



UNIVERSIDADE DA BEIRA INTERIOR  
Ciências

# O papel dos contaminantes ambientais na epidemia global da obesidade

**Susana Raquel Correia Coelho**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em  
**Biotecnologia**  
(2º ciclo de estudos)

Orientador: Prof. Doutor Manuel Ramiro Dias Pastorinho  
Coorientadores: Doutora Ana Catarina Sousa  
e Prof. Doutora Maria Assunção Vaz Patto

**Covilhã, novembro de 2019**



# Agradecimentos

Em primeiro lugar, queria agradecer à Universidade da Beira Interior e a esta cidade que me receberam sempre de braços abertos. Estes 5 anos foram os melhores da minha vida.

Um muito obrigada gigante aos meus orientadores, Professor Doutor Ramiro Pastorinho e a Doutora Ana Catarina Sousa. Muito obrigado pelo apoio incondicional, pela partilha científica e por serem pessoas incríveis.

Queria também agradecer, à Dr. Ana Borges pela ajuda técnica na microscopia. À Professora Doutora Assunção Vaz Pato e ao Doutor Nuno.

Muito muito obrigada aos meus pais, sem eles nada disto seria possível. Obrigada por todo o apoio, por nunca desistirem de mim e por terem financiado sempre o meu futuro.

Estou muito grata também aos meus avós que sempre estiveram ao meu lado nos momentos mais importantes, sempre com muito orgulho estampado no rosto.

Queria também agradecer aos meus tios, Miguel Neiva e Ana Maria Neiva, por todo o apoio incondicional.

Ao Diogo Lavareda, meu namorado, agradeço por todo o apoio, todo o estudo, todas as lágrimas, toda a paciência, todos os sorrisos e todo o amor.

Obrigada a todos os membros do Steelab, principalmente, a Diana, o Celso, a Letícia, o Valente e o Rafael. Conseguimos criar a família Steelab.

Estou muito agradecida aos amigos que sempre me apoiaram e estiveram lá para mim. Muito obrigada pelas pessoas maravilhosas que são: Inês Deus, Celso Ferraz, Margarida Vaz, Tatiana Sousa, Ana Ferro. Obrigada por todo o apoio, todas as lágrimas, todos os sorrisos e todos os momentos inesquecíveis.

Por fim, obrigada à família azul turquesa e principalmente as pessoas que fazem parte do ano 2014/2015. Uma cor, um curso, uma família Biotecnologia.

Agradeço também à Prof Doutora Carla Patinha da Universidade de Aveiro pela análise de metais.

Este trabalho foi suportado com verbas do Centro de Investigação em Ciências da Saúde (CICS-UBI) financiado por Fundos Nacionais pela Fundação para a Ciência e a Tecnologia (FCT) (UID/Multi/00709/2019) e pelo projeto ICON "Interdisciplinary Challenges on Neurodegeneration (ICON)" (Ref. CENTRO-01-0145-FEDER-000013).



## Resumo

A obesidade é um problema crescente dos tempos atuais, com incidência tanto em países desenvolvidos como em países em desenvolvimento. É considerada uma epidemia pela Organização Mundial de Saúde (OMS) e tem suscitado o interesse da comunidade científica. As explicações clássicas para a obesidade são a ingestão excessiva de calorias, a falta de exercício físico e os fatores genéticos. No entanto estas explicações não conseguem esclarecer completamente a epidemia da obesidade. No ano de 2006, surgiu um novo factor explicativo associado à exposição a um conjunto de contaminantes ambientais, os denominados obesogénios.

A *Daphnia magna* é um organismo invertebrado, reconhecido pelas agências reguladoras como um organismo modelo para testes toxicológicos. No entanto, o seu uso no estudo de patologias humanas ainda é limitado. De entre todas as vantagens associadas ao uso deste organismo neste contexto, talvez a principal se prenda com o facto de este crustáceo possuir uma homologia de 94% com os genes humanos (a melhor de todos os invertebrados, incluindo modelos clássicos como, por exemplo, *Drosophila melanogaster*). Esta característica associada ao facto de se tratar de um organismo de fácil manutenção em laboratório, ter um ciclo de vida curto, ser pequeno e transparente, e ser possível o estudo da acumulação lipídica de uma forma simples, tornam-no num modelo promissor para o estudo da ação dos compostos obesogénicos.

Assim, o objetivo desta dissertação é perceber o efeito da exposição a potenciais obesogénios presentes em produtos usados quotidianamente, tais como a bijutaria, e avaliar a sua potencial toxicidade e obesogenicidade. Foram realizados testes agudos e crónicos com o objetivo de perceber o efeito da exposição a nível da reprodução, do crescimento e da quantidade de lípidos acumulados. Para efeitos comparativos, foi ainda realizado um teste agudo com o obesogénio de referência, o tributilestanho (TBT).

Os resultados obtidos fornecem pela primeira vez evidências científicas que a exposição aguda e crónica à bijuteria aumenta a quantidade de lípidos e a exposição crónica afeta o crescimento, reprodução e tem efeitos letais nas *Daphnias* expostas.

Com o intuito de perceber quais os elementos presentes na bijutaria com potencial obesogénico e tóxico foram quantificados os níveis de metais presentes em solução. De entre os metais não essenciais, a prata e o cádmio foram aqueles que registaram níveis mais elevados.

Os resultados obtidos sugerem uma elevada toxicidade e potencial obesogénico da bijutaria analisada, reforçando a necessidade de avaliação de risco associado à exposição a produtos de uso quotidiano.

## Palavras-chave

Obesidade, compostos obesogénicos, tributilestanho, *Daphnia magna*



# Abstract

Obesity is an emerging and global problem affecting both developed and developing countries. It is considered an epidemic by the World Health Organization (WHO) and the scientific community made it a topic of increasing interest. Traditional explanations for obesity include excessive calorie intake, lack of exercise and genetic factors. However, these explanations cannot fully elucidate the obesity epidemic. In 2006, a new explanation emerged, and obesity was associated with exposure to a set of environmental contaminants, the so-called obesogens.

