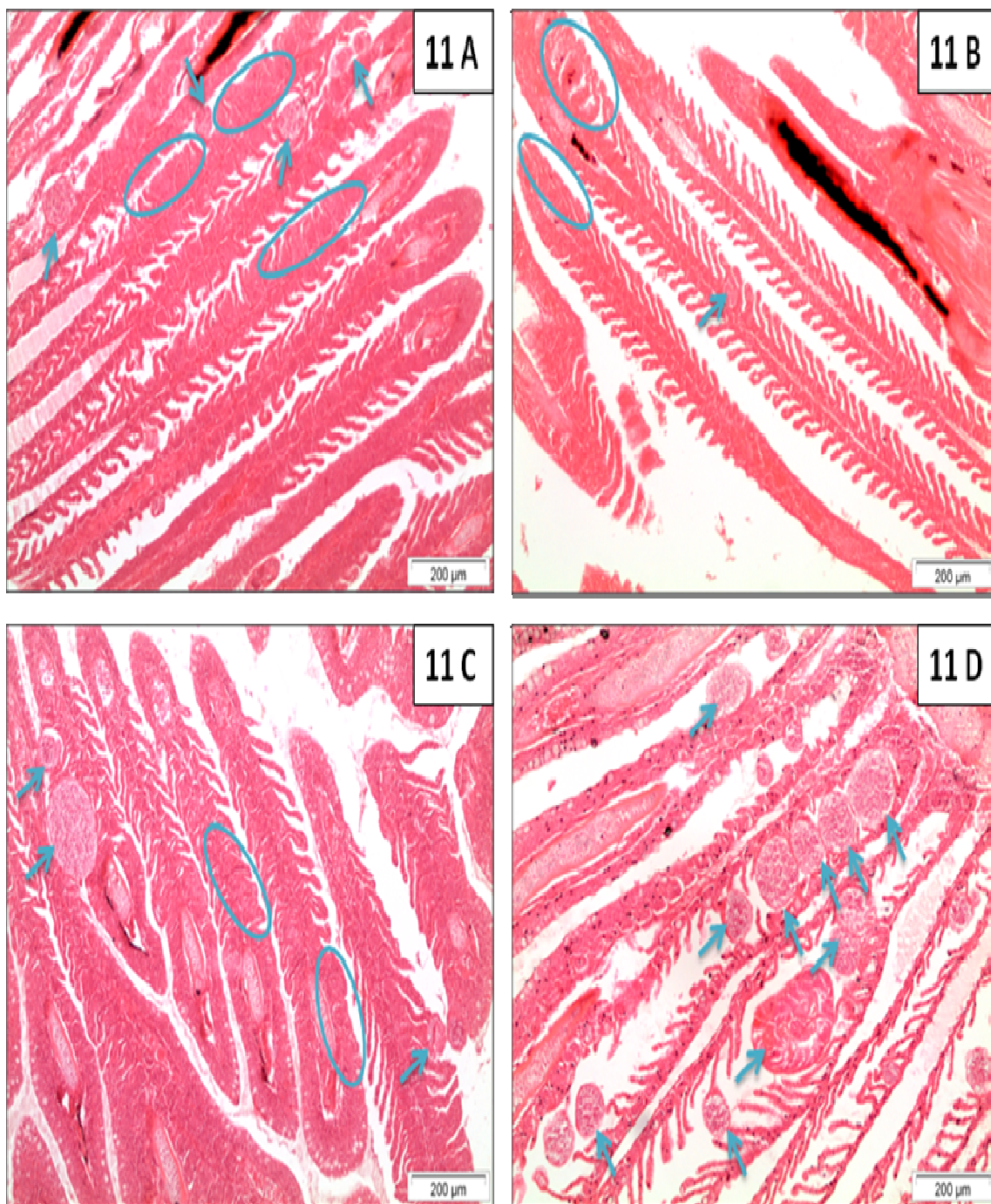


Figura 11 – Secção de filamentos branquiais de *A. anguilla* da Barrinha de Esmoriz (11 A: vários aneurismas – setas e hiperplasia do epitélio filamental com fusão lamelar – círculos, no Verão; 11 B: 1 aneurisma – seta, hiperplasia do epitélio filamental com fusão lamelar – círculo superior e fusão das lamelas secundárias – círculo inferior, no Outono; 11 C: vários aneurismas – setas e várias hiperplasias do epitélio filamental com fusão lamelar – círculos, no Inverno; 11 D: inúmeros aneurismas disseminados por todos os filamentos brânquias – setas, na Primavera).

Quanto às amostras de *A. anguilla* recolhidas na Pateira de Fermentelos, estas apresentaram as mesmas patologias encontradas nas amostras recolhidas na Barrinha de Esmoriz, mas com a diferença de as lesões não serem tão extensivas e em tão grande número. Denota-se que em organismos da Pateira de Fermentelos os filamentos branquiais estão em melhores condições e com uma estrutura muito mais preservada do que as encontradas em animais provenientes da Barrinha de Esmoriz (Figura 12).

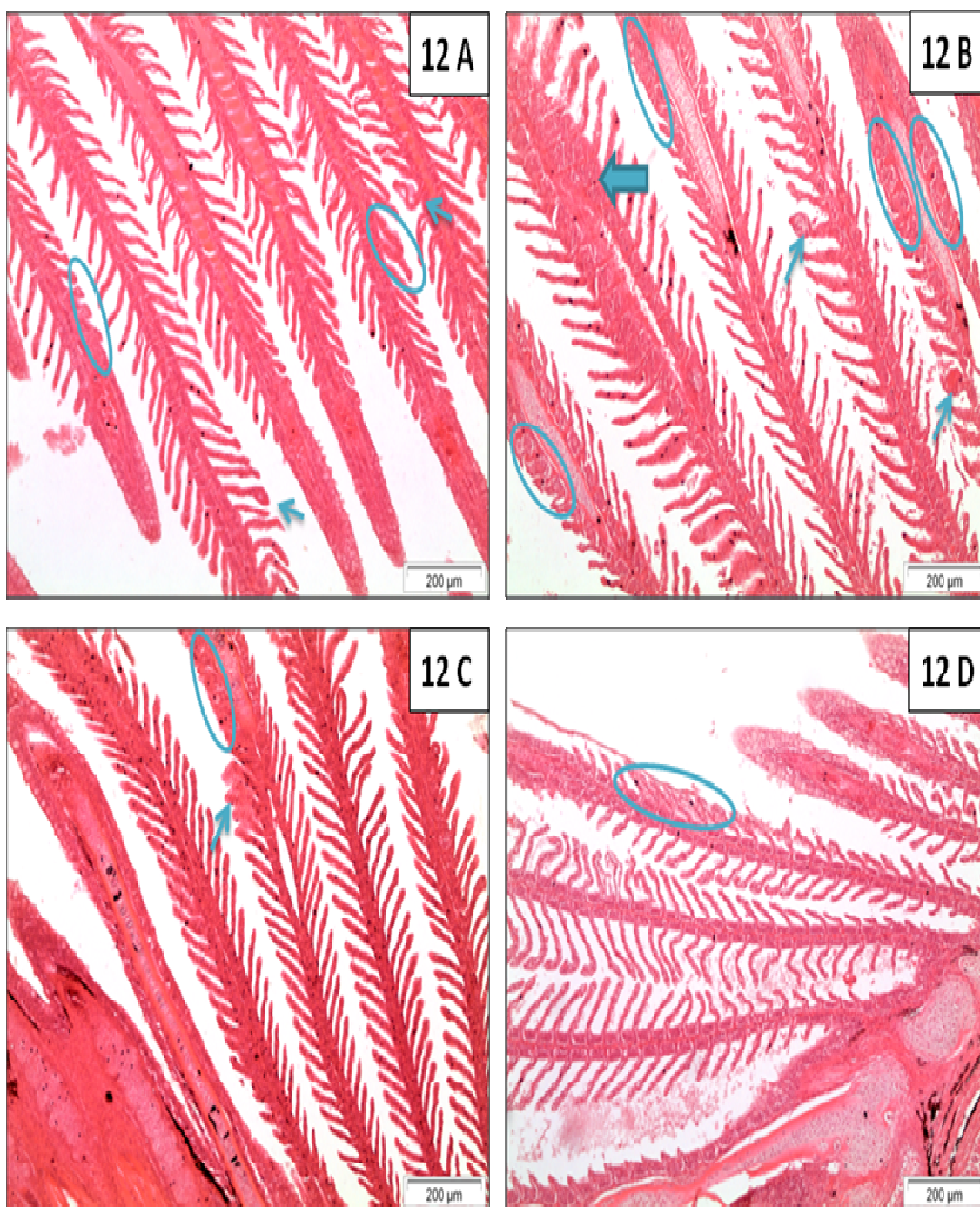


Figura 12 – Secção de filamentos branquiais de *A. anguilla* da Pateira de Fermentelos (12 A: aneurismas – setas e hiperplasia do epitélio filamental com fusão lamelar – círculos, no Verão; 12 B: aneurismas – setas estreitas, vasodilatação na linha central vascular lamelar – seta ampla e fusão das lamelas adjacentes – círculos, no Outono; 12 C: aneurismas com fusão vascular – seta e fusão de lamelas secundárias – círculo, no Inverno; 12 D: fusão de lamelas secundárias – círculo, na Primavera).

Na análise do tecido hepático em *A. anguilla* no local de referência foi possível observar na generalidade uma morfologia estrutural normal, evidenciando a maior parte das amostras hepatócitos com núcleo e citoplasma considerados normais. No entanto, em algumas amostras detectaram-se alguns edemas e em muito poucas amostras verificou-se a existência de hepatócitos vacualizados (Figura 13).

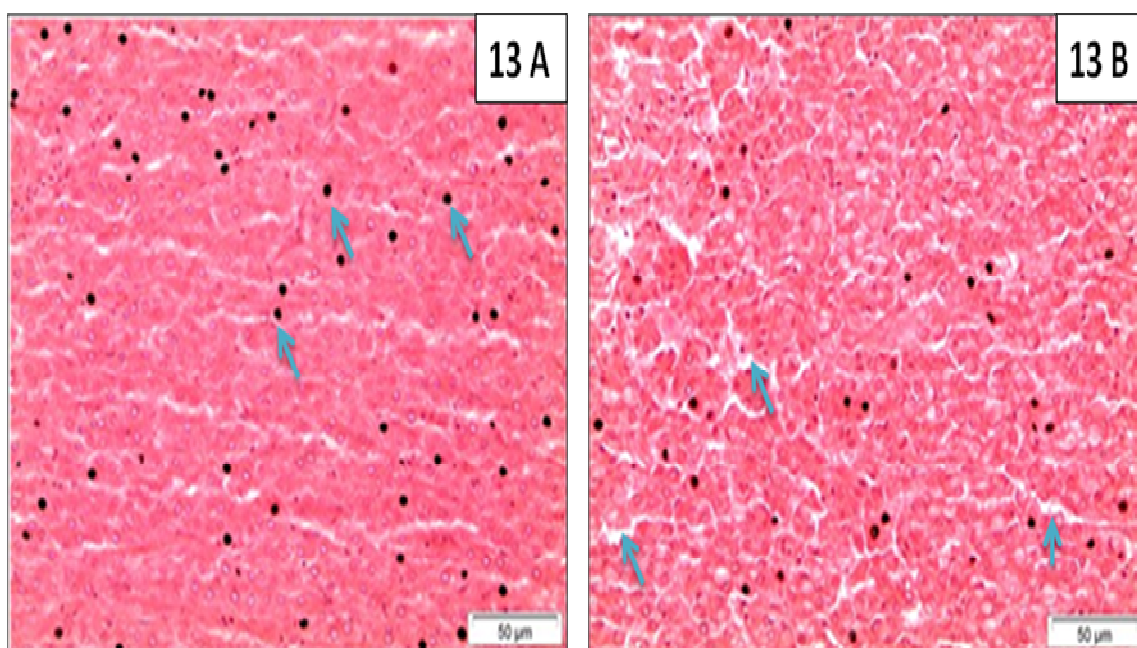


Figura 13 – Arquitetura de secções de fígado de *A. anguilla* do Rio Minho sem alterações histopatológicas (13 A: melanomacrófagos – setas, no Verão; 13 B: sinusóides – setas, na Primavera).

O tecido hepático de enguias capturadas na Barrinha de Esmoriz apresentou lesões na grande maioria das amostras analisadas, que vão desde edemas, sinais hemorrágicos (Figura 14 (A)), alargamento dos capilares sinusóides, a vacuolização muito pronunciada e extensa (Figura 14 (B)). Em poucas amostras visualizaram-se alguns núcleos picnóticos.

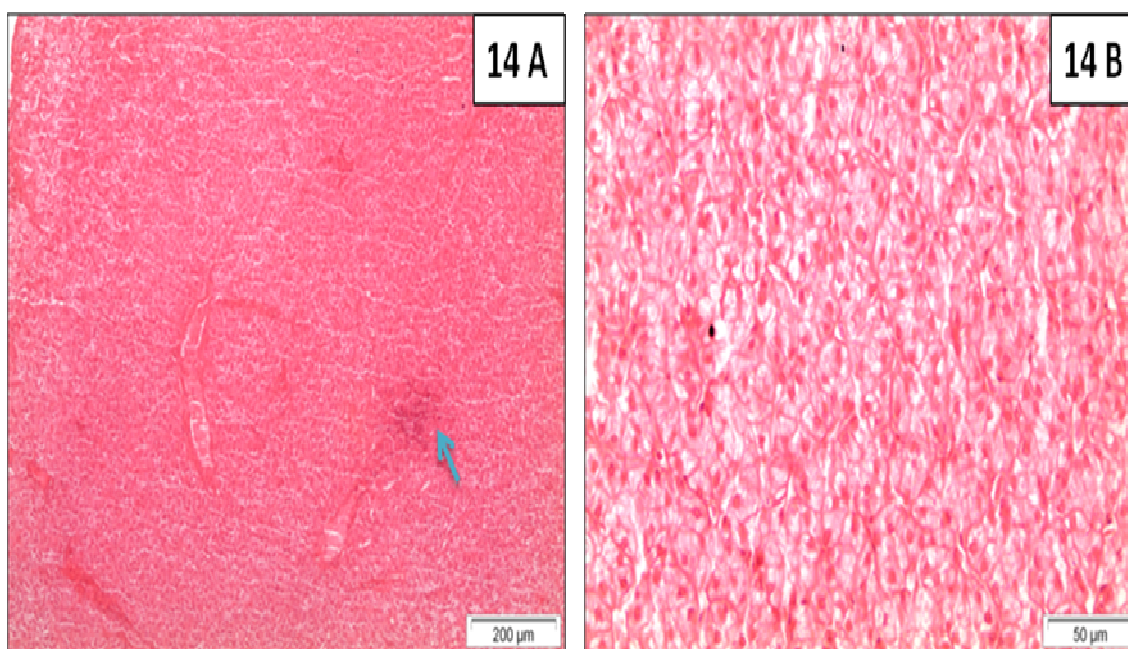


Figura 14 – Arquitetura de secções de fígado de *A. anguilla* da Barrinha de Esmoriz (14 A: sinal hemorrágico – seta, no Verão; 14 B: vacuolização hepática generalizada, no Outono).