*Daphnia magna* is an invertebrate organism, acknowledged by regulatory agencies as a model organism for toxicological tests. However, its use on the study of human pathologies is still limited. Aside from all the advantages associated with this organism, perhaps the most important characteristic is that this crustacean possesses a 94% homology with human genes (the highest among invertebrates, even higher than classical models such as, for instance, *Drosophila melanogaster*). This characteristic associated with is the easiness of laboratory maintenance, short life cycle, small and transparent body, and allowing for the study of lipid accumulation in a direct manner, renders *D. magna* as a promising model for the study of the action of obesogens.

Thus, the objective of this dissertation is to study the effects of exposure to potential obesogens present in consumer products, such as jewelry, and to evaluate its potential toxicity and obesogenicity. Acute and chronic tests were performed in order to evaluate the effect of exposure on reproduction, growth and the amount of accumulated lipids. For comparative purposes, an acute test was also performed with the model obesogen, tributyltin (TBT).

The results obtained provide, for the first time, scientific evidence that acute and chronic exposure to jewelry increases the amount of lipids, and that chronic exposure affects growth, reproduction and have lethal effects on the exposed *Daphnids*.

In order to understand which elements present in the jewelry have obesogenic and toxic potential, the levels of metals in solutions obtained after jewelry extractions were quantified. Among non-essential metals, silver and cadmium were those that recorded the highest levels.

The results obtained suggest high toxicity and obesogenic potential for the jewelry used in the assays, reinforcing the need for risk assessment associated with exposure to consumer products.

## Keywords

Obesity, obesogenic compounds, organotin compounds, TBT, *Daphnia magna*



# Índice

Capítulo 1 - Introdução .....	1
1.1. Obesidade .....	1
1.2. Compostos obesogénicos .....	3
1.2.1. Exemplos de compostos obesogénicos .....	4
1.2.2. Compostos organoestânicos e TBT .....	7
1.2.3. Tributilestanho (TBT) e mecanismo da obesogénese .....	8
1.2.4. Modelos animais para estudos de compostos obesogénicos.....	10
1.3. Organismo teste - <i>Daphnia magna</i> .....	10
Capítulo 2 - Objetivo.....	14
Capítulo 3 - Métodos .....	15
3.1. Manutenção das culturas de <i>Daphnia magna</i> .....	15
3.2. Validação dos testes de toxicidade .....	15
3.3. Avaliação da toxicidade .....	16
3.3.1. Toxicidade aguda .....	16
3.3.1.1. Toxicidade aguda - TBT .....	16
3.3.1.2. Visualização dos lípidos.....	17
3.3.1.3. Toxicidade aguda - Bijutaria .....	18
3.3.1.3.1.Preparação das soluções teste .....	18
3.3.1.3.2.Ensaio A .....	19
3.3.1.3.3.Ensaio B .....	20
3.3.2. Toxicidade Crónica .....	20
3.3.2.1. Toxicidade Crónica Bijutaria .....	21
3.4. Análise de metais.....	22
Capítulo 4 - Resultados .....	23
4.1. Teste do Dicromato de potássio .....	23
4.2. Teste de toxicidade aguda - TBT .....	23
4.3. Teste de toxicidade aguda - Bijutaria .....	25
4.3.1. Ensaio A .....	25
4.3.2. Ensaio B .....	27
4.4. Teste crónico - Bijutaria.....	29
4.4.1. Mortalidade .....	29
4.4.2. Reprodução .....	30
4.4.3. Crescimento .....	32
4.4.4. Quantificação dos lípidos .....	33
4.5. Análise de metais.....	35
Capítulo 5 - Discussão.....	37

5.1. TBT .....	37
5.2. Bijuteria .....	37
5.2.1. Testes agudos .....	37
5.2.2. Teste crónico .....	40
5.3. Metais .....	42
Capítulo VI - Conclusão e perspetivas futuras .....	44
Bibliografia.....	45
Anexo I - Preparação de meios de cultura.....	52
Anexo II - Lista de Publicações.....	53



# Lista de Figuras

Figura 1: Esquema ilustrativo da degradação de um composto orgânico de estanho tri-substituído, no caso o TBT. ....	9
Figura 2: Fêmea de <i>Daphnia magna</i> observada à lupa (ampliação 1x). ....	11
Figura 3: Ciclo de vida <i>Daphnia</i> . Adoptada de (Ebert 2005). ....	12
Figura 4: Representação esquemática de testes multigeracionais e transgeracionais. ....	13
Figura 5: Visualização dos lípidos em <i>Daphnia magna</i> com a coloração de Nile red. A área delimitada pelo retângulo amarelo corresponde à área onde foi quantificada a fluorescência. ....	17
Figura 6: Exemplo de bijuteria utilizada para o ensaio A (teste toxicidade aguda). ....	18
Figura 7: Exemplos de bijuteria utilizada para o ensaio B (testes de toxicidade aguda e crónica). ....	19
Figura 8: Medição do exopodito com uma ampliação de 5x. ....	21
Figura 9: Quantificação dos lípidos (em pixéis) para o teste agudo do TBT. As colunas correspondem à medida dos pixéis observados em 3 <i>Daphnias</i> por cada tratamento e as barras correspondem ao desvio padrão. ....	24
Figura 10: Fotografias de microscopia eletrónica confocal evidenciando as acumulações lipídicas (marcadas a verde). A imagem do lado esquerdo representa uma <i>Daphnia</i> não exposta a TBT (Controlo positivo) e a imagem, do lado direito corresponde a uma <i>Daphnia</i> exposta a uma solução com uma concentração de $1.0 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ . ....	24
Figura 11: Percentagem de imobilização para o teste agudo da bijuteria às 24h (a azul) e 48h (a laranja). ....	25
Figura 12: Quantificação dos lípidos (em pixéis) para o teste agudo de bijuteria (ensaio A). As colunas correspondem à medida dos pixéis observados em 3 <i>Daphnias</i> por cada tratamento e as barras correspondem ao desvio padrão. ....	26
Figura 13: Fotografias de microscopia eletrónica confocal evidenciando as acumulações lipídicas (marcadas a verde). A imagem do lado esquerdo representa uma <i>Daphnia</i> exposta a uma solução de 15% de bijuteria e a imagem do lado direito corresponde a uma <i>Daphnia</i> exposta a uma solução de 80%. ....	27
Figura 14: Quantificação dos lípidos (em pixéis) para o teste agudo de bijuteria (ensaio B). As colunas correspondem à medida dos pixéis observados em 3 <i>Daphnias</i> por cada tratamento e as barras correspondem ao desvio padrão. ....	28
Figura 15: Fotografias de microscopia eletrónica confocal evidenciando as acumulações lipídicas (marcadas a verde). A imagem do lado esquerdo representa uma <i>Daphnia</i> não exposta a bijuteria (Controlo positivo) e a imagem do lado direito corresponde a uma <i>Daphnia</i> exposta a uma solução de bijuteria com uma concentração de 80%. ....	29
Figura 16: <i>Daphnias</i> mortas no teste crónico de bijuteria ao longo dos 21 dias. ....	30
Figura 17: Número total de neonatos obtidos em cada tratamento. ....	31