As enguias capturadas na Pateira de Fermentelos apresentaram lesões ao nível do tecido hepático, nomeadamente edemas, alargamento dos capilares sinusóides (Figura 15 (A)) e vacuolização dos hepatócitos (Figura 15 (B)). As lesões encontradas no tecido hepático não aparentaram ser tão pronunciadas como nos animais capturados na Barrinha de Esmoriz.

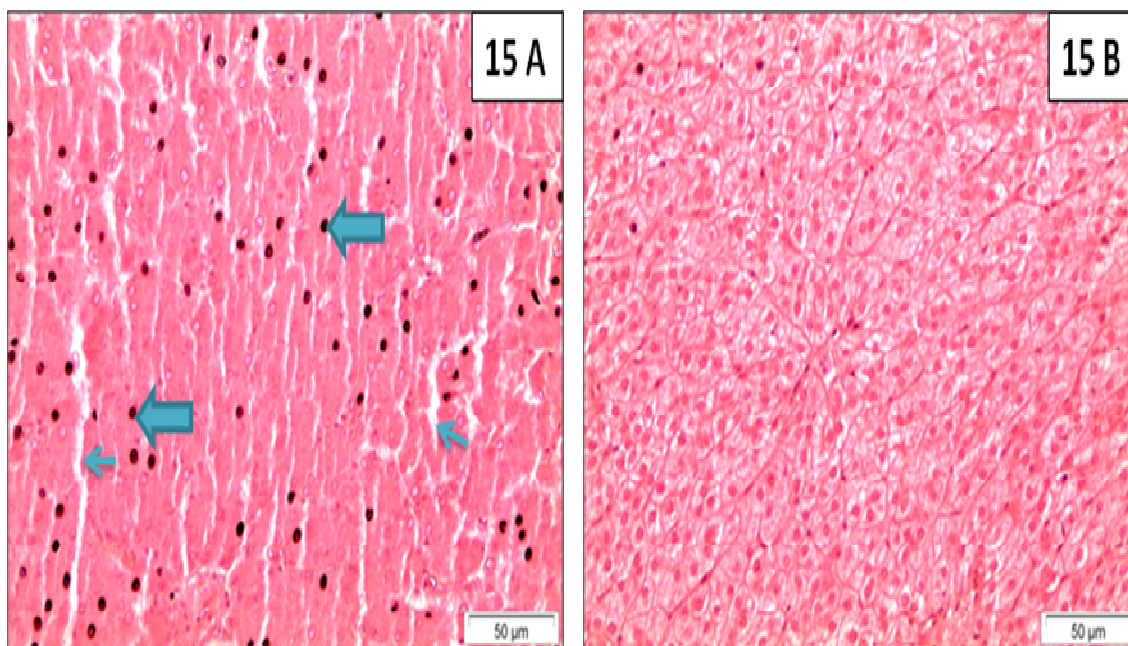


Figura 15 – Arquitectura de secções de fígado de *A. anguilla* da Pateira de Fermentelos (15 A: alargamento dos sinusóides – setas estreitas, melanomacrófagos – setas amplas, no Inverno; 15 B: vacuolização hepática na Primavera).

Os dados semi-quantitativos revelaram diferenças significativas (análise de variância bifatorial, $p < 0,05$) nas médias dos animais capturados no Rio Minho, (Figura 16) entre as duas estações do ano (no Verão e na Primavera) para o índice patológico branquial (IPB) e diferenças significativas entre locais (Barrinha de Esmoriz e Pateira de Fermentelos) no índice patológico hepático (IPF), (Tabela 4).

Avaliação ecotoxicológica da Barrinha de Esmoriz, utilizando uma análise integrada de biomarcadores enzimáticos e histopatológicos

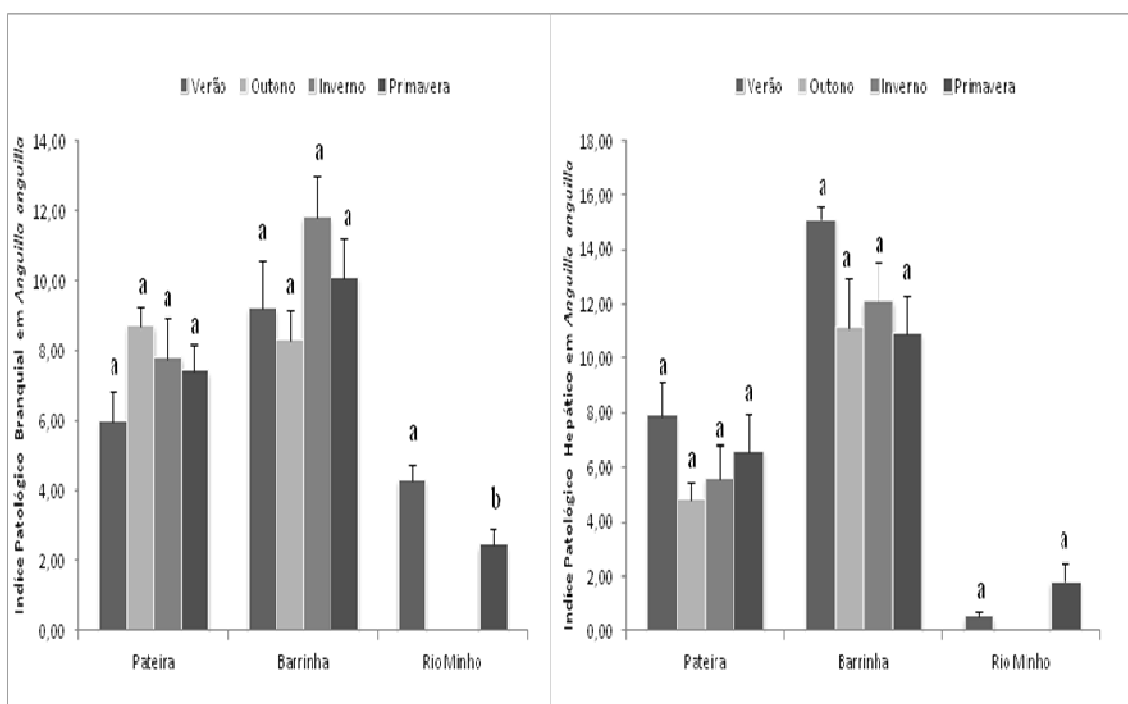


Figura 16 – Índice patológico branquial e hepático em *A. anguilla*, com o respectivo valor médio e erro padrão na Pateira de Fermentelos, na Barrinha de Esmoriz e no Rio Minho. As barras de erro assinaladas com letras diferentes são significativas dentro do local ($p < 0,05$).

No IPB verificou-se que existem, para além das diferenças significativas entre os animais dos locais Barrinha de Esmoriz e Pateira de Fermentelos, também diferenças entre as estações do ano Verão e Outono (Tabela 4).

Tabela 4 – Quadro-resumo da análise de variância bifactorial (Two-Way ANOVA) em *A. anguilla* para os parâmetros histopatológicos (brânquias e fígado). Para cada um dos factores, estão representados os graus de liberdade (g.l), a variância, o valor do teste de F, e o valor de probabilidade (p) associado. As diferenças estatisticamente significativas estão assinaladas a negrito.

Histopatologia	Fonte de Variação	g.l	Variância	F	p
Enguia – brânquias	Local	1	112,813	10,884	0,002
	Estação	3	16,379	1,580	0,202
	Interacção (local * estação)	3	18,546	1,789	0,157
	Residual	72	10,365	-	-
Enguia – fígado	Local	1	728,667	46,238	<0,001
	Estação	3	47,040	2,985	0,037
	Interacção (local * estação)	3	7,749	0,492	0,689
	Residual	71	15,759	-	-

5.2.2. *Gambusia holbrooki*

Os filamentos branquiais dos indivíduos do local de referência apresentaram algumas patologias, nomeadamente levantamento epitelial e fusão lamelar, sendo que o Verão apresentou-se como a estação com maior predominância de lesões, como hiperplasia do epitélio filamentar, mas sem relevância estatística. Contudo, o Rio Minho foi o local de proveniência dos animais onde foi possível observar amostras com uma melhor preservação estrutural dos filamentos branquiais (Figura 17 (A)).



Figura 17 – Secção de filamentos branquiais de *Gambusia holbrooki* no Rio Minho com aparência normal, no Inverno.

As brânquias analisadas nas gambusias da Barrinha de Esmoriz apresentaram várias alterações patológicas, sendo a mais recorrente a fusão de lamelas secundárias (Figura 18 (A)) e a hiperplasia do epitélio filamentar. Algumas amostras apresentaram também aneurismas. O mesmo pôde ser verificado em animais da Pateira de Fermentelos, mas com menor extensão das lesões, nomeadamente, a fusão de lamelas secundárias (Figura 18 (B)) e a hiperplasia do epitélio filamentar (Figura 18 (B)).

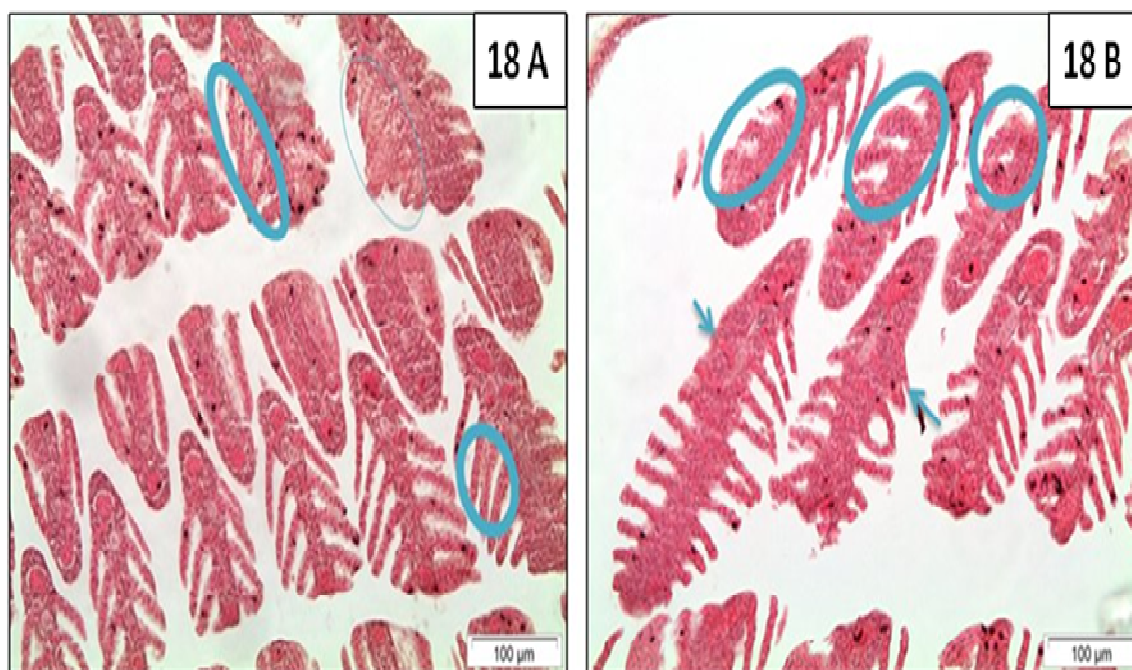


Figura 18 – Secção de filamentos branquiais de *Gambusia holbrooki* (18 A: fusão de lamelas secundárias – círculos densos e hiperplasia do epitélio filamentar com fusão lamelar – círculo, na Barrinha de Esmoriz, no Verão; 18 B: hiperplasia do epitélio filamentar com fusão lamelar – círculos densos e fusão de lamelas secundárias – setas, na Pateira de Fermentelos, na Primavera).

A grande maioria dos indivíduos do local de referência apresentava uma morfologia estrutural do tecido hepático normal (Figura 19). Contudo, foram detectadas algumas amostras com edema, alargamento dos vasos capilares sinusóides e vacuolização dos hepatócitos.

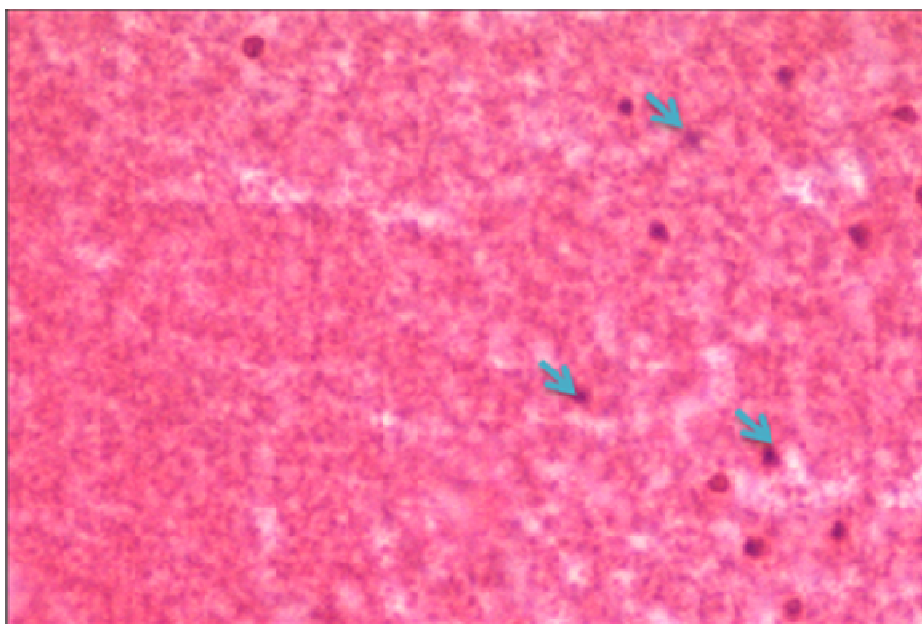


Figura 19 – Arquitectura de secções de fígado de *G. holbrooki* do Rio Minho sem alterações histopatológicas (eritrócitos – setas), no Verão.

Os indivíduos analisados na Barrinha de Esmoriz apresentaram todos danos no fígado, sendo a vacuolização dos hepatócitos a alteração dominante (Figura 20 (A)). Algumas amostras evidenciaram picnose e atrofia dos hepatócitos, particularmente no Verão e alargamento dos sinusóides na Primavera. Em organismos capturados na Pateira de Fermentelos também pôde ser detectada uma incidência de algumas alterações ao nível do fígado, nomeadamente, alargamento dos sinusóides (Figura 20 (B)) e vacuolização dos hepatócitos na grande maioria das amostras.

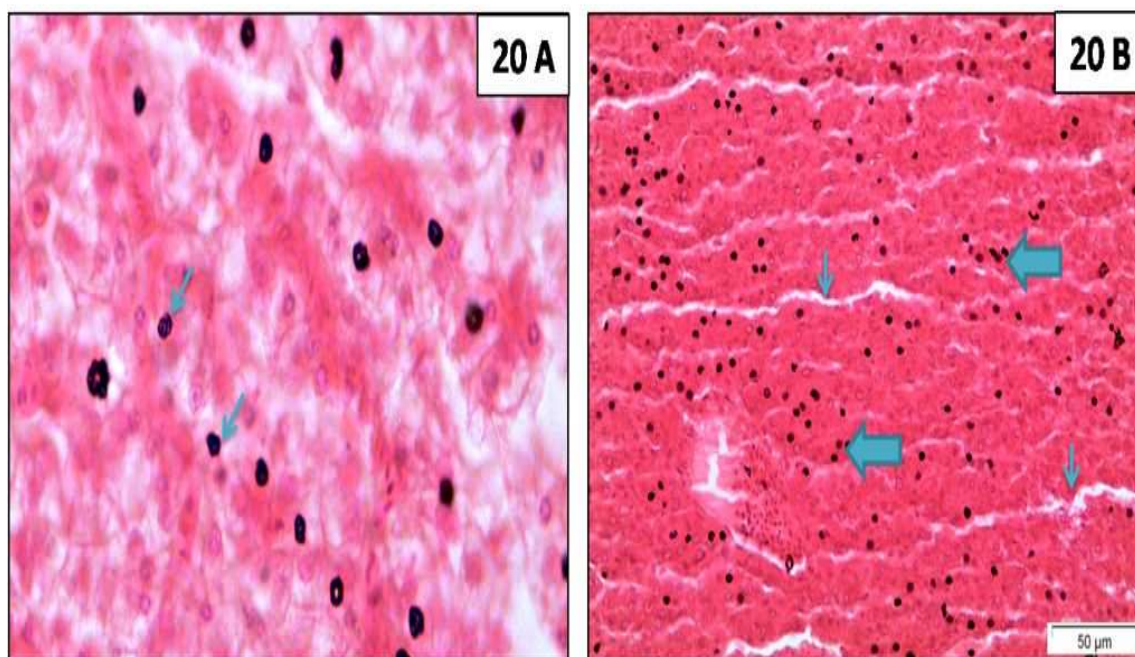


Figura 20 – Arquitetura de secções de fígado de *G. holbrooki* (20 A: vacuolização hepática generalizada e eritrócitos – setas, em animal capturado na Barrinha de Esmoriz, no Outono; 20 B: eritrócitos – setas amplas e alargamento dos sinusóides – setas estreitas, animal capturado na Pateira de Fermentelos, no Verão).

Ao analisar a Figura 21 verifica-se que o IPB na Pateira de Fermentelos é maior no Verão e menor na Primavera e Outono, enquanto que na Barrinha de Esmoriz o IPB é maior no Inverno e no Verão e menor na Primavera. Relativamente ao IPF na Pateira de Fermentelos e na Barrinha de Esmoriz, este é superior no Outono e inferior no Inverno e na Primavera (Figura 21). Foram ainda detectadas diferenças significativas nas médias para o índice patológico branquial (IPB) e para o índice patológico do fígado (IPF) em gambusia, entre os locais e as estações do ano, sendo que os animais da Barrinha de Esmoriz apresentaram valores superiores nestes dois índices, relativamente aos organismos dos restantes locais. Na Figura 21 observa-se de forma notória a existência de uma tendência decrescente generalizada em ambos os índices patológicos, ao longo das estações do ano nos indivíduos analisados de *G. holbrooki*, para todos os locais amostrados, embora não existam diferenças significativas.

Avaliação ecotoxicológica da Barrinha de Esmoriz, utilizando uma análise integrada de biomarcadores enzimáticos e histopatológicos

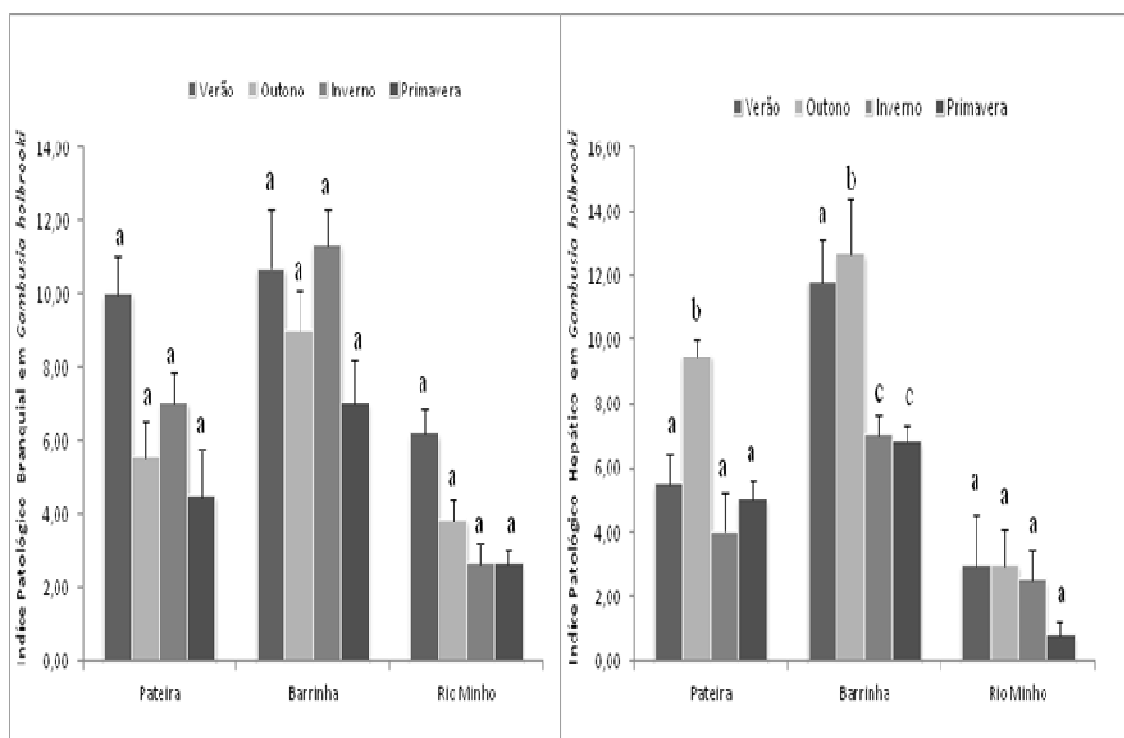


Figura 21 - Índice patológico branquial e hepático em *G. holbrooki*, com o respectivo valor médio e erro-padrão, de animais capturados na Pateira de Fermentelos, na Barrinha de Esmoriz e no Rio Minho. As barras de erro assinaladas com letras diferentes são significativas dentro do local ($p < 0,05$).

Na análise do IPB em relação ao local, verificaram-se diferenças significativas (Tabela 5) relativamente aos animais (gambusia) analisados do Rio Minho, da Barrinha de Esmoriz e da Pateira de Fermentelos, e diferenças entre os da Barrinha de Esmoriz e a Pateira de Fermentelos. Uma vez que a Barrinha de Esmoriz apresenta um IPB superior, comparativamente com os restantes locais, e o Rio Minho pelo contrário um IPB inferior aos restantes locais. Não obstante, também foram detectadas diferenças significativas entre as estações do ano (Tabela 5), onde o Verão apresentou diferenças em relação à Primavera e ao Outono, e o Inverno revelou diferenças significativas em relação à Primavera. Quanto ao IPF, verificaram-se diferenças significativas na Barrinha de Esmoriz ao longo do ano, com o Outono a apresentar diferenças em relação à Primavera e ao Inverno, e diferenças entre o Verão e a Primavera e o Verão e o Inverno.

Por sua vez, os organismos da Pateira de Fermentelos apresentaram diferenças significativas no Outono em relação às restantes estações. Sendo assim, foram ainda verificadas diferenças entre os três locais amostrados. Na análise do IPF também foram detectadas diferenças na estação do ano Outono para os três locais avaliados, e no Inverno existem diferenças entre o Rio Minho e a Barrinha de Esmoriz. Relativamente à Primavera também foram verificadas diferenças significativas entre os locais avaliados, em indivíduos de gambusia, designadamente, diferenças entre o local de referência e a Barrinha de Esmoriz e a Pateira de Fermentelos.

Tabela 5 – Quadro-resumo da análise de variância bifactorial (TWO-WAY ANOVA) em *G. holbrooki*. Para cada um dos factores, estão representados os graus de liberdade (g.l), a variância, o valor do teste de F, e o valor de probabilidade (p) associado. As diferenças estatisticamente significativas estão assinaladas a negrito.

Histopatologia	Fonte de Variação	g.l	Variância	F	p
Gambusia – brânquias	Local	2	192,722	31,252	<0,001
	Estação	3	56,315	9,132	<0,001
	Interacção (local * estação)	6	8,481	1,375	0,239
	Residual	60	6,167	–	–
Gambusia – fígado	Local	2	326,431	54,129	<0,001
	Estação	3	68,829	11,413	<0,001
	Interacção (local * estação)	6	14,579	2,417	0,037
	Residual	60	6,031	–	–

VI: Discussão

O conhecimento do destino e dos efeitos que os contaminantes exercem no biota revela-se importante, não só na monitorização da poluição por si só, mas também na avaliação do impacto potencial sobre os organismos (Schmitt-Jansen *et al.*, 2008). É evidente que num programa de monitorização ambiental é expectável que exista uma estratégia de pesquisa e de colheita/captura da(s) espécie(s) seleccionada(s) amplamente alargada, de pelo menos um ano, ou mais. A avaliação das variações sazonais pode reflectir-se nos

biomarcadores seleccionados e devem definir-se estratégias que permitam conhecer os níveis naturais das respostas dos organismos dos locais específicos, de forma a distinguir as respostas que são de origem natural daquelas verificadas num contexto de contaminação (Bodin *et al.*, 2004). No entanto, não existe um único biomarcador que consiga simultaneamente medir toda a contaminação ambiental e os efeitos daí decorrentes, sendo por isso utilizadas abordagens integradas que apliquem vários conjuntos de biomarcadores complementares e que hoje são reconhecidas na biomonitorização ambiental como ferramentas indispensáveis (Sanchez *et al.*, 2008).

Em estudos ecotoxicológicos, a actividade de enzimas responsáveis pela destoxificação do organismo ou pela manutenção do seu estado redox (que regulam o stress oxidativo) são cada vez mais utilizadas como ferramenta de avaliação dos efeitos tóxicos de substâncias antropogénicas. De entre estas, destaca-se a quantificação de enzimas como as glutationa-S-transferases (GSTs) e a catalase (CAT), ao nível das brânquias e fígado (Henson *et al.*, 2001; Atli *et al.*, 2006; Ogunji *et al.*, 2007). A determinação destas enzimas no fígado deve-se ao facto de este ser o principal responsável pela destoxificação do organismo, enquanto que as brânquias exercem um papel primordial na osmorregulação, equilíbrio ácido-base, sendo a principal barreira contra a entrada de xenobióticos no organismo e portanto a primeira linha de defesa e eliminação de contaminantes (Nunes *et al.*, 2008). O músculo dorsal é indicado para determinar a actividade da enzima lactato desidrogenase (LDH), cujo aumento indica que o organismo passou a usar de forma preferencial a via anaeróbia, em detrimento da via aeróbia para obtenção de energia (Wu e Lam, 1997; Nathan *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2011). Por sua vez, a determinação da actividade da enzima acetilcolinesterase (AChE) é muito utilizada, pois indica o efeito de compostos tóxicos como pesticidas das classes dos organofosforados e dos carbamatos, utilizados amplamente na agricultura, e que actuam por comprometimento da neurotransmissão (Ricciardi *et al.*, 2006; Nunes, 2011). A utilização de biomarcadores histopatológicos revela-se como uma boa ferramenta de apoio de estudos de biomonitorização ambiental, permitindo compreender

de forma mais perceptível a saúde dos indivíduos aquáticos e a poluição ambiental de corpos de água (Costa *et al.*, 2009). A sua execução revela ser útil na averiguação da presença de vários tipos de contaminantes, como metais (Pandy *et al.*, 2008; Costa *et al.*, 2011), compostos tóxicos usados em actividades agrícolas (Matos *et al.*, 2007) e hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (Wester *et al.*, 2002; Costa *et al.*, 2011).

A Barrinha de Esmoriz foi seleccionada para servir de local de estudo em termos de biomonitorização ambiental por se tratar de um sistema estuarino com contaminação documentada, com origens em unidades industriais de sectores como a cortiça, curtumes, calçado, madeira, papel, têxtil, metalurgia e metalomecânica, reparação automóvel e algumas unidades de agropecuária, bem como a indústria química que emprega produtos com tipologia abrasiva, detergentes, tintas e vernizes e descargas de origem doméstica (SIMRIA, 2002). Apesar de existir alguma informação acerca da origem da sua contaminação, considera-se essencial biomonitorizar a repercussão da contaminação na fisiologia dos organismos aquáticos. Alguns estudos anteriormente publicados referem a contaminação da Barrinha de Esmoriz designadamente por metais pesados (Fernandes *et al.*, 2007), (como o Pb, Zn e o Cu), por compostos orgânicos (como os PAHs) e outros, (como os PCBs) (Polis Litoral, 2010). No entanto, são muito escassos os dados que relacionem estes referidos compostos com alterações sensíveis nas espécies de peixes que habitam nesta zona. Assim, torna-se necessário caracterizar a resposta causada por um conjunto vasto de contaminantes, em comparação com um local moderadamente contaminado (Pateira de Fermentelos) e com um local considerado de referência, sem contaminação antropogénica evidente (Rio Minho).

A contaminação da zona da Barrinha de Esmoriz tem sido sistematicamente apontada como o factor causal para o seu estado ecológico deficiente. No entanto, poucos são os estudos que estabelecem uma relação directa entre a presença de contaminantes químicos de origem antrópica e efeitos biológicos. Assim, no estudo realizado na

Barrinha de Esmoriz e publicado pelo Polis Litoral (2010) relativo à análise do Estado Ecológico, constatou-se pela presença dos elementos biológicos (macro-invertebrados bentónicos, fitoplâncton, flora aquática e ictiofauna) que existe uma estrutura ecológica muito deficitária, o que indicia que o sistema lagunar se encontra sob forte pressão ambiental. No entanto, nada foi estabelecido como sendo a génese desta alteração ecológica, e que se repercute na alteração de parâmetros fisiológicos das espécies expostas. A abordagem utilizada em estudos prévios assenta numa caracterização ecológica retrospectiva, que mede quantidades de contaminantes, mas que não leva em linha de conta as alterações ao nível sub-individual, como no presente estudo, em que se pretendeu quantificar os desvios fisiológicos causados em duas espécies de organismos cronicamente expostos por via ambiental.

De um modo geral, a abordagem de monitorização ecológica seguida em estudos anteriores define que a contribuição antropogénica em termos de contaminação é severa, pois as comunidades actualmente presentes neste sistema lagunar são muito diferentes do que seriam as comunidades originais, existindo muitas espécies exóticas e muitas vezes abundantes, pouca diversidade de espécies, e estão ainda presentes espécies muito típicas de meios poluídos (Fernandes *et al.*, 2007). Relativamente aos parâmetros físico-químicos já determinados, é notória uma deficiente oxigenação em determinados pontos no interior da Barrinha de Esmoriz e na Ribeira de Paramos, o que depois se reflecte na tipologia de comunidades aí encontradas (nomeadamente, de macro-invertebrados). Deste modo, o oxigénio dissolvido é por vezes o factor limitante e condicionador da qualidade da água. Uma grande parte dos contaminantes do meio aquático surge associado à matéria particulada, o que faz com que grande parte destes contaminantes se acumulem junto ao fundo no compartimento sedimentar. Deste modo, a concentração de contaminantes nos sedimentos é muitas vezes superior à concentração encontrada na coluna de água (Polis Litoral, 2010).