Figura 18: Comprimento médio da Daphnia ao longo das ninhadas para a concentração de 12,5% e para o controlo. ....	32
Figura 19: Quantificação dos lípidos (em pixéis) para o teste crónico de bijutaria (ensaio B). As colunas correspondem à medida dos pixéis observados em 5 Daphnias por cada tratamento e as barras correspondem ao desvio padrão. ....	33
Figura 20: Fotografias de microscopia eletrónica confocal evidenciando as acumulações lipídicas (marcadas a verde). A imagem do lado esquerdo representa uma Daphnia não exposta a bijutaria (Controlo) durante 21 dias e a imagem do lado direito corresponde a uma Daphnia exposta durante 21 dias a uma solução de bijutaria com uma concentração de 12,5%. ....	34
Figura 21: Concentrações de prata, alumínio, cádmio e crómio nas duas soluções de bijutaria usadas. ....	35
Figura 22: Concentrações dos metais essenciais cobre, manganésio, zinco e ferro nas duas soluções de bijutaria usadas. ....	36
Figura 23: Resultados da avaliação do conteúdo em lípidos normalizados ao respetivo controlo positivo para as diferentes concentrações de bijutaria do Ensaio A comparados com o valor obtido para o obesogénio modelo ([TBT]= 1 mg.L <sup>-1</sup> ) também normalizado ao respetivo controlo. ....	38
Figura 24: Resultados da avaliação do conteúdo em lípidos normalizados ao respetivo controlo positivo para as diferentes concentrações de bijutaria do Ensaio B comparados com o valor obtido para o obesogénio modelo ([TBT]= 1 mg.L <sup>-1</sup> ) também normalizado ao respetivo controlo. ....	39
Figura 25: Carapaça com ovos no interior (ampliação 1x) resultante de uma de Daphnia exposta a uma concentração de 12.5%. ....	41



# Lista de Tabelas

Tabela 1: Categorias do Índice de Massa Corporal (IMC) definidas pela Organização Mundial de Saúde (OMS). .....	1
Tabela 2: Quadro resumo com exemplos de algumas das evidências científicas existentes para alguns compostos obesogénicos. ....	6
Tabela 3: Aplicações dos compostos organoestânicos. Adaptado de (Sousa, Pastorinho et al. 2014) .....	7
Tabela 4: Sumário das concentrações ( $\mu\text{g.L}^{-1}$ ) dos diferentes metais analisados por ICP-MS e valores de $\text{EC}_{50}$ ( $\mu\text{g.L}^{-1}$ ) reportados na literatura para os metais em questão (Decreto-Lei n.º 152/2017 2017). A laranja estão assinalados os valores acima do $\text{EC}_{50}$ e a cinza aqueles acima do máximo legal. ....	42



# Lista de Acrónimos

EDCs - *Endocrine Disrupting Chemicals*

OMS - Organização Mundial de Saúde

CE - Comunidade Europeia

BPA - Bisfenol A

TBT - Tributilestanho

OCDE - Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Económico

IMC - Índice de Massa Corporal

PPARs - Recetor ativado por proliferadores do peroxissoma

RXR - Recetor retinóide X

MSCs - Células estaminais mesenquimais

POPs - Poluentes Orgânicos Persistentes

PAHs - Hidrocarbonetos Aromáticos Policíclicos

DDT - Diclorodifeniltricloroetano

PCBs - Bifenilos policlorados

OCs - Compostos organoclorados

PVC - Policloreto de vinil



# Capítulo 1 - Introdução

## 1.1. Obesidade

Segundo a Direção-geral de saúde “A obesidade define-se como uma situação em que existe uma acumulação excessiva de massa gorda corporal, com potencial impacto negativo na saúde.” (Camolas, Gregório et al. 2017). Clinicamente a obesidade é definida através do Índice de Massa Corporal (IMC). O IMC é uma medida simples, económica e não invasiva usada na prática clínica para definir o estado de saúde corporal de um indivíduo. Calcula-se utilizando o peso do indivíduo em quilogramas e dividindo pelo quadrado da altura em metros. A partir, deste cálculo, a Organização Mundial de Saúde (OMS) definiu que um indivíduo com IMC superior a 25,0 kg.m<sup>2</sup> tem excesso de peso e acima de 30 Kg.m<sup>2</sup> é considerado obeso, tal como ilustrado na tabela 1 (Kaur, Saxena et al. 2018).

Tabela 1: Categorias do Índice de Massa Corporal (IMC) definidas pela Organização Mundial de Saúde (OMS).

IMC (Kg.m <sup>2</sup> )	
< 16,0	Baixo peso severo
16,0 - 16,9	Baixo peso moderado
17,0 - 18,49	Peso ligeiramente abaixo do normal
18,5 - 24,9	Peso normal
≥ 25,0	Excesso de peso
25,0 - 29,9	Pré-obeso
≥ 30,0	Obesidade

O excesso de peso e/ou obesidade está associado a várias doenças como por exemplo a diabetes, as doenças cardiovasculares, alguns tipos de cancro (Kaur, Saxena et al. 2018), entre outras.