6.1. Biomarcadores enzimáticos

6.1.1. AChE

Os dados obtidos relativos à inibição da actividade enzimática da AChE indicam que as variações da actividade desta enzima não seguiram um padrão consistente na comparação entre os locais amostrados (espaço), ao longo das estações (tempo) e nas duas espécies seleccionadas. Contudo, existem diferenças significativas em animais da Barrinha de Esmoriz no que diz respeito à actividade da AChE ao longo das estações do ano, nas duas espécies amostradas. Verifica-se que existe uma diminuição da actividade da AChE na Barrinha de Esmoriz, no Verão e para ambas as espécies amostradas. A inibição desta enzima pode ocorrer pela exposição a pesticidas (das classes dos carbamatos e organosfosforados), ou a compostos neurotóxicos similares (Peakall, 1992). No entanto, estudos mais recentes sugerem que esta enzima pode ser inibida por misturas complexas de poluentes (Forget *et al.*, 2003). Uma vez que a Barrinha de Esmoriz parece não ter na sua envolvente influências de práticas agrícolas com grande significância, e recebe de forma constante águas residuais não tratadas, que podem estar associadas a uma grande variabilidade de contaminantes, tais como os metais (origem industrial), é de supor que este fenómeno de inibição aqui observado decorra da presença destes agentes metálicos. Com efeito, esses metais podem inibir a actividade da AChE em peixes, tal como verificado em vários estudos com metais como o cádmio, cobre, zinco e mercúrio (Gill *et al.*, 1991; Guilhermino *et al.*, 1998; Mazón *et al.*, 1998; Diamantino *et al.*, 2003; Frasco, *et al.*, 2005). A presença destes compostos na Barrinha de Esmoriz foi já reportada. Na análise físico-química à qualidade da água e sedimentos na Barrinha de Esmoriz efectuadas em 2010 foram encontradas amostras com elevado teor de chumbo (Polis Litoral, 2010), e existem outros estudos efectuados no mesmo local que suportam a existência de contaminação por outros metais pesados, para além do chumbo, como o zinco e o cobre (Fernandes *et al.*, 2007). Assim, é possível que os agentes químicos que estejam subjacentes ao fenómeno de inibição colinesterásica

observado sejam metais; no entanto, a inibição da actividade da AChE pode decorrer da presença de outros contaminantes, como os detergentes de origem industrial, e efluentes de origem doméstica. No entanto, não é possível descartar em absoluto a potencial contaminação por pesticidas organofosforados e carbamatos de origem agrícola, muito embora no contexto da Barrinha de Esmoriz parece não ter a mesma significância que a contaminação de origem industrial por metais pesados. A importância dos dados aqui obtidos é elevada, pois a inibição desta enzima sugere efeitos deletérios na neurotransmissão, com possíveis reflexos no comportamento associado à alimentação, na capacidade de evitar a predação, no crescimento e na reprodução dos indivíduos afectados (Gravato *et al.*, 2010). A inibição da actividade da AChE resulta numa acumulação de acetilcolina provocando nos indivíduos afectados, uma anormal excitação pós-sináptica de forma continuada, o que pode levar a acções descontroladas dos neurónios que conduzem a uma hiperestimulação das fibras nervosas, o que leva a uma paralisia, ou até mesmo à morte do indivíduo, tal como o descrito por Chebbi e David, (2009). Estas alterações comportamentais poderão ter consequências populacionais importantes, incluindo o decréscimo do número de indivíduos, insucesso reprodutivo, ou diminuição do número de juvenis.

Os dados compilados para animais capturados na Pateira de Fermentelos são distintos, pois a actividade acetilcolinesterásica foi superior no Verão. Existem alguns estudos que sugerem que a actividade da AChE pode estar relacionada com factores adicionais. De acordo com o estudo de Ricciardi *et al.*, (2006) existe uma forte relação entre a actividade desta enzima e algumas variações sazonais, como o aumento da temperatura, que pode desencadear o incremento da actividade desta enzima. Os níveis aumentados para a actividade da enzima acetilcolinesterase no Verão, observados para animais recolhidos na Pateira de Fermentelos, poderão estar relacionados com o aumento geral da actividade metabólica que ocorre para temperaturas mais elevadas, tal como o descrito no estudo realizado por Forget *et al.*, (2003). Este estudo refere que se obtiveram níveis superiores de actividade na AChE no Verão e menores no Inverno, em

peixes; a actividade desta enzima não depende de forma directa da temperatura ambiente, mas sim da actividade fisiológica, que por sua vez está relacionada com a temperatura da água.

6.1.2. CAT

A enzima catalase tem como função primordial degradar o peróxido de hidrogénio, que resulta da degradação por via enzimática do radical superóxido. Este radical por sua vez surge sempre que há oxigénio molecular a ser utilizado em processos aeróbios, e em caso de stress oxidativo ocorre um aumento da sua produção. O stress oxidativo pode ser definido como uma reacção adversa, resultado da exposição de moléculas, células, ou tecidos a um nível excessivo de espécies radicais oxidantes, sobretudo a espécies reactivas de oxigénio (ROS) (Li *et al.*, 2011). Pode-se afirmar que o stress oxidativo é uma consequência da exposição dos indivíduos a uma grande variedade de condições ambientais, como a temperatura, o nível de oxigénio dissolvido, a salinidade, e, principalmente, aos contaminantes ambientais. Os organismos aquáticos possuem sistemas que produzem, mas também degradam, os radicais livres. Com a entrada constante no sistema aquático de xenobióticos de origem industrial e agrícola, resultantes das actividades antropogénicas, que promovem stress oxidativo, isto faz com que esse processo natural de produção e degradação de radicais livres seja perturbado. Essas perturbações que ocorrem em organismos aquáticos podem advir da água, sedimentos, matéria particulada em suspensão e do alimento (Lushchak, 2011).

A actividade da CAT medida nas brânquias de enguias não seguiu o mesmo padrão de resposta nas duas espécies analisadas. Verifica-se que ocorreu um aumento na sua actividade em indivíduos de *A. anguilla* capturados na Barrinha de Esmoriz no Outono,

enquanto que na Pateira de Fermentelos ocorreram ligeiras flutuações, não significativas. Comparativamente ao local de referência, denota-se que os indivíduos de enguia capturados na Barrinha de Esmoriz apresentam grande actividade na enzima CAT. Tal facto poderá ser indicativo da contaminação ambiental por compostos que induzem stress oxidativo. De entre estes, particular importância poderá ser atribuída aos compostos metálicos, novamente. De facto, está descrito que os metais podem exercer efeitos nocivos relacionados com o stress oxidativo; de entre os metais que o conseguem fazer, destacam-se os metais, cádmio (Cd), níquel (Ni), crómio (Cr), chumbo (Pb) e mercúrio (Hg); por outro lado, metais como ferro (Fe), zinco (Zn), cobre (Cu), selénio (Se) e manganês (Mn), são essenciais no metabolismo de peixes, mas em concentrações excessivas são considerados tóxicos (Vlahogianni *et al.*, 2007). Reconhece-se que os metais têm a capacidade de aumentar a formação de ROS (Livinstone, 2001), no entanto, os peixes possuem mecanismos compensatórios que permitem a sua destoxificação e excreção. Pode-se dizer que nesses mecanismos compensatórios estão envolvidas enzimas com efeitos antioxidantes como a CAT e a reacção de conjugação de compostos oxidantes com determinados co-factores endógenos como a glutathione, que favorece a excreção. Estas enzimas antioxidantes podem-se encontrar sobretudo nas brânquias e fígado (Atli *et al.*, 2006). O aumento da actividade da enzima catalase pode indicar que provavelmente ocorreu uma resposta fisiológica compensatória, adaptativa, a uma situação de stress oxidativo. Existem estudos que comprovam que a exposição de peixes a metais, é acompanhada por alterações na actividade da enzima CAT. A exposição a prata (Ag) e cobre (Cu) causa um aumento na actividade desta enzima determinada nas brânquias. (Atli *et al.*, 2006). O aumento da actividade da CAT, evidente sobretudo em enguias da Barrinha de Esmoriz, pode estar relacionado com o estabelecimento de stress oxidativo devido à presença de metais. Um estudo efectuado na Barrinha de Esmoriz demonstra a presença de metais pesados nos sedimentos, mas que estão disponíveis para absorção por organismos: um exemplo que o demonstra liga a bioacumulação destes compostos

metálicos (como o Cu e Zn) por indivíduos de *Liza saliens* (Fernandes *et al.*, 2007), causando stress oxidativo (Fernandes *et al.*, 2008a).

Apesar de algumas semelhanças nos padrões obtidos em enguias capturadas tanto na Barrinha de Esmoriz como na Pateira de Fermentelos, existem diferenças significativas entre ambos os locais. A actividade da enzima CAT, em animais provenientes da Barrinha de Esmoriz, é sistematicamente superior à actividade reportada nos animais da Pateira de Fermentelos. Tal sugere que a actividade superior da enzima CAT possa ser explicada pela possível superior contaminação química, por espécies pró-oxidantes (ex.: metais) na Barrinha de Esmoriz, como o verificado por Fernandes *et al.*, (2008a). A Pateira de Fermentelos possui vegetação autóctone propícia a acumular metais (jacinto-de-água, caniço) e outros elementos, constituindo uma boa forma de redução destes compostos na lagoa; adicionalmente, e considerando as suas superiores dimensões, o poder de diluição dos contaminantes na Pateira de Fermentelos é maior (Sena, 2007). A este cenário acresce um menor impacto da industrialização, em comparação com a Barrinha de Esmoriz.

A sazonalidade das variações da actividade deste biomarcador é igualmente interessante. A actividade da enzima CAT em indivíduos de *Gambusia holbrooki* capturados na Barrinha de Esmoriz foi maior no Verão do que no Inverno. Esta mesma situação foi verificada em outros estudos onde foram utilizados bivalves e peixes (Orbea *et al.*, 2002). Vários autores referem que a actividade da enzima CAT é normalmente maior na Primavera e no Verão (Viarengo *et al.*, 1991; Orbea *et al.*, 2002), e este padrão foi verificado para os indivíduos de gambusia analisados na Barrinha de Esmoriz. No entanto, tal facto não foi observado em animais capturados na Pateira de Fermentelos, sendo a actividade da enzima catalase maior no Outono e menor na Primavera.

No entanto, a actividade da enzima catalase nos indivíduos de gambusia capturados na Barrinha de Esmoriz e na Pateira de Fermentelos esteve bastante abaixo da actividade medida no local de referência. Existem estudos que indicam que a indução ou inibição da enzima catalase em peixes é resultante da exposição a poluentes ambientais (van der Oost *et al.*, 2003). Sendo assim, parece evidente a presença de contaminantes que têm a capacidade de inibir esta enzima, que pode ser desde contaminação de origem agrícola (herbicidas), (Ortiz-Ordoñez *et al.*, 2011), bem como certos elementos metálicos como o crómio (Atli *et al.*, 2006).

6.1.3. GST

As GSTs são enzimas que, tal como a enzima CAT, estão envolvidas nos processos relacionados com a destoxificação de elementos xenobiontes, pelo que reflectem portanto sinais de stress oxidativo. As isoenzimas GSTs são as principais enzimas envolvidas nos processos de destoxificação de fase II e podem ser encontradas no fígado, desempenhando dupla função, com um papel fundamental na manutenção da homeostase – efeito antioxidante e na remoção de vários compostos xenobiontes – a destoxificação. As células possuem um sistema antioxidante endógeno capaz de converter as ROS em substâncias menos prejudiciais, sistema antioxidante esse do qual fazem parte as GSTs. Estas enzimas antioxidantes são induzidas por vários contaminantes ambientais, onde numa fase inicial a sua concentração/actividade aumentam para combater sinais de stress oxidativo, mas uma exposição prolongada causa a sua depleção, levando a danos oxidativos (Vlahogianni *et al.*, 2007). Por outro lado, a destoxificação enzimática de xenobióticos de fase II, onde as GSTs estão envolvidas, consiste na transformação de xenobióticos a conjugados com características de maior solubilidade em água, constituindo-se como compostos com menor toxicidade.

As isoenzimas GSTs catalisam assim a conjugação dos xenobióticos com o substrato endógeno glutationa, conseguindo deste modo torna-los mais hidrossolúveis, para depois facilitar o processo de excreção dos mesmos (Cailleaud *et al.*, 2007).

Animais de ambas as espécies capturados na Pateira de Fermentelos não exibiram alterações significativas deste parâmetro, e o mesmo foi observado em animais provenientes do Rio Minho. Pelo contrário, os dados obtidos para esta enzima, em enguias capturadas na Barrinha de Esmoriz, revelaram uma redução evidente durante o período do Inverno. Tal facto pode ser explicado pela redução da temperatura da água nesta altura do ano, resultando portanto numa redução do metabolismo dos organismos aquáticos. Adicionalmente, a abertura do estuário da Barrinha de Esmoriz às marés, com consequente diluição dos compostos metálicos, favorece a redução das concentrações de metais, com diminuição da necessidade de efectuar metabolismo de fase II. As diferenças significativas entre períodos mais quentes e no Inverno sugerem uma grande importância da sazonalidade nas respostas das actividades das GSTs. A maior actividade das GSTs em animais capturados no Verão sugere a ocorrência de maior pressão pró-oxidante. Durante o Verão, existe maior incidência de radiação solar, com aumento por sua vez da degradação fotoquímica do carbono orgânico dissolvido na água, e maior libertação de ROS (Gorbi *et al.*, 2005). No entanto, os valores de actividade enzimática genericamente mais baixos encontrados em animais da Barrinha de Esmoriz podem ficar a dever-se à ligação directa de compostos químicos (nomeadamente, metálicos) à enzima. Os metais pesados podem alterar a actividade das enzimas através da ligação aos seus grupos funcionais (sulfidrilo, imidazol, carboxilo), ou através da deslocação do metal em associação com a enzima (Oliveira *et al.*, 2004).

6.1.4. LDH

A redução da actividade da LDH sugere alterações associadas às vias de obtenção de energia, e também a redução da capacidade de conseguir produzir energia de forma rápida devido a um estímulo repentino, que pode derivar da presença de predadores, captura de presas, e outros factores inesperados (Diamantino *et al.*, 2001). A energia também é fundamental no desenvolvimento do organismo, mas organismos expostos à poluição também necessitam de energia adicional para os processos de destoxificação. Em alguns estudos tem sido descrito que a energia canalizada para os processos de destoxificação tem um impacto sobre o crescimento do peixe. Com a capacidade reduzida em obter energia adicional, indivíduos sob stress químico terão provavelmente de aumentar a alocação de energia do crescimento para os processos de destoxificação e para os comportamentos repentinos necessários para a sobrevivência (Levesque *et al.*, 2002).

De acordo com os dados obtidos, para todos os locais de amostragem, a actividade da LDH variou significativamente consoante a estação do ano, apresentando maior actividade sobretudo nas épocas mais quentes. Isto verifica-se principalmente nos indivíduos de enguia provenientes da Barrinha de Esmoriz, onde foi encontrada maior actividade da LDH no Verão e na Primavera. Muitos autores mencionam que a variação na actividade da LDH pode ser influenciada pelo aumento da temperatura da água e consequente diminuição da concentração do oxigénio dissolvido na água (Diamantino *et al.*, 2001), pelo que se torna imperativo que o organismo passe a obter energia predominantemente pela via anaeróbia, em detrimento da via aeróbia. A LDH é uma enzima bastante importante na glicólise em condições de hipoxia (baixo teor em oxigénio), o que conduz à sua determinação para avaliar o estado metabólico dos indivíduos (Moreira *et al.*, 2006). O oxigénio dissolvido diminui durante o Verão em

muitas massas de água porque este é consumido durante a oxidação heterotrófica da matéria orgânica e da respiração pela flora e fauna aquática (Duhri e Sayah, 2009).

No estudo já referido a cargo do Polis Litoral (2010) é referido que a Barrinha de Esmoriz padece em muitos pontos de insuficiência de oxigénio na água, o que poderá ter contribuído para o aumento da actividade desta enzima no Verão e Primavera nos indivíduos de enguia analisados. De acordo com os dados obtidos a partir da estação de monitorização da Barragem de Castelo de Burgães, as temperaturas máximas nesta altura do ano, durante as campanhas de amostragem, oscilaram entre os 20 e os 25 °C. É de salientar também que a Barrinha de Esmoriz no Verão não está em contacto directo com o mar, o que faz com que as águas estejam mais paradas, existindo uma perturbação na hidrodinâmica, e surgindo problemas associados com o oxigénio dissolvido na água. Assim, é licito sugerir que a actividade diminuída da LDH, dos animais capturados nas campanhas de Outono e Inverno na Barrinha de Esmoriz, implica que estes organismos favoreçam a via de obtenção de energia por via aeróbia, em face do elevado teor de oxigénio na água característico de águas com baixas temperaturas, ao contrário do que ocorre durante a Primavera e Verão. Assim, pode assumir-se que os efeitos observados em termos da variação da actividade da enzima LDH ao longo do ano (maior actividade no Verão, menor no Inverno) possa decorrer das flutuações sazonais da matéria orgânica no meio e do teor em oxigénio dissolvido, e não devido à ocorrência de stress químico.

Pelo contrário, as enguias capturadas na Pateira de Fermentelos apresentaram diferenças significativas na actividade da LDH entre as várias estações do ano, tendo um pico máximo registado no Inverno. Isto poderá estar relacionado com as temperaturas atípicas no ano de amostragem. As temperaturas máximas, de acordo com os registos do Instituto de Meteorologia, mantiveram-se altas durante a Primavera, Verão e parte do Outono, proporcionando as condições ideais para a proliferação de jacinto-de-água

(*Eichhornia crassipes*). O estudo desenvolvido por Almeida (2006) caracteriza a presença de jacinto-de-água na Pateira de Fermentelos, cuja degradação causa significativa diminuição do oxigénio dissolvido na água. Com as temperaturas baixas verificadas habitualmente durante o Inverno, a sobrevivência destas plantas aquáticas é comprometida, propiciando situações de eutrofização dos sistemas aquáticos, com degradação oxidativa da matéria orgânica e conseqüente diminuição do oxigénio dissolvido. Tal facto poderá estar na base do aumento da actividade da LDH nos indivíduos de enguia europeia analisados provenientes da Pateira de Fermentelos.

Relativamente aos indivíduos de gambusia, verificou-se que na Barrinha de Esmoriz foi observada uma maior actividade de LDH no Inverno e na Primavera. É de referir que o habitat desta espécie é totalmente diferente do da enguia europeia, sendo uma zona de canais e de água pouco profunda. As diferenças significativas observadas entre as várias estações do ano, relativamente a este parâmetro podem ser explicadas pelas variações da temperatura e conseqüente variação do oxigénio dissolvido, que interferem com a actividade desta enzima. É de esperar que em momentos de temperatura superior (e menor concentração de oxigénio dissolvido disponível na água), seja reforçada a actividade desta enzima, para assegurar a produção de energia, mesmo em condições de quase anaerobiose. Adicionalmente, e em comparação com o observado para animais capturados no local de referência, a actividade da LDH em gambusias capturadas no Verão e no Outono encontra-se substancialmente mais baixa. A actividade da LDH pode ser inibida por alguns contaminantes encontrados na biota, tal como metais (zinco, cádmio, cobre), (Gill *et al.*, 1991, 1992; Diamantino *et al.*, 2001). É de sublinhar que os compostos metálicos já anteriormente referenciados como potenciais inibidores desta enzima foram identificados na área da barrinha de Esmoriz.

Os indivíduos de gambusia capturados na Pateira de Fermentelos evidenciaram maior actividade de LDH no Verão; os dados de temperatura permitem observar que esta foi a

estação do ano com temperaturas mais elevadas. Existe assim uma clara associação entre temperaturas mais elevadas e inibição da actividade da LDH, mais uma vez sugerindo que a depleção sazonal do oxigénio pode ser responsável pelos padrões obtidos.

Os resultados obtidos em ambas as espécies amostradas relativos à enzima LDH demonstram que existem diferenças significativas entre o perfil de contaminação antropogénica da Barrinha de Esmoriz e da Pateira de Fermentelos. Estes dados indiciam que os cenários de contaminação nestes dois locais possam ser muito distintos, nomeadamente no que respeita à contaminação por compostos metálicos, que são os compostos mais directamente relacionáveis com os efeitos observados, nomeadamente com a inibição da actividade deste biomarcador.

6.2. Biomarcadores histopatológicos

6.2.1. Brânquias

A análise histopatológica de tecidos nas espécies utilizadas permite avaliar a extensão do impacto da contaminação oriunda do local de colheita, ao nível tecidular. Deste modo a análise das brânquias dos peixes é de facto essencial pois esta é a primeira barreira e simultaneamente o primeiro órgão que está em contacto directo com os contaminantes e claramente é o local onde são exercidas as primeiras acções dos tóxicos. As alterações verificadas nas brânquias são consideradas como indicativas de respostas a agentes que provocam o stress químico e físico (Au, 2004). Deste modo, muitos agentes químicos, físicos e biológicos podem causar várias lesões histológicas no tecido branquial e através da análise qualitativa e quantitativa foi possível verificar

uma série de lesões leves e moderadas (Bernet *et al.*, 1999) em *G. holbrooki* e *A. anguilla*, tendo em conta o grau de severidade e extensão. As lesões observadas em *G. holbrooki* e *A. anguilla*, nos locais em análise, vão desde aneurismas, levantamento epitelial, hiperplasia do epitélio filamentar com fusão lamelar, fusão de lamelas secundárias e vasodilatação.

Desta feita, todos os indivíduos analisados em ambas as espécies na Barrinha de Esmoriz demonstraram alterações histopatológicas nas brânquias, tal como na Pateira de Fermentelos, apesar de as lesões não apresentarem uma gravidade e severidade tão notória, comparativamente com os indivíduos analisados na Barrinha de Esmoriz. Não obstante, os indivíduos analisados no Rio Minho, na sua maioria, não apresentaram qualquer alteração histológica.

Alterações histopatológicas de brânquias, como hiperplasia epitelial com fusão lamelar, hipertrofia epitelial, edema e descamação epitelial são típicas em resposta a uma vasta gama de contaminantes, incluindo organoclorados, derivados de petróleo, organofosforados, carbamatos, herbicidas e metais pesados (Au, 2004). Em termos fisiológicos, lesões como o levantamento epitelial, hiperplasia epitelial, edema e hipertrofia epitelial, são na verdade respostas adaptativas dos mecanismos de defesa, onde a diminuição da área de contacto das brânquias com a água, cria uma barreira para a entrada de xenobióticos, prejudicando assim a respiração. A função respiratória fica comprometida, uma vez que com o aumento da distância entre a água e a corrente sanguínea, como consequência do levantamento epitelial nas brânquias, o peixe tem maior dificuldade nas trocas gasosas (Pandy *et al.*, 2008). Lesões como os aneurismas ocorrem devido a um rompimento das células pilar, consequência do aumento do fluxo sanguíneo, ou até mesmo devido à acção preferencial dos contaminantes nestas células. Os aneurismas são considerados como lesões de maior gravidade, quando em comparação com alterações ao nível do epitélio, mas que apesar de tudo podem ser

reversíveis (Simonato *et al.*, 2008). No caso da Barrinha de Esmoriz, os aneurismas surgiram de forma sistemática, com grandes dimensões e em grande número, disseminados por todo o arco branquial nas enguias; o mesmo não foi observado nas gambusias analisadas. Esta tipologia de lesão ocorreu de forma pontual nos animais provenientes da Pateira de Fermentelos I, sem a dimensão e extensão tão elevadas, o que poderá indicar que os elementos contaminantes presentes na Pateira de Fermentelos são menos deletérios, ou manifestam-se nos indivíduos analisados de forma menos agressiva.

Das lesões encontradas nas duas espécies em análise, as que apresentaram maior impacto (sendo consideradas as mais danosas) foram a hiperplasia do epitélio filamentar com fusão lamelar e os aneurismas. A maioria das lesões histopatológicas não são específicas da exposição a um determinado xenobiótico, por isso não se pode dizer efectivamente que as lesões encontradas nas brânquias podem ser devidas à exposição a metais, como se suspeita que seja em função dos dados obtidos nos biomarcadores enzimáticos. Mesmo assim, existem estudos que referem que após a exposição de peixes a compostos metálicos, se observa uma produção excessiva de muco nas brânquias. Isto ocorre devido ao stress causado pela variação de condições no meio, induzindo deste modo a proliferação de células mucosas que por sua vez, causa o aumento das secreções (Hansen *et al.*, 2007; Pandey *et al.*, 2008).

Os compostos metálicos são considerados um dos elementos mais nocivos que existem no meio ambiente e que afectam de forma particular as brânquias, nomeadamente a sua morfologia e estrutura. Estes elementos têm a capacidade de interferir com a respiração e osmorregulação nos indivíduos aquáticos expostos, causando desta forma danos celulares nas células branquiais. Infelizmente, existem poucos estudos dirigidos à exposição das brânquias de peixes baseada na avaliação dos efeitos a exposições a mais que um elemento metálico, e com períodos de exposição curtos. A exposição crónica de

peixes a água contaminada com metais pesados induz uma vasta gama de alterações fisiológicas e comportamentais, que vão desde perda de apetite, redução no crescimento, perda de iões e mortalidade nos peixes. Elementos metálicos com o zinco e o cobre têm a faculdade de atingir as capacidades antioxidantes das brânquias de peixes (Hansen *et al.*, 2007).

Apesar de não ter sido referido anteriormente, as enguias analisadas na Barrinha de Esmoriz apresentavam brânquias com excesso de células mucosas, comparativamente com os indivíduos analisados no Rio Minho. Sendo assim, as alterações histopatológicas observadas em *A. anguilla* e *G. holbrooki* são idênticas às encontradas em peixes expostos a metais, como os encontrados na Barrinha de Esmoriz (Ribeiro *et al.*, 2005; Fernandes *et al.*, 2007; Yildiz *et al.*, 2010). As brânquias são um tecido metabolicamente activo, acumulando deste modo grandes quantidades de metais pesados, como demonstrado por vários autores (Karadede e Unlu, 2000; Yilmaz, 2009). Num estudo de monitorização realizado na Barrinha de Esmoriz, em *Liza saliens*, foram observadas lesões histopatológicas semelhantes às detectadas no presente estudo, e que foram também comparadas com as observadas em peixes expostos a Cu e Zn (Fernandes *et al.*, 2007).

A análise semi-quantitativa das brânquias revelou a existência de diferenças significativas entre os locais Barrinha de Esmoriz e Pateira de Fermentelos, em ambas as espécies em estudo. Quanto aos índices patológicos das brânquias, verifica-se que estes são mais elevados para ambas as espécies, na Barrinha de Esmoriz; em seguida, o local com maior incidência de alterações foi para animais da Pateira de Fermentelos, e com os índices patológicos branquiais menores surge o Rio Minho. Mais uma vez estes dados vêm reforçar as conclusões obtidas para os biomarcadores enzimáticos, que indicam que a contaminação, ou a severidade dos seus efeitos nestes dois locais, são

diferentes, embora se desconheça, efectivamente, o agente causal devido a inespecificidade das lesões.

6.2.2. Fígado

O fígado é o principal órgão envolvido na destoxificação de xenobióticos e excreção de elementos nocivos. Desta feita, o fígado dos peixes é bastante sensível aos contaminantes ambientais, devido à tendência de muitos contaminantes em se acumularem neste órgão, fazendo com que este esteja exposto a grandes quantidades de contaminantes, em comparação com o meio ambiente envolvente e outros órgãos (Au, 2004). Mais uma vez, as lesões histopatológicas do fígado não são específicas de determinados contaminantes, sendo portanto mais difícil estabelecer uma relação de causa-efeito (Ribeiro *et al.*, 2005). Mas existem estudos que confirmam que o fígado bioacumula grandes quantidades de metais pesados (como o Cu, Cd e Zn) em peixes (*A. anguilla*), em comparação com outros tecidos (Yilmaz, 2009).

As alterações histopatológicas hepáticas que foram detectadas em ambas as espécies analisadas neste estudo variaram desde edemas, alargamento dos capilares sinusóides, vacuolização dos hepatócitos e núcleos picnóticos. A lesão mais grave é a vacuolização pronunciada dos hepatócitos e a presença de núcleos picnóticos, encontrados fundamentalmente nos indivíduos analisados na Barrinha de Esmoriz. À semelhança com o que ocorreu na análise do tecido branquial, as lesões detectadas no tecido hepático nos indivíduos capturados na Barrinha de Esmoriz, eram mais graves e extensas em comparação com as observadas em animais do local de referência e da Pateira de Fermentelos. Isto poderá ser devido à maior concentração de elementos químicos com maior propensão de causar danos no fígado.

Patologias como a vacuolização dos hepatócitos pode estar relacionada com a exposição dos indivíduos a água contaminada, indicativa de danos metabólicos e podendo ser considerada como uma doença degenerativa. Os vacúolos que existem no citoplasma dos hepatócitos são compostos no seu interior por lípidos e glicogénio, essenciais para o fornecimento de energia, sendo uma das funções metabólicas consideradas normais no fígado (Camargo e Martinez, 2007). A depleção de glicogénio nos hepatócitos pode estar associada a indivíduos submetidos a situações de stress, uma vez que o glicogénio funciona como reserva energética da glucose, que suporta a necessidade adicional de grandes quantidades de energia, exigidas em situações destas. O prolongamento de situações de deficiência de glicogénio nos hepatócitos pode tornar os indivíduos mais susceptíveis a doenças. Este fenómeno, da diminuição das reservas de glicogénio, pode ainda ser mais evidente no Verão, uma vez que a actividade metabólica é maior em função das temperaturas mais elevadas (Camargo e Martinez, 2007). A maior parte das patologias encontradas ao nível do fígado verificaram-se sobretudo nos hepatócitos por estes serem o alvo preferencial dos elementos químicos. Outros estudos revelam a acumulação de lípidos nos hepatócitos em peixes expostos a elementos metálicos como Cu, Cd e Zn (Arellano *et al.*, 1999; Van Dyk *et al.*, 2007).