A obesidade tem aumentado nas últimas décadas, sendo considerada uma epidemia pela OMS que afeta não só países desenvolvidos como países em desenvolvimento (OECD 2017). Segundo o último relatório da Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Económico (OCDE), em 2015, 19,5% dos indivíduos adultos eram obesos nos países que fazem parte desta organização (OECD 2017). Em Portugal, em 2015, esse valor era de 18,7%, (Legler, Fletcher et al. 2015, OCDE 2019). Em termos de excesso de peso, 38,9% da população Portuguesa tinha excesso de peso em 2015 (OCDE 2019).

A explicação tradicional para o excesso de peso passa pela ingestão calórica em excesso, pela falta de exercício físico e por fatores genéticos (Speliotes, Willer et al. 2010, Speakman and Rahilly 2012). Em relação à falta de exercício físico e a ingestão de alimentos em excesso, um estudo epidemiológico realizado nos Estados Unidos da América durante quase 4 décadas numa amostra representativa da população, mostrou que para o mesmo aporte calórico, a mesma quantidade de macronutrientes e a mesma prática de exercício físico, o IMC aumenta (Brown, Sharma et al. 2016). Estes resultados sugerem que a falta de exercício físico e a ingestão de alimentos em excesso não conseguem justificar os níveis de IMC elevados. Por outro lado, os fatores genéticos não explicam de uma forma clara o problema da obesidade, pois não é possível explicar como é que numa geração, os genes mudem à escala global (Grun and Blumberg 2006).

Em 2006, surgiu uma nova teoria para explicar o aumento da obesidade à escala global. Esta nova explicação, foi proposta por Blumberg quando demonstrou que os contaminantes ambientais podiam induzir acumulação lipídica e excesso de peso em modelos *in vitro* e *in vivo* (Grun and Blumberg 2006).

Os fatores ambientais que podem estar a contribuir para o aumento desta epidemia incluem a poluição do ar, “o ambiente construído pelo Homem” (edifícios, sistemas de transporte, etc), a exposição ao tabaco, a exposição a contaminantes ambientais, entre outros (Heindel, Newbold et al. 2015). De entre os contaminantes ambientais existentes, as que mais se destacam por ter um papel preponderante na obesidade são os desreguladores endócrinos (EDCs). Segundo a “Endocrine Society” um desregulador endócrino é definido como “um químico exógeno, ou uma mistura de produtos químicos, que podem interferir com qualquer aspeto da ação hormonal” (Zoeller, Brown et al. 2012). A OMS define disruptores endócrinos como “uma substância ou uma mistura exógena que altera a(s) função(ões) do sistema endócrino e, conseqüentemente, provoca efeitos adversos no organismo íntegro, ou sua descendência ou (sub)população” (Lamb, Boffetta et al. 2014). De uma forma muito parecida com a OMS, a Comunidade Europeia (CE) define EDCs como “substâncias químicas que alteram o funcionamento do sistema endócrino e afetam negativamente a saúde dos seres humanos e dos animais” (Comissão Europeia 2018). Em 2018, a Comunidade Europeia adotou os critérios que permitem considerar um químico como EDCs (European Chemicals Agency 2018).

## 1.2. Compostos obesogénicos

Em 2006, Grun e Blumberg publicaram o agora clássico artigo que demonstrou que o tributilestanho, um biocida usado em tintas antivegetativas, potenciava a obesidade em modelos animais. Este artigo fala pela primeira vez em “compostos obesogénicos”. Na altura, estes compostos foram definidos como “moléculas que regulam inadequadamente o metabolismo lipídico e a adipogénese para promover obesidade” (Grun and Blumberg 2006). Mais recentemente, Almudena Veiga-Lopez definiu obesogénicos como sendo “EDCs que podem aumentar a massa de tecido adiposo por hipertrofia ou hiperplasia, pela diferenciação de pré-adipócitos ou por alteração do destino das células estaminais mesenquimais para sofrer diferenciação adipogénica e/ou perturbar a função dos adipócitos, levando ao aumento da produção de lípidos” (Veiga-Lopez, Pu et al. 2018).

As vias de atuação dos compostos obesogénicos ainda não se encontram bem esclarecidas, no entanto, sabe-se que a via de sinalização do recetor ativado por proliferadores do peroxissoma (PPAR $\gamma$ ) e o receptor retinoide X (RXR) fazem parte dos mecanismos moleculares de ação dos compostos obesogénicos (Jordao, Garreta et al. 2016). O PPAR $\gamma$  é o regulador chave que controla a proliferação lipídica, a diferenciação lipídica e que controla o fluxo de lípidos intracelular. Quando os PPARs são heterodimizados com o RXR servem de ligandos metabólicos para hormonas, ácidos gordos e metabolitos. Alguns contaminantes ambientais podem também ativar o PPAR $\gamma$  e assim regular positivamente a expressão deste recetor, contribuindo o desenvolvimento da obesidade (Fang, Webster et al. 2015). A ativação destes dois recetores promove a biossíntese e armazenamento de lípidos, promovendo por sua vez a diferenciação de pré-adipócitos já existentes, mas também a conversão de células estaminais mesenquimais em pré-adipócitos e conseqüentemente em tecido adiposo (Grün and Blumberg 2009).

O tecido adiposo começa a formar-se durante o desenvolvimento embrionário através da camada germinativa mesodérmica, nesta altura do desenvolvimento a composição geral da massa gorda é determinada pela hipertrofia dos adipócitos (tamanho das células) e pela hiperplasia dos adipócitos (proliferação e/ou maturação celular). O segundo trimestre de gestação é o período crítico para a hiperplasia dos adipócitos. Durante a infância e até aproximadamente aos 18 anos todo o tecido adiposo continua em desenvolvimento. Quando se atinge a maturidade, as células adipócitas mantêm uma taxa constante sem qualquer alteração no número de células (Foley, Doheny et al. 2017).

Ao nível do tecido adiposo, os obesogénios podem provocar um aumento do tecido por hipertrofia ou hiperplasia, podem provocar uma alteração na função dos adipócitos levando à maior produção de lípidos, uma indução de dislipidemia, uma falha nos perfis hormonais metabólicos, um incremento na diferenciação de pré-adipócitos, ou ainda estimular as células

estaminais mesenquimais (MSCs) para sofrer diferenciação adipogénica (Veiga-Lopez, Pu et al. 2018).