Outra das lesões encontradas neste estudo foram a presença de núcleos picnóticos, que corresponde a uma alteração degenerativa, sendo perceptível porque compreende uma diminuição do volume da célula e esta fica com uma coloração diferente. A picnose caracteriza-se como um processo que conduz à necrose de um tecido, devido à fragmentação do próprio núcleo (Jiraungkoorskulet *al.*, 2003). Foram também observadas alterações ao nível dos sinusóides, cuja obstrução implica um impedimento acrescido do fluxo sanguíneo (Saleki *et al.*, 2007).

Nos indivíduos analisados no Rio Minho foram encontrados melanomacrófagos, relativamente à presença de melanomacrófagos em fígados de peixes capturados em

locais de referência, vários estudos demonstraram que é normal a presença de forma ocasional destas lesões (Stentiford *et al.*, 2003). Desta feita, a presença de melanomacrófagos no Rio Minho pode não ser de natureza toxicopática. Para além disso, como os centros de melanomacrófagos estão envolvidos em vários processos metabólicos para além do armazenamento de compostos considerados estranhos, não se pode afirmar que a prevalência deste tipo de lesão, em peixes expostos a contaminação química, pode estar relacionada com a poluição (Stentiford *et al.*, 2003).

A análise qualitativa e semi-qualitativa de tecido hepático, revelou lesões descritas por vários autores (Stentiford *et al.*, 2003; Fernandes *et al.*, 2008b; Costa *et al.*, 2009), onde a relevância das lesões, ou seja, como esta afecta a funcionalidade do órgão, situa-se em patologias com importância mínima e moderada (Bernet *et al.*, 1999). De acordo com um estudo realizado na Barrinha de Esmoriz com avaliação histopatológica de fígado em indivíduos de *Liza saliens*, estes revelaram muitas das lesões aqui descritas e para além dessas, apresentaram focos de necrose, granulomas e extensas zonas de parênquima heterogéneo, o que levou a concluir que estes indivíduos estavam expostos a elementos metálicos (Fernandes *et al.*, 2008b). Não obstante, na análise semi-quantitativa do fígado em *G. holbrooki* e *A. anguilla*, revela a mesma tendência apurada na análise semi-quantitativa nas brânquias, tendo portanto a Barrinha de Esmoriz os índices patológicos hepáticos mais elevados, em ambas as espécies, e em seguida, a Pateira de Fermentelos e com os índices patológicos hepáticos menores surge o Rio Minho.

VII: Conclusões

Torna-se evidente que na avaliação do risco ambiental não é suficiente e não pode ser baseada apenas numa análise química, pois esta não fornece a informação necessária sobre os efeitos tóxicos dos xenobióticos sobre a biota aquática. Por conseguinte, a utilização de uma série de biomarcadores bioquímicos e histológicos como ferramentas complementares é fundamental na biomonitorização ambiental para uma melhor interpretação na avaliação dos impactos causados pela acção humana (de origem agrícola, de origem industrial e de origem doméstica), (Ricciardi *et al.*, 2010). A selecção desta bateria de biomarcadores enzimáticos e histopatológicos nas espécies de organismos teste seleccionadas permitiu demonstrar que são ferramentas fiáveis e sensíveis, uma vez que responderam à contaminação química e os biomarcadores escolhidos foram capazes de demonstrar as variações de origem natural e as variações causadas por perturbações de origem antropogénica em *G. holbrooki* e *A. anguilla*. Deste modo os objectivos propostos inicialmente foram atingidos.

Em suma, o presente estudo revela que existem fortes evidências da existência de contaminação na Barrinha de Esmoriz, observável de forma notória pela inibição da actividade da enzima AChE, no cérebro e olhos, em ambas as espécies analisadas. Fica assim demonstrado que os indivíduos desta laguna estuarina revelam perturbações no sistema de neurotransmissão, que pode afectar de forma grave a sua qualidade de vida e comprometer a sua sobrevivência. Aparentemente, esta inibição da actividade da AChE pode ter sido causada pela exposição dos indivíduos analisados a agentes metálicos, uma vez que está estabelecida uma relação de causalidade entre exposição ambiental a metais (que foram determinados na Barrinha de Esmoriz), e o efeito observado na actividade desta enzima (Diamantino *et al.*, 2003; Frasco, *et al.*, 2005). Relativamente à actividade da AChE na Pateira de Fermentelos, não foram verificadas perturbações significativas que levam à inibição desta enzima em ambas as espécies analisadas, o que

pode indiciar a ausência de agentes anticolinesterásicos de utilização agrícola (como carbamatos e organofosforados) e de determinadas espécies metálicas. No que respeita à actividade das enzimas com efeitos antioxidantes como a CAT e as GSTs, pode-se concluir que os indivíduos de enguia europeia capturados na Barrinha de Esmoriz apresentaram sinais de stress oxidativo, a nível branquial e hepático, eventualmente resultantes da exposição de *A. anguilla* a espécies metálicas. Tal padrão não foi no entanto observado para indivíduos de *G. holbrooki*, evidenciado que a fisiologia desta espécie é de certo modo mais refractária ao exercício de stress oxidativo por via da exposição a contaminantes ambientais. O mesmo cenário não foi observado para as duas espécies em análise na Pateira de Fermentelos, o que realça o menor impacto biológico dos contaminantes antropogénicos que aqui possam existir.

É certo que a utilização destas enzimas (CAT e GSTs) em programas de biomonitorização ambiental é muito aplicada, mas a interpretação dos resultados obtidos é por vezes difícil de empreender (van der Oost *et al.*, 2003). Um exemplo da dificuldade na avaliação de dados de animais capturados em condições reais reside na análise dos indivíduos de enguia provenientes da Barrinha de Esmoriz, que apresentaram inibição significativa das enzimas GSTs. Tal facto poderá ser indicativo da existência de contaminação por metais, visto que existem estudos que atestam a capacidade dos compostos metálicos em alterar a actividade desta enzima através da ligação aos grupos funcionais da mesma, provocando uma inibição da sua actividade (Oliveira *et al.*, 2004; Atli *et al.*, 2006). No entanto, não é de descartar a ocorrência de um cenário de stress oxidativo, pois o efeito de alguns conhecidos agentes pró-oxidantes passa pela inibição destas isoenzimas. Apesar da dificuldade de se estabelecer a ocorrência, num cenário real, de exposição a compostos oxidantes, é possível inferir diferenças significativas entre locais. Em organismos provenientes da Pateira de Fermentelos não se verificaram grandes alterações na actividade destas enzimas antioxidantes, comparativamente com o local de referência, nas duas espécies em análise. Aparentemente, não são visíveis sinais de stress oxidativo, evidenciando mais

uma vez que os indivíduos analisados na Barrinha de Esmoriz apresentam níveis de perturbações fisiológicas mais elevadas em relação à Pateira de Fermentelos.

Quanto aos dados obtidos na determinação da actividade da LDH, estes revelaram mais uma vez as mesmas evidências que nos biomarcadores enzimáticos anteriores para os indivíduos analisados na Barrinha de Esmoriz. Assim, em indivíduos de ambas as espécies em estudo observaram-se alterações associadas às vias de obtenção de energia, que resultam numa capacidade reduzida de conseguir produzir energia de forma rápida. Organismos que estão sob stress químico, possivelmente devido à exposição a elementos metálicos, tendem a evidenciar a capacidade de se adaptarem a este cenário, desenvolvendo estratégias de compensação (de aumentar a alocação de energia do crescimento para os processos de destoxificação e para os comportamentos repentinos necessários) que lhes permitam sobreviver (Levesque *et al.*, 2002). Este cenário, muito evidente para os organismos capturados na Barrinha de Esmoriz, foi igualmente evidente para os indivíduos de *G. holbrooki* analisados na Pateira de Fermentelos, tendo sempre como base de comparação o Rio Minho, como sendo o nosso local de referência.

Atendendo aos resultados referentes aos biomarcadores histopatológicos, estes vêm a reforçar o que está patente nos biomarcadores enzimáticos. A utilização de índices semi-quantitativos na avaliação histopatológica foi uma ferramenta essencial, pois permitiu relacionar as alterações histológicas de acordo com um factor de importância da lesão e a sua extensão e desta forma ser mais fácil realçar o que não é possível apenas com uma avaliação qualitativa (Bernet *et al.*, 1999). Desta força a histopatologia foi uma ferramenta que teve a capacidade de evidenciar, nas duas espécies amostradas, as diferentes tipologias de contaminação dos locais analisados, em brânquias e fígado. Onde as alterações verificadas nas brânquias e fígado situam-se em patologias com importância mínima e moderada, podendo ser reversíveis. Na análise dos índices

patológicos, denota-se de forma visível, uma tendência nos índices de condição das brânquias e do fígado, onde observa-se uma gradação da incidência de patologias nos órgãos-alvo analisados. Verifica-se portanto que na Barrinha de Esmoriz, nas duas espécies em estudo, apresentam maior cotação nos índices, o que revela uma maior gravidade e extensão das lesões, nas brânquias e no fígado, em comparação com a Pateira de Fermentelos e com o Rio Minho, em *G. holbrooki* e *A. anguilla*. Quanto aos indivíduos analisados do Rio Minho estes revelaram poucas lesões histológicas, que normalmente surgem em locais de referência, não estando relacionadas com a exposição destes a contaminantes.

As alterações histológicas observadas nas brânquias e fígado em *G. holbrooki* e *A. anguilla* no presente estudo indicam que os peixes respondem aos efeitos directos derivados da exposição a contaminantes (através das brânquias que estão em contacto directo com o meio), tanto quanto aos efeitos secundários causados pelo stress (através do fígado que diminui os efeitos nefastos dos xenobióticos, comprometendo o seu funcionamento). Em termos comparativos, entre as brânquias e os fígados em ambas as espécies analisadas neste estudo, verificou-se uma maior prevalência de lesões e do número de diferentes lesões detectadas nas brânquias e no fígado encontra-se lesões com uma extensibilidade grande, em que na maioria das amostras nos indivíduos da Barrinha de Esmoriz este apresenta uma estrutura muito fragilizada. De acordo com estudos actuais, estes sugerem que as brânquias são um órgão mais susceptível a perturbações causadas pelo efeito da exposição a xenobióticos em situações agudas, enquanto por outro lado o fígado revela maiores fragilidades aquando de exposições a xenobióticos em situações crónicas, acumulando-os e muitas das vezes, os seus metabolitos são ainda mais tóxicos que o composto inicial (Costa *et al.*, 2009). De qualquer forma as lesões são inespecíficas, e não permitem inferir acerca do agente causal.

Assim sendo, os dados aqui obtidos revelam que a contaminação da Barrinha de Esmoriz é claramente mais pronunciada do que a observada na Pateira de Fermentelos. O maior poder de diluição de contaminantes da Pateira de Fermentelos pode ser um factor que condiciona a menor toxicidade observada em organismos lá capturados; pelo contrário, as perturbações hidrodinâmicas causadas pela acção do Homem na Barrinha de Esmoriz, em resultado de pressões constantes da industrialização, das urbanizações e de práticas agrícolas difusas nas imediações, causam a estagnação das águas, com incremento do défice de oxigénio dissolvido, maior concentração de espécies xenobiontes, e perturbações nas populações piscícolas, traduzidas pelos dados agora compilados.

Os dados referentes aos biomarcadores enzimáticos e histopatológicos, aqui analisados, revelam claramente cenários de contaminação pronunciada, que de facto se reflectem em alterações nos processos fisiológicos e em lesões visíveis nos órgãos-alvo analisados. No futuro, considera-se fundamental que existam mais estudos com esta tipologia, que permitam de alguma forma avaliar com rigor a evolução e a respostas dos organismos aquáticos à contaminação. Assim, é de esperar que os dados recolhidos sirvam para caracterizar a situação de fragilidade ecológica em que se encontra a Barrinha de Esmoriz.

VIII: Referências bibliográficas

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

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

Alcaraz, C. e García-Berthou, E. (2007). Life history variation of invasive mosquitofish (*Gambusia holbrooki*) along a salinity gradient. *Biological Conservation*, Vol. 139, pp. 83-92.

Almeida, A. S. R. L. (2006). Avaliação da qualidade da água na Pateira de Fermentelos – caso de estudo na Área de Projecto. Universidade de Aveiro, Dissertação de Mestrado, Departamento de Biologia.

Alves, F. L. (2008). A Enguia (*Anguilla anguilla* L. 1758). [Em linha]. Disponível em <http://www.seta.org.pt/ficha_rios_19B.pdf> [Consultado em 10\01\2012].

Antelo, J. M., Arce, F., López, R. e Parajó, M. (1996). *Características físico-químicas de las águas de la cuenca del Rio Miño*. I Simposium Ibérico sobre a Bacia Hidrográfica do Rio Minho. Actas, pp. 137-158.

Arellano, J. M., Storch, V. e Sarasquete, C. (1999). Histological changes and copper accumulation in liver and gills of the senegales sole, *Solea senegalensis*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, Vol. 44, pp. 62-72.

Atli, G., Alptekin, Ö., Tükel, S. e Canli, M. (2006). Response of catalase activity to Ag^+ , Cd^{2+} , Cr^{6+} , Cu^{2+} and Zn^{2+} in five tissues of freshwater fish *Oreochromis niloticus*. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C*, Vol. 143, pp. 218-224.

Au, D. W. T. (2004). The application of histo-cytopathological biomarkers in marine pollution monitoring: a review. *Marine Pollution Bulletin*, Vol. 48, pp. 817-834.

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

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

Bodin, N., Burgeot, T., Stanisière, J. Y., Bocquené, G., Menard, D., Minier, C., Boutet, I., Amat, A., Cherel, Y. e Budzinski, H. (2004). Seasonal variations of a battery of biomarkers and physiological indices for the mussel *Mytilus galloprovincialis* transplanted into the northwest Mediterranean Sea. *Comparative Biochemistry and Physiology*, Part C, Vol. 138, pp. 411-427.

Burger, J., Fossi, C., McClellan-Green, P. e Orlando, E. F. (2007). Methodologies, bioindicators, and biomarkers for assessing gender-related differences in wildlife exposed to environmental chemicals. *Environmental Research*, Vol. 104, pp. 135-152.

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

Cabral, J. A., Marques, J. C. (1999). Life history, populations Dynamics and production of eastern mosquitofish, *Gambusia holbrooki* (Pisces, Poeciliidae), in rice fields of the lower Mondego River Valley, western Portugal. *Acta Oecologica*, Vol. 20, pp. 607-620.

Cailleaud, K., Maillet, G., Budzinski, H., Souissi, S. e Forget-Leray, J. (2007). Effects of salinity and temperature on the expression of enzymatic biomarkers in *Eurytemora affinis* (Calanoida, Copepoda). *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A*, Vol. 147, pp. 841-849.

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

Carola, J., Fontainhas-Fernandes, A., Matos, P. e Rocha, E. (2009). Liver histopathology in brown trout (*Salmo trutta f. fario*) from the Tinhela river, subjected to mine drainage from the abandoned Jales mine (Portugal). *Bulletin Environmental Contamination Toxicology*, Vol. 83, pp. 35-41.

Cengiz, E. I. e Ünlü, E. (2003). Histopathology of gills in mosquitofish, *Gambusia affinis* after long-term exposure to sublethal concentrations of Malathion. *Journal of Environmental Science and Health, Part B-Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes*, Vol. 5, pp. 81-589.

Cengiz, E. I. e Unlu, E. (2006). Sublethal effects of commercial deltamethrin on the structure of the gill, liver and gut tissues of mosquitofish, *Gambusia affinis*: a microscopic study. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, Vol. 21, pp. 246-253.

Chapman, P. M. (2002). Integrating toxicology and ecology: putting the “eco” into ecotoxicology. *Marine Pollution Bulletin*, Vol. 44, pp. 7-15.

Chebby, S. G. e David, M. (2009). Neurobehavioral responses of the freshwater teleost, *Cyprinus carpio* (Linnaeus) under quinalphos intoxication. *Biotechnology in Animal Husbandry*, Vol. 25, pp. 241-249.

Cinar, K., Aksoy, A., Emre, Y. e Asti, R. N. (2009). The histology and histochemical aspects of gills of the flower fish, *Pseudophoxinus antalyae*. *Veterinary Research Communications*, Vol. 33, pp. 453-460.

Costa, P. M., Caeiro, S., Lobo, J., Martins, M., Ferreira, A. M., Caetano, M., Vale, C., DelValls, T. Á. E Costa, M. H. (2011). Estuarine ecological risk based on hepatic histopathological indices from laboratory and *in situ* tested fish. *Marine Pollution Bulletin*, Vol. 62, pp. 55-65.

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

Decreto-Lei nº 236/98, de 1 de Agosto, que estabelece normas, critérios e objectivos de qualidade com a finalidade de proteger o meio aquático e melhorar a qualidade das águas em função dos seus principais usos.

Decreto-Lei nº 77/2006, de 30 de Março, que estabelece um quadro de acção comunitária no domínio da política da água.

Decreto-Lei nº 103/2010, de 24 de Setembro, que estabelece as normas de qualidade ambiental no domínio da política da água.

Diamantino, T. C., Almeida, E., Soares, A. M. V. M. e Guilhermino, L. (2001). Lactate dehydrogenase activity as an effect criterion in toxicity tests with *Daphnia magna* straus. *Chemosphere*, Vol. 45, pp. 553-560.

Diamantino, T. C., Almeida, E., Soares, A. M. V. M. e Guilhermino, L. (2003). Characterization of cholinesterases from *Daphnia magna* Straus and their inhibition by zinc. *Bulletin of Environmental Contamination Toxicology*, Vol. 45, pp. 219-225.

Direcção Regional de Agricultura e Pescas do Centro (2008). Plano de gestão da enguia 2009-2012. Resposta do Estado Português ao Regulamento (CE) nº 1100/2007, de 18 de Setembro.

Directiva Quadro da Água, Directiva nº 2000/60/CE, que estabelece um quadro de acção comunitária para a protecção das águas de superfície interiores, das águas de transição, das águas costeiras e das águas subterrâneas.

Douhri, H. e Sayah, F. (2009). The use of enzymatic biomarkers in two marine invertebrates *Nereis diversicolor* and *Patella vulgata* for the biomonitoring of Tangier's bay (Morocco). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, Vol. 72, pp. 394-399.

Durou, C., Smith, B. D., Roméo, M., Rainbow, P. S., Mouneyrac, C., Mouloud, M., Gnassia-Barelli, M., Gillet, P., Deutch, B. e Amiard-Triquet, C. (2007). From biomarkers to population responses in *Nereis diversicolor*: assessment of stress in estuarine ecosystems. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, Vol. 66, pp. 402-411.

Eason, C. e O'Halloran, K. (2002). Biomarkers in toxicology versus ecological risk assessment. *Toxicology*, Vol. 181-182, pp. 517-521.

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

Fernandes, C. (2007). Contaminação da Barrinha de Esmoriz/Lagoa de Paramos por metais pesados: Efeitos bioquímicos e histológicos em *Liza saliens*. Vila Real, Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro.

Fernandes, C., Fontainhas-Fernandes, A., Monteiro, S. M. e Salgado, M. A. (2007). Histopathological gill changes in wild leaping grey mullet (*Liza saliens*) from the Esmoriz-Paramos coastal lagoon, Portugal. *Wiley InterScience*, Vol. 22, pp.443-448.

Fernandes, C., Fontainhas-Fernandes, A., Ferreira, M. e Salgado, M. A. (2008a). Oxidative stress response in gill and liver of *Liza saliens*, from the Esmoriz-Paramos coastal lagoon, Portugal. *Arch Environ Contam Toxicol*, Vol. 55, pp. 262-269.

Fernandes, C., Fontainhas-Fernandes, A., Rocha, E. e Salgado, M. A. (2008b). Monitoring pollution in Esmoriz-Paramos lagoon, Portugal: Liver histological and biochemical effects in *Liza saliens*. *Environ Monit Assess*, Vol. 145, pp. 315-322.

Filser, J. (2008). Ecotoxicology and ecosystems: relevance, restrictions, research needs. *Basic and Applied Ecology*, Vol. 9, pp. 333-336.

Forget, J., Beliaeff, B. e Bocquené, G. (2003). Acetylcholinesterase activity in copepods (*Tigriopus brevicornis*) from the Vilaine River estuary, France, as a biomarker of neurotoxic contaminants. *Aquatic Toxicology*, Vol, 62, pp. 195-204.

Frasco, M. F., Fournier, D., Carvalho, F. e Guilhermino, L. (2005). Do metals inhibit acetylcholinesterase (AChE)? Implementation of assay conditions for the use of AChE activity as a biomarker of metal toxicity. *Biomarkers*, Vol. 10, pp. 360-375.

Genten, F., Terwinghe, E. e Danguy, A. (2009). *Atlas of fish histology*. United States of America, Science Publishers.

Gestel, C.A.M. e Brummelen, T.C. (1996). Incorporation of the biomarker concept in ecotoxicology calls for a redefinition of terms. *Ecotoxicology*, Vol. 5, pp. 217-225.

Gill, T. S., Tewari, H. e Pande, J. (1991). In vivo in vitro effects of cadmium on selected enzymes in different organs of the fish *Barbus conchoni* ham. (Rosy Barb). *Comparative Biochemistry Physiology*, Vol. 100, pp. 501-505.

Gill, T. S., Tewari, H. e Pande, J. (1992). Short- and long- term effects of copper on the rosy barb (*Puntius conchoni* Ham). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, Vol. 23, pp. 294-306.

Gorbi, S., Baldini, C. e Regoli, F. (2005). Seasonal variability of metallothioneins, cytochrome P450, bile metabolites and oxyradical metabolism in the European eel *Anguilla anguilla* L. (Anguillidae) and striped mullet *Mugil cephalus* L. (Mugilidae). *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, Vol. 49, pp. 62-70.

Guilhermino, L., Barros, P., Silva, M. C. e Soares, A. M. V. M. (1998). Should the use of inhibition of cholinesterases as a specific biomarker for organophosphates and carbamate pesticides be questioned? *Biomarkers*, Vol. 3, pp. 157-163.

Guilhermino, L., Lopes, M. C., Carvalho, A. P., Soares, A. M. V. M. (1996). Inhibition of acetylcholinesterase activity as effect criterion in acute testes with juvenile *Daphnia magna*. *Chemosphere*, Vol. 32, pp. 727-738.

Gravato, C., Guimaraes, L., Santos, J., Faria, M., Alves, A. e Guilhermino, L. (2010). Comparative study about the effects of pollution on glass and yellow eels (*Anguilla anguilla*) from the estuarines of Minho, Lima and Douro Rivers (NW Portugal). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, Vol. 73, pp. 524-533.

Gravato, C., Faria, M., Alves, A., Santos, J., Guilhermino, L. (2008). Biomonitoring studies performed with European eel populations from the estuaries of Minho, Lima and Douro Rivers (NW Portugal). *Advanced Environmental Monitoring*, pp. 390-401.

Guimarães, L., Gravato, C., Santos, J., Monteiro, L.S., Guilhermino, L. (2009). Yellow eel (*Anguilla anguilla*) development in NW Portuguese estuaries with different contamination levels. *Ecotoxicology*, Vol. 18, pp. 385-402.

Habig, W. H., Pabst, M. J. e Jakoby W. B. (1974). Glutathione S transferases. *Journal of Biological Chemistry*, Vol. 249, pp. 7130-7137.

Handy, R. D., Runnalls, T. e Russell, P. M. (2002). Histopathologic biomarkers in three spined sticklebacks *Gasterosteus aculeatus*, from several rivers in Southern England that meet the Freshwater Fisheries Directive. *Ecotoxicology*, Vol. 11, pp. 467-479.

Hansen, B. H., Garmo, O. A., Olsvik, P.A. e Andersen, R. A. (2007). Gill metal binding and stress gene transcription in brown trout (*Salmo trutta*) exposed to metal environments: the effect of pre-exposure in natural populations. *Environmental Toxicology and Chemistry*, Vol. 26, pp: 944-953.

Henson, K. L., Stauffer, G. e Gallagher, E. P. (2001). Induction of glutathione S-transferase activity and protein expression in brown bulhead (*Ameiurus nebulosus*) liver by ethoxyquin. *Toxicological Sciences*, Vol. 62, pp. 54-60.

Hyne, R. V. e Maher, W. A. (2003). Invertebrate biomarkers: links to toxicosis that predict population decline. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, Vol. 54, pp. 366-374.

Jakšić, Ž., Hamer, B., Landeka, N. e Batel, R. (2008). Western mosquitofish as a bioindicator of exposure to organochlorine compounds. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, Vol. 71, pp. 426-435.

Jiraungkoorskul W., Upatham E.S., Kruatrachue M., Sahaphong S., Vichasri-Grams S., Pokethitiyook P. (2003). Biochemical and histopathological effects of glyphosate herbicide on Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Environmental Toxicology*, Vol. 19, pp. 260 - 267.

Karadede, H. e Unlu, E. (2000). Concentrations of some heavy metals in water, sediment and fish species from the Ataturk Dam Lake (Turkey). *Chemosphere*, Vol. 41, pp. 1371-1376.

Koca, Y. B., koca, S., Yıldız, S., Gürcü, B., Osañç, O.T. e Aksoy, G. (2005). Investigation of histopathological and cytogenetic effects on *Lepomis gibbosus* (pisces: perciformes) in the Çine Stream (Aydın/Turkey) with determination of water pollution. *Environ Toxicology*, Vol. 6, pp. 560-571.

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

Köhne, J.M., Köhne, S. e Simunek, J. (2009): A Review of Model Applications for Structured Soils: b) Pesticide Transport. *Journal of Contaminant Hydrology*, Vol. 104, pp. 36-60.

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

Langston, W. J., Chesman, B. S., Burt, G. R., Pope, N. D. e McEvoy, J. (2002). Metallothionein in liver of eels *Anguilla Anguilla* from the Thames Estuary: an indicator of environmental quality?. *Marine Environmental Research*, Vol. 53, pp. 263-293.

Lei da Água, Lei nº 58/2005, de 29 de Dezembro, que estabelece as bases e o quadro institucional para a gestão sustentável das águas.

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

Levesque, H. M., Moon, T. W., Campbell, P. G. C. e Hontela, A. (2002). Seasonal variation in carbohydrate and lipid metabolism of yellow perch (*Perca flavescens*) chronically exposed to metals in the field. *Aquatic Toxicology*, Vol. 60, pp. 257-267.

Livingstone, D. R. (2001). Contaminant-stimulated reactive oxygen species production and oxidative damage in aquatic organism. *Marine Pollution Bulletin*, Vol. 42, pp. 656-666.

Livingstone, D.R. (1998). The fate of organic xenobiotics in aquatic ecosystems: quantitative and qualitative differences in biotransformation by invertebrates and fish. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A*, Vol. 120, pp. 43-49.

Li, L., Zheng, B. e Liu, L. (2010). Biomonitoring and bioindicators used for river ecosystems: definitions, approaches and trends. *Procedia Environmental Sciences*, Vol. 2, pp. 1510-1524.

Li, Z-H, Zlabek, V., Velisek, J., Grabic, R. Machova, J., Kolarova, J., Li, P. e Randak, T. (2011). Acute toxicity of carbamazepine to juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): Effects on antioxidant responses, hematological parameters and hepatic EROD. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, Vol. 74, pp. 319-327.

Lins, J. A. P. N., Kirschnik, P. G., Queiroz, V. S. e Cirio, S. M. (2010). Use of fish as biomarkers for monitoring aquatic environment. *Rev. Acad., Ciênc. Agrár. Ambient., Curitiva*, Vol. 8, pp. 469-484.

Lushchak, V. I. (2011). Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals. *Aquatic Toxicology*, Vol. 101, pp. 13-30.

Marohn, L., Rehbein, H., Kündiger, R. e Hanel, R. (2008). The suitability of cytochrome-P4501A1 as a biomarker for PCB contamination in European eel (*Anguilla anguilla*). *Journal of Biotechnology*, Vol. 136, pp. 135-139.

- Matos, P., Fontainhas-Fernandes, A., Peixoto, F., Carrola, J. e Rocha, E. (2007). Biochemical and histological hepatic changes of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* exposed to carbaryl. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, Vol. 89, pp. 73-80.
- Mazón, L. I., González, G., Vicario, A., Estomba, A. e Aguirre, A. (1998). Inhibition of esterases in the marine gastropod *Littorina littorea* exposed to cadmium. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, Vol. 41, pp. 284-287.
- McCleave, J. D. e Arnold, G. P. (1999). Movements of yellow and silver phase European eels (*Anguilla anguilla* L.) tracked in the western North Sea. *ICES Journal of Marine Science*, Vol. 56, pp. 510-536.
- Monserrat, J. M., Martínez, P. E., Geracitano, L. A., Armado, L. L., Martins, C. M. G., Pinho, G. L. L., Chaves, I. S., Ferreira-Cravo, M., Ventura-Lima, J. e Bianchini, A. (2007). Pollution biomarkers in estuarine animals: critical review and new perspectives. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C*, Vol. 146, pp. 221-234.
- Monteiro, M., Quintaneiro, C., Morgado, F., Soares, A. M. V. M. e Guilhermino, L. (2005). Characterization of the cholinesterases present in head tissues of the estuarine fish *Pomatoschistus microps*: application to biomonitoring. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, Vol. 62, pp. 341-347.
- Monteiro, M., Quintaneiro, C., Nogueira, A.J., Morgado, F., Soares, A.M.V.M., Guilhermino, L. (2007). Impact of chemical exposure on the fish *Pomatoschistus microps* Kroyer (1838) in estuaries of the Portuguese Northwest coast. *Chemosphere*, Vol. 66, pp. 514-522.

Moreira, S.M., Moreira-Santos, M., Guilhermino, L., Ribeiro, R. (2006). An in situ postexposure feeding assay with *Carcinus maenas* for estuarine sediment-overlying water toxicity evaluations. *Environmental Pollution*, Vol. 139, pp. 318-329.

Mylar, M. (sd). Mosquito fish and others baitfish [Em linha]. Disponível em <<http://forums.flytyer.com/forum/31-freshwater-tying/17801-mylar-minnow-mosquito-fish-and-others-baitfish>> [Consultado em 3\02\2012].

Nathan, S. S., Kalaivani, K. e Murugan, K. (2006). Effect of biopesticides on the lactate dehydrogenase (LDH) of the rice leaffolder, *Cnaphalocrocis medinalis* (Guenée) (Insecta: Lepidoptera: Pyralidae). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, Vol. 65, pp. 102-107.