O **tributilestanho (TBT)**, foi o primeiro composto obesogénico descrito e é um dos mais estudados, sendo considerado como obesogénico modelo (Grun and Blumberg 2006). Atualmente, sabe-se que este composto interage com PPAR $\gamma$  e com o RXR (Jordao, Casas et al. 2015, Chamorro-Garcia and Blumberg 2019). No âmbito da presente tese, o TBT será utilizado nos ensaios de toxicidade como obesogénico modelo. Assim, uma descrição mais detalhada sobre este contaminante será fornecida na seção 1.2.3.

Depois do clássico artigo de Grun e Blumberg em 2006, que propôs o TBT como obesogénico, muitos outros possíveis obesogénicos foram estudados, existindo atualmente cerca de 50 compostos obesogénicos já documentados (Heindel, Blumberg et al. 2017). Dos 50 potenciais obesogénicos, os mais conhecidos são: o Bisfenol A (BPA), os Ftalatos, os Poluentes Orgânicos Persistentes (POPs), os Bifenilos Policlorados (PCBs), os Hidrocarbonetos Aromáticos Policíclicos (PAHs), os Compostos Organoclorados (OCs) e o diclorodifeniltricloroetano (DDT).

Tal como descrito na tabela 2, as evidências de que determinado composto é um potencial obesogénico são obtidas através de estudos *in vitro*, particularmente com linhas celulares de adipócitos e pré-adipócitos e através de estudos *in vivo*, sendo os modelos mais usados ratos, ratinhos, peixe zebra e mais recentemente invertebrados como crustáceos do género *Daphnia*. Atualmente, também já existem algumas evidências epidemiológicas para alguns destes compostos.

### 1.2.1. Exemplos de compostos obesogénicos

O **Bisfenol A (BPA)** é um monómero utilizado por exemplo na produção de plásticos, de resinas epóxi e papel térmico (Passos, Sousa et al. 2012). A sua presença em inúmeros produtos garante a exposição contínua a este EDC, de facto, este composto pode ser encontrado em mais de 90% dos indivíduos de uma amostra representativa da população dos Estados Unidos (Calafat, Ye et al. 2008). Apesar de haver muitos estudos *in vivo* e *in vitro*, as evidências epidemiológicas são limitadas, no entanto, um estudo realizado com 1521 indivíduos dos EUA, demonstrou que existe uma correlação positiva entre as elevadas concentrações de BPA na urina e a obesidade (Liu, Lehmler et al. 2017).

Os **ftalatos**, são usados como plastificantes industriais, e também em produtos cosméticos. Um estudo feito em 2017, com 345 grávidas mostra que a exposição pré-natal a ftalatos pode provocar o aumento do IMC na infância. Um dos metabolitos de ftalatos testado neste estudo foi o ftalato de dietil (DEP) e com um risco relativo de 1,3, o que demonstra que existe maior

probabilidade das crianças terem sobrepeso ou obesidade com a idade de 12 anos (Harley, Berger et al. 2017).

Os **Poluentes Orgânicos Persistentes (POPs)** são substâncias químicas lipofílicas e persistentes, que devido à sua toxicidade e persistência foram banidos pela Convenção de Estocolmo. Esta classe inclui vários compostos dos quais se destacam por exemplo os Bifenilos Policlorados (PCBs), os Compostos Organoclorados (OCs) e o diclorodifeniltricloroetano (DDT) (Stockholm Convention 2004, Stockholm Convention 2019). A acumulação de POPs em humanos ocorre particularmente no tecido adiposo (Stockholm Convention 2004).

Os **Bifenilos policlorados (PCBs)** foram amplamente utilizados em aparelhos elétricos industriais, mas em 1970 foram banidos na maioria dos países (Dirinck, Dirtu et al. 2015). Apesar de terem sido banidos há mais de 45 anos, estes compostos continuam presentes no meio ambiente devido à sua elevada estabilidade e persistência (Coelho, Sousa et al. 2016). São compostos muito lipofílicos, o que promove uma bioacumulação e biomagnificação ao longo da cadeia alimentar (Yang, Kong et al. 2017). Devido à sua lipofilicidade acumulam-se no tecido adiposo. Estudos epidemiológicos referem que a exposição pré-natal a PCBs, pode provocar obesidade na infância, principalmente se as mães tiverem um IMC elevado antes da gravidez. É de referir que crianças do sexo feminino com 7 anos de idade, cujas mães tinham excesso de peso, os níveis de PCBs estavam associados ao aumento de IMC com um risco relativo de 2,07 (Tang-Peronard, Heitmann et al. 2014).

Tal como os PCBs, o **diclorodifeniltricloroetano (DDT)** é um poluente orgânico persistente com alta resistência à degradação e com propriedades lipofílicas acumulando-se nos organismos por muitos anos. Também com este composto, estudos epidemiológicos mostram que a exposição pré-natal pode levar à obesidade infantil, principalmente em crianças do sexo masculino com um risco relativo de 1,96 (Valvi, Mendez et al. 2012).

Os **Hidrocarbonetos Aromáticos Policíclicos (PAHs)**, são compostos derivados da queima de combustíveis fósseis, como por exemplo, a combustão de gasóleo ou até o fumo do tabaco (tabela 2)(Muscogiuri, Barrea et al. 2017). A exposição ambiental a PAHs, segundo estudos epidemiológicos, está associada à obesidade infantil (Kim, Kam et al. 2014).

Tabela 2: Quadro resumo com exemplos de algumas das evidências científicas existentes para alguns compostos obesogênicos.

Compostos	Aplicação	Evidências <i>in vitro</i>	Evidências <i>in vivo</i>	Principais vias de exposição	Evidências epidemiológicas
Tributilestanho (TBT)	Tintas antivegetativas	Sim (Lutfi, Riera-Heredia et al. 2017)	Sim (Jordao, Casas et al. 2015)	Comida e pó doméstico	Não
Bisfenol A (BPA)	Resinas epóxi (revestimento de embalagens de alimentos e bebidas)	Sim (Dusserre, Mollergues et al. 2018)	Sim (Martinez, Esteve-Codina et al. 2018)	Dieta	Sim (Lang, Galloway et al. 2008)
Ftalatos e metabolitos	Plastificantes, aditivos e agentes emulsionantes	Sim (Cocci, Mosconi et al. 2015)	Sim (Hao, Cheng et al. 2013)	Ingestão e inalação	Sim (Lien, Chen et al. 2018, Veiga-Lopez, Pu et al. 2018)
Diclorodifeniltricloroetano (DDT)	Inseticida	Sim (Kim, Sun et al. 2016)	Sim (Palanza, Parmigiani et al. 2001)	Dieta	Sim (Valvi, Mendez et al. 2012)
Bifenilos policlorados (PCBs)	Transformadores e aparelhos elétricos industriais	Sim (Ferrante, Amero et al. 2014)	Sim (Maisano, Cappello et al. 2016)	Dieta	Sim (Tang-Peronard, Heitmann et al. 2014)
Hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (PAHs)	Combustão incompleta de materiais orgânicos	Não	Não	Inalação	Sim (Kim, Kam et al. 2014)
Compostos organoclorados (OCs)	Pesticidas	Não	Sim (Maisano, Cappello et al. 2016)	Ingestão	Não

### 1.2.2. Compostos organoestânicos e TBT

Os compostos orgânicos de estanho, ou compostos organoestânicos (OTs), são compostos organometálicos com a fórmula  $R_nSnX_{3-n}$ . Estes compostos têm o metal estanho na sua constituição e podem ter um grupo orgânico alquilo ou arilo (grupo R), e um ligante orgânico ou inorgânico (X). Dependendo do número de grupos orgânicos substituintes, os OTs classificam-se em 4 classes diferentes: mono- ( $R_nSnX_{3-n}$ ), di- ( $R_2SnX_2$ ), tri- ( $R_3SnX$ ) e tetraorganoestanhos ( $R_4Sn$ ). A toxicidade dos OTs varia conforme a natureza e o número de grupos orgânicos. Geralmente, os compostos trissubstituídos, onde se incluem o TBT e o trifenilestanho (TPT), são os biologicamente mais ativos e conseqüentemente os mais tóxicos (Sousa, Pastorinho et al. 2014).

Os OTs são usados como: (1) aditivos no processo de fabrico de cloreto de vinilo (PVC) para evitar descoloração e fragilização devido à luz e ao calor, (2) como catalisadores na produção de espumas e silicones de poliuretano, (3) como conservantes de madeira, (4) como biocidas, sendo esta última utilização aquela que mais contribuiu para a distribuição à escala global (tabela 3) (WHO 1990, Sousa, Pastorinho et al. 2014, Brtko and Dvorak 2015).

Tabela 3: Aplicações dos compostos organoestânicos. Adaptado de (Sousa, Pastorinho et al. 2014)

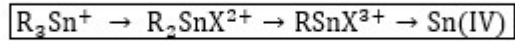
Classes de OTs	Formula química geral	Aplicações	Referências
Monosubstituído	$R_nSnX_{3-n}$	- Estabilizadores em filmes de Policloreto de vinilo (PVC); - Tratamento do vidro.	(WHO 1990) (ATSDR 2005)
Disubstituído	$R_2SnX_2$	- Estabilizadores na indústria de plásticos (particularmente PVC); - Catalisadores na produção de espumas de poliuretano e na vulcanização de silicones; - Processos de tratamento de vidro (precursores de filme de $SnO_2$ ); - Vermicidas em explorações de aves; - Agentes impermeabilizantes para materiais celulósicos (por exemplo, têxteis de algodão, papel e madeira); - Retardantes de chama para fabrico de lã; - Ligantes em vernizes aquosos.	(WHO 1990) (Hoch 2001)  (de Carvalho Oliveira and Santelli 2010)  (Antizar-Ladislao 2008)
Trissubstituído	$R_3SnX$	- Biocidas em formulações de tintas anti vegetativas; - Fungicidas, inseticidas,	(WHO 1990) (Hoch 2001)

Classes de OTs	Formula química geral	Aplicações	Referências
		pesticidas e miticidas na indústria agroquímica; - Pesticidas para plantas ornamentais; - Miticidas em citrinos; - Acaricida em vinhas; - Inseticida e fungicida na preservação da madeira; - Biocida em materiais de construção; - Desinfetante e biocida em sistemas de refrigeração de centrais elétricas, fábricas de papel e celulose, fábricas têxteis, cervejarias e curtumes; - Biocida em têxteis; - Biocida em almofadas alérgicas; - Biocida em palmilhas para calçado; - Biocida em calções de ciclismo; - Biocida em sprays para o tratamento de pé de atleta.	(RPA 2005)
Tetrasubstituído	$R_4Sn$	- Intermediários na preparação de outros OTs; - Estabilizador de óleos.	(WHO 1990)  (de Carvalho Oliveira and Santelli 2010)

### 1.2.3. Tributilestanho (TBT) e mecanismo da obesogénese

As propriedades biocidas do TBT foram descobertas em 1950, sendo desde a década de 60 utilizado como princípio ativo em tintas antivegetativas, usadas em embarcações e outras estruturas submersas (WHO 1990). Estas tintas impedem a acumulação de organismos incrustantes, como por exemplo, bactérias, protozoários, moluscos, algas, entre outros. A acumulação destes organismos nos navios, provoca um aumento do atrito e como consequência uma diminuição da velocidade e um aumento do consumo de combustível (Barros, Mendes et al. 2014). Devido à sua eficácia, o TBT foi usado durante décadas, sendo responsável pela contaminação à escala global dos oceanos.

A degradação do TBT em compostos menos tóxicos ocorre em condições aeróbias por ação de microorganismos ou por ação da luz ultravioleta, através de debrutelações sucessivas, tal como ilustrado na figura 1.



Tributilestanho → Dibutilestanho → Monobutilestanho → Estanho inorgânico

Figura 1: Esquema ilustrativo da degradação de um composto orgânico de estanho tri-substituído, no caso o TBT.