Neto, A. F. G. (2008). Susceptibilidade da enguia-europeia (*Anguilla anguilla*) à degradação ambiental no estuário do Tejo. Contaminação biológica pelo parasita *Anguillicola crassus* e contaminação química por metais pesados. Dissertação para obtenção do grau de Mestre. Universidade de Lisboa.

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

Newman, M. C. (2001). *Fundamentals of Ecotoxicology*. Lewis Publishers, USA, capítulo 3,6.

Nunes, B., Carvalho, F. e Guilhermino, L. (2004). Acute and chronic effects of clofibrate and clofibric acid on tge enzymes acetylcholinesterase, lactate dehydrogenase

and catalase of the mosquitofish, *Gambusia holbrooki*. *Chemosphere*, Vol. 57, pp. 1581-1589.

Nunes, B., Carvalho, F. e Guilhermino, L. (2005). Characterization and use of the total head soluble cholinesterases from mosquitofish (*Gambusia holbrooki*) for screening of anticholinesterases activity. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, Vol. 20, pp. 369-376.

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

Nunes, B. (2011). The use of cholinesterases in ecotoxicology. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, Vol. 212, pp. 29-59.

Ogunji, J. O., Nimptsch, J., Wiegand, C. e Schulz, C. (2007). Evaluation of the influence of housefly maggot meal (maggot meal) diets on catalase, glutathione S-transferase and glycogen concentration in the liver of *Oreochromis niloticus* fingerling. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A*, Vol. 147, pp. 942-947.

Oliveira, M., Serafim, A., Bebianno, M. J., Pacheco, M. e Santos, M. A. (2008). European eel (*Anguilla anguilla* L.) metallothionein, endocrine, metabolic and genotoxic responses to copper exposure. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, Vol. 70, pp. 20-26.

Oliveira, M., Santos, M. A. e Pacheco, M. (2004). Glutathione protects heavy metal-induced inhibition of hepatic microsomal ethoxyresorufin *O*-deethylase activity in

Dicentrarchus labrax L. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, Vol. 58, pp. 379-385.

Orbea, A., Ortiz-Zarragoitia, M., Solé, M., Porte, C. e Caiaraville, M. P. (2002). Antioxidant enzymes and peroxisome proliferation in relation to contaminant body burdens of PAHs and PCBs in bivalve molluscs, crabs and fish from the Urdaibai and Plentzia estuaries (Bay of Biscay). *Aquatic Toxicology*, Vol. 58, pp. 75-98.

Ortiz-Ordoñez, E., Uría-Galicia, E., Ruiz-Picos, R. A., Duran, A. G. S., Trejo, Y. H., Sedeño-Díaz, J. E. e López-López, E. (2011). Effect of yerbimat herbicide on lipid peroxidation, catalase activity, and histological damage in gills and liver of the freshwater fish *Goodea Atripinnis*. *Archives Environmental Contamination and Toxicology*, Vol. 61, pp. 443-452.

Padmini, E. e Rani, M. U. (2009). Evaluation of oxidative stress biomarkers o grey mullet inhabiting natural and polluted estuaries. *Science of the Total Environmental*, Vol. 407, pp. 4533-4541.

Paerl, H. W. (2006). Assessing and managing nutrient-enhanced eutrophication in estuarine and coastal waters: interactive effects of human and climatic perturbations. *Ecological Engineering*, Vol. 26, pp. 40-54.

Pandy, S., Parvez, S., Ansari, R. A., Ali, M., Kaur, M., Hayat, F., Ahmad, F. e Raisuddin, S. (2008). Effects of exposure to multiple trace metals on biochemical, histological and ultrastructural features of gills of a freshwater fish, *Channa punctata* Bloch. *Chemico-Biological Interactions*, Vol. 174, pp. 183-192.

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

Penneç, G. e Penneç, M. L. (2003). Induction of glutathione-S-transferases in primary cultured digestive gland acini from the mollusk bivalve *Pecten maximus* (L.): application of a new cellular model in biomonitoring studies. *Aquatic Toxicology*, Vol. 64, pp. 131-142.

Pereira, P., Pablo, H., Vale, C. e Pacheco, M. (2010). Combined use of environmental data and biomarkers in fish (*Liza aurata*) inhabiting a eutrophic and metal-contaminated coastal system – gills reflect environmental contamination. *Marine Environmental Research*, Vol. 69, pp. 53-62.

Polis Litoral Ria de Aveiro – Requalificação e Valorização da Orla Costeira (2010). Estudo para a requalificação e valorização da Barrinha de Esmoriz.

Portaria nº 1450/2007, de 12 de Novembro, fixa as regras do regime de utilização dos recursos hídricos.

Quintaneiro, C., Monteiro, M., Pastorinho, R., Soares, A. M. V. M., Nogueira, A. J. A., Morgado, F. e Guilhermino, L. (2006). Environmental pollution and natural populations: a biomarkers case study from the Iberian Atlantic coast. *Marine Pollution Bulletin*, Vol. 52, pp. 1406-1413.

Ravera, O. (2001). Monitoring of the aquatic environment by species accumulator of pollutants: a review. *Scientific and legal aspects of biological monitoring in freshwater J. Limnol.*, Vol. 60, pp. 63-78.

Reis, A. (2008). Paisagem protegida da Foz do Cáster e Reserva Natural da Barrinha de Esmoriz. [Em linha]. Disponível em <<http://ondaseventania.blogspot.pt/2008/11/paisagem-protegida-da-foz-do-cster-e.html>> [Consultado em 5\01\2012].

Ribeiro, C. A. O., Vollaire, Y., Sanchez-Chardi, A. e Roche, H. (2005). Bioaccumulation and the effects of organochlorine pesticides, PAH and heavy metals in the eel (*Anguilla Anguilla*) at the Camargue Nature Reserve, France. *Aquatic Toxicology*, Vol. 74, pp. 53-69.

Ricciardi, F., Binelli, A. e Provini, A. (2006). Use of two biomarkers (CYP450 and acetylcholinesterase) in *Zebra mussel* for the biomonitoring of Lake Maggiore (northern Italy). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, Vol. 63, pp. 406-412.

Rodrigues, P., Reis-Henriques, M.A., Campos, J., Santos, M.M. (2006). Urogenital papilla feminization in male *Pomatoschistus minutus* from two estuaries in northwestern Iberian Peninsula. *Marine Environmental Research*, Vol. 62, pp. 258-262.

Rodrigues, S. R., Caldeira, C., Castro, B. B., Gonçalves, F., Nunes, B., Antunes, S. C. (2011). Cholinesterase (ChE) inhibition in pumpkinseed (*Lepomis gibbosus*) as environmental biomarker: ChE characterization and potential neurotoxic effects of xenobiotics. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, Vol. 99, pp. 181-188.

Rodríguez, A., Gisbert, E., Rodríguez, G. e Castelló-Orvay, F. (2005). Histopathological observations in European glass eels (*Anguilla anguilla*) reared under different diets and salinities. *Aquaculture*, Vol. 244, pp. 203-214.

Saleki, S., Ardalan, F. A. e Javidan-Nejad, A. (2007). Liver histopathology of fatal phosphine poisoning. *Forensic Science International*, Vol. 166, pp: 190-193

Sanchez, W., Piccini, B., Maillot-Maréchal, E. e Porcher, J. (2010). Comparison of two reference systems for biomarker data analysis in a freshwater biomonitoring context. *Environment International*, Vol. 36, pp. 377-382.

Sanchez, W. e Porcher, J. M. (2009). Fish biomarkers for environmental monitoring within the Water Framework Directive of the European Union. *Trends in Analytical Chemistry*, Vol. 28, pp. 150-158.

Sanchez, W., Piccini, B., Ditché, J. M. e Porcher, J. M. (2008). Assessment of seasonal variability of biomarkers in three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus* L.) from a low contaminated stream: implication for environmental biomonitoring. *Environment International*, Vol. 34, pp. 791-798.

Sancho, E., Fernandez-Vega, C., Sanchez, M., Ferrando, M. D. e Moliner-Andreu, E. (2000). Alterations on AChE activity of the fish *Anguilla Anguilla* as response to herbicide-contaminated water. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, Vol. 46, pp. 57-63.

Sanz-Lázaro, C. e Marín, A. (2009). A manipulative field experiment to evaluate an integrative methodology for assessing sediment pollution in estuarine ecosystems. *Science of the Total Environment*, Vol. 407, pp. 3510-3517.

Schmitt-Jansen, M., Veit, U., Dudel, G. e Altenburger, R. (2008). An ecological perspective in aquatic ecotoxicology: approaches and challenges. *Basic and Applied Ecology*, Vol. 9, pp. 337-345.

Schwaiger, J., Wanke, R., Adam, S., Pawert, M., Honnen, W. e Triebkorn, R. (1997). The use of histopathological indicators to evaluate contaminant-related stress in fish. *Journal of Aquatic Ecosystem Stress and Recovery*, Vol. 6, pp. 75-86.

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

Short, S. e Meyers, T. R. (2001). *Chapter 13 histology for finfish*. NWFHS Laboratory Procedures Manual – Version 1.0.

Sena, C. (2007). Interações água subterrânea – água superficial na zona da Pateira de Fermentelos (Portugal). Dissertação de Mestrado. Universidade de Aveiro, Aveiro, pp. 198.

Simonato, J. D., Guedes, C. L. B., Martinez, C. B. R. (2008). Biochemical, physiological, and histological changes in the neotropical fish *Prochilodus lineatus* exposed to diesel oil. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, Vol. 69, pp: 112-120.

Siracusa, G., Rosa, A. D. L. e Sterlini, S. E. (2004). A new methodology to calculate the environmental protection index (E_p). A case study applied to a company producing composite materials. *Journal of Environmental Management*, Vol. 73, pp. 275-284.

Sousa, M. (sd). Barrinha de Esmoriz. [Em linha]. Disponível em <http://www.50espacos.campoaberto.org/espacos/lista/fichas/espinho/paramos/03/ficha_html/ficha.html> [Consultado em 10\09\2011].

Stanback, M. (2008). *Gambusia holbrooki* predation on *Pseudacris feriarum* tadpoles. *Herpetological Conservation and Biology*, Vol. 5(3), pp. 486-489.

Stentiford, G. D., Longshaw, M., Lyons, B. P., Jones, G., Green, M. e Feist, S. W. (2003). Histopathological biomarkers in estuarine fish species for the assessment of biological effects of contaminants. *Marine Environmental Research*, Vol. 55, pp. 137-159.

Teles, M., Pacheco, M. e Santos, M. A. (2007). Endocrine and metabolic responses of *Anguilla anguilla* L. caged in a freshwater – wetland (Pateira de Fermentelos – Portugal). *Science of the Environment*, Vol. 372, pp. 562-570.

Tesch, F. W. (2003). *The eel*. Oxford, Blackwell Science Ltd.

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

Triebkorn, R., Telcean, I., Casper, H., Farkas, A., Sandu, C., Stan, G., Colărescu, O., Dori, T. e Köhler, H. (2008). Monitoring pollution in River Mures, Romania, part II: metal accumulation and histopathology in fish. *Environmental Monitoring Assessment*, Vol. 141, pp. 177-188.

Valavanidis, A., Vlahogianni, T., Dassenakis, M. e Scoullou, M. (2006). Molecular biomarkers of oxidative stress in aquatic organisms in relation to toxic environmental pollutants. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, Vol. 64, pp. 178-189.

Valbonesi, P., Brunelli, F., Mattioli, M., Rossi, T. e Fabbri, E. (2011). Cholinesterase activities and sensitivity to pesticides in different tissues of silver European eel,

Anguilla anguilla. *Comparative Biochemistry and Physiology*, Part C, Vol. 154, pp. 353-359.

Valhogianni, T., Dassenakis, M., Scoullou, M. J. e Valavanidis, A. (2007). Integrated use of biomarkers (superoxide dismutase, catalase and lipid peroxidation) in mussels *Mytilus galloprovincialis* for assessing heavy metals pollution in coastal areas from the Saronikos Gulf of Greece. *Marine Pollution Bulletin*, Vol. 54, pp. 1361-1371.

van der Oost, R., Opperhuizen, A., Satumalay, K., Heida, H. e Vermeulen, P. E. (1996). Biomonitoring aquatic pollution with feral eel (*Anguilla Anguilla*) I. Bioaccumulation: biota-sediment ratios of PCBs, OCPs, PCDDs and PCDFs. *Aquatic Toxicology*, Vol. 35, pp. 21-46.

van der Oost, R., Beyer, J. e Vermeulen, N. P. E. (2003). Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, Vol. 13, pp. 57-149.

Van Dyk, J. C., Pieterse, G. M. e Van Vuren, J. H. J. (2007). Histological changes in the liver of *Oreochromis mossambicus* (Cichlidae) after exposure to cadmium and zinc. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, Vol. 66, pp. 432-440.

Vassault, A. (1983). *Lactate dehydrogenase*. In *methods of enzymatic analysis – Vol III (Enzymes: Oxireductases Transferases)*. Edited by H.O Bergmeyer. Academic Press, N.Y, pp. 118-126.

Viarengo, A., Canesi, L., Pertica, M., Livingstone, D. R. (1991). Seasonal variation in the antioxidant defence systems and lipid peroxidation of the digestive gland of mussels. *Comparative Biochemistry and Physiology*, Vol. 100C, pp. 187-190.

Walker, C.H., Hopkin, S.P., Sibly, R.M., Peakall, D.B. (2001). *Principles of ecotoxicology*. Second Edition, Library of Congress Cataloging in Publication Data, 59-89 e163-178.

Wester, P. W., Ven, L. T. M. van der, Vethaak, A. D., Grinwis, G. C. M. e Vos, J. G. (2002). Aquatic toxicology: opportunities for enhancement through histopathology. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, Vol. 11, pp. 289-295.

William, P. L., James, R. C. e Roberts, S. M. (2000). *Principles of toxicology: environmental and industrial applications*. Nova York, Second Edition, John Wiley & Sons.

Wilson, J. M. e Laurent, P. (2002). Fish gill morphology: inside out. *Journal of Experimental Zoology*, Vol. 293, pp. 192-213.

Wu, R. S. S. e Lam, P. K. S. (1997). Glucose-6-phosphate dehydrogenase and lactate dehydrogenase in the green-lipped mussel (*Perna viridis*): possible biomarkers for hypoxia in the marine environment. *Water Research*, Vol. 31, pp. 2797-2801.

Xilan, Y., Gang, L., Chungen, W., Baoqing, H., Lirong, D., Pengzu, P. e Yanhai, X. (2011). A catalase from the freshwater mussel *Cristaria plicata* with cloning, identification and protein characterization. *Fish & Shellfish Immunology*, Vol. 31, pp. 389-399.

Yildiz, S., Gurcu, B., Koca, Y. B. e Koca, S. (2010). Histopathological and genotoxic effects of pollution on *Anguilla anguilla* in the Gediz River (Turkey). *Journal of Animal and Veterinary Advances*, Vol. 23, pp. 2890-2899.

Yilmaz, F. (2009). The comparison of heavy metal concentrations (Cd, Cu, Mn, Pb, and Zn) in tissues of three economically important fish (*Anguilla Anguilla*, *Mugil cephalus* and *Oreochromis niloticus*) inhabiting Köycegiz Lake-Mugla (Turkey). *Turkish Journal of Science & Technology*, Vol. 4, pp: 7-15.

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