Apesar desta degradação ser possível, a sua baixa solubilidade em água e a forte afinidade com as partículas em suspensão faz com que o TBT se deposite nos sedimentos onde a sua degradação é muito lenta e conseqüentemente, o seu tempo de meia vida é elevado (Sousa, Pastorinho et al. 2014). Este composto é extramente tóxico para organismos não alvo. Um dos efeitos adversos do TBT é o aparecimento de características sexuais masculinas em fêmeas de gastrópodes. Este fenómeno bizarro é denominado de imposexo e é considerado como o melhor exemplo de disrupção endócrina na vida selvagem. Devido à sua persistência, distribuição global e toxicidade elevada, o uso de TBT foi banido à escala mundial em Setembro de 2008 pela Convenção AFS (Sousa, Pastorinho et al. 2013).

No entanto, os efeitos negativos do TBT não se restringem ao imposexo, de facto o TBT é considerado como um composto imunotóxico, neurotóxico e com atividade enzimática que pode provocar doenças oculares, dérmicas, cardiovasculares, respiratórias, gastrointestinais, hepáticas, renais, no sistema reprodutor e possivelmente ter efeitos carcinogénicos (Antizar-Ladislao 2008). Tal como descrito na seção 1.2.2. o TBT é também um potente obesogénico.

Estudos *in vitro*, com uma linha celular de células pré-adipócitas de rato (linha celular 3T3-L1) mostram que existe diferenciação destas células em adipócitos quando em contacto com TBT, por sua vez também o PPAR $\gamma$  e o receptor RXR são ativados (Regnier, El-Hashani et al. 2015). Testes *in vivo*, realizados com *Daphnia magna*, demonstraram que o TBT provoca um aumento lípidico em *Daphnias* adultas e também que este composto ativa a transcrição do recetor RXR, que tal como já foi referido anteriormente, é um dos principais reguladores da adipogénese (Jordao, Casas et al. 2015).

Tal como ilustrado na figura 1, o TBT é degradado primariamente em dibutilestanho (DBT). Estudos *in vivo* e *in vitro* demonstram que o DBT, tal como o TBT, provoca um aumento do armazenamento de lípidos nas células (Chamorro-Garcia, Shoucri et al. 2018). Um estudo realizado com 4 compostos de DBT (diacetato de dibutilestanho, dicloreto de dibutilestanho, dilaurato de dibutilestanho e maleato de dibutilestanho) mostra que todos induzem adipogénese. No entanto, contrariamente ao que acontece com o TBT, estes compostos dibutilados são apenas agonistas parciais do PPAR $\gamma$  e alguns também são agonistas parciais do

RXR, ou seja, o DBT estimula de forma positiva o PPAR $\gamma$  e o RXR mas com menor intensidade do que o TBT (Milton, Lacerda et al. 2017).

#### **1.2.4. Modelos animais para estudos de compostos obesogénicos**

A comunidade científica tem trabalho nos últimos tempos para a identificação de outros compostos potencialmente obesogénicos. Os primeiros ensaios a realizar para a descoberta destes compostos são normalmente realizados *in vitro*, com linhas celulares e *in vivo*, com modelos animais.

A linha celular 3T3-L1 de células pré-adipócitas de rato é das linhas celulares mais utilizada para o teste de potenciais compostos obesogénicos, sendo a linha celular proposta pela OCDE, para uma primeira abordagem no rastreio de EDCs, como os obesogénicos (OECD 2014, Pereira-Fernandes, Vanparys et al. 2014).

Os animais mais utilizados são o peixe zebra e a *Daphnia*. O problema de usar animais como o peixe zebra é que a Comissão Europeia tem vindo a restringir o número de animais vertebrados usados para investigações científicas (DIRECTIVA 2010/63/UE DO PARLAMENTO EUROPEU E DO CONSELHO 2010) e mais recentemente a Agência Ambiental dos Estados Unidos (United States Environmental Protection Agency 2019). Apesar de o peixe zebra ser um invertebrado até às primeiras 72 horas de vida, a partir daí ele é considerado um organismo vertebrado (United States Environmental Protection Agency 2019). A *Daphnia* sendo um organismo invertebrado e indicado pela OECD como um possível organismo para estudos de toxicologia torna-se uma excelente opção (OECD/OCDE 2012).

### **1.3. Organismo teste - *Daphnia magna***

O crustáceo *Daphnia* que popularmente é chamado “pulga de água”, é um invertebrado planctónico, que habita em ecossistemas aquáticos de água doce, como por exemplo lagos e lagoas (Bownik 2017). Esta espécie pertence ao género Cladocera. É um consumidor primário que se alimenta à base de fitoplâncton (algas verdes, como por exemplo, *Chlorella* e *Raphidocelis*), protozoários e bactérias (Ebert 2005).

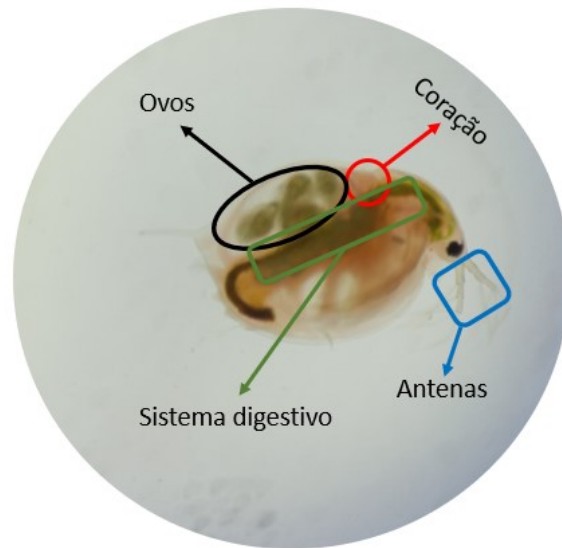


Figura 2: Fêmea de *Daphnia magna* observada à lupa (ampliação 1x).

Estes crustáceos exibem reprodução sexuada e reprodução assexuada. Em condições ideais de alimento, água, temperatura, pH e fotoperíodo, como as registradas em laboratório, este organismo reproduz-se de forma assexuada por partenogênese. A reprodução por partenogênese implica que os organismos são clones uns dos outros, ou seja, com pouca ou nenhuma variação genética. Uma *Daphnia magna* adulta dá a sua primeira ninhada entre o 7º e o 10º dia de vida, esta primeira ninhada caracteriza-se pela libertação de embriões geneticamente idênticos a ela. Após a 1ª ninhada, uma *Daphnia* adulta produz neonatos (fêmeas) de 3 em 3 dias. Em cada ninhada um novo ciclo recomeça, tal como está representado na figura 3 (Ebert 2005, Jeremias, Barbosa et al. 2018).

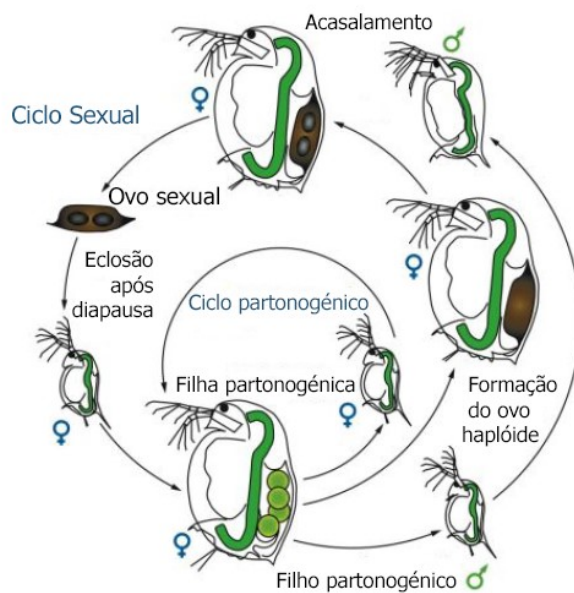


Figura 3: Ciclo de vida *Daphnia*. Adotada de (Ebert 2005).

Assim, estes organismos têm um ciclo de vida curto, sendo possível obter muitos neonatos num curto período de tempo (Siciliano, Gesuele et al. 2015). É também relativamente fácil, de manter este organismo em laboratório visto que tem um tamanho reduzido, mas visível a olho nu. Uma vantagem adicional resulta do facto que ao ser transparente, conseguimos ver todos os seus órgãos internos (Bownik 2017).

Este organismo é considerado pela OCDE como uma espécie modelo para realizar testes de toxicidade aguda e testes de toxicidade crónica (OECD/OCDE 2004, OECD/OCDE 2012) devido à sua sensibilidade e resiliência. Para além destes testes também é possível realizar testes multigeracionais e transgeracionais devido ao curto período de reprodução. Com estes dois testes conseguimos perceber quais os efeitos dos contaminantes ambientais nas gerações futuras. Os testes multigeracionais são ótimos testes para perceber qual o efeito de tóxicos *in utero*, ou seja, quando uma população de *Daphnia*, F0, está sujeita a um contaminante, a geração seguinte, F1, está em contacto direto com esse contaminante *in utero*. A nova geração, F2, estará em contacto com o contaminante através das células germinativas. Nos testes transgeracionais o contacto com o tóxico é indireto, ou seja, a nova geração, F3, não teve contacto algum com o contaminante e assim poderemos perceber como é que estes afetam as gerações futuras (Heindel, Blumberg et al. 2017, Jeremias, Barbosa et al. 2018). Na figura 4, está representado esquematicamente os princípios subjacentes aos testes multigeracionais e transgeracionais.

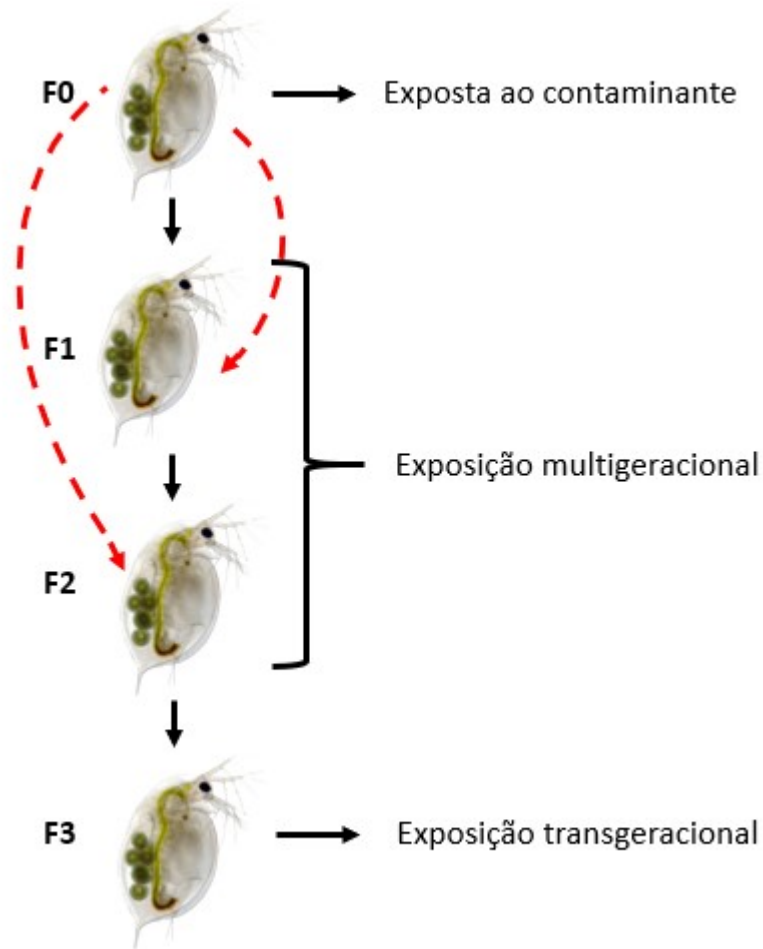


Figura 4: Representação esquemática de testes multigeracionais e transgeracionais.

Uma grande vantagem da *Daphnia* em relação a outros organismos usados em testes toxicológicos é a homologia de genes que têm com os humanos (Siciliano, Gesuele et al. 2015). Para além de ser o invertebrado com maior número de genes, compartilha com os humanos aproximadamente 90,4% de genes modelo (Colbourne, Pfrender et al. 2011).

Tal como referido na seção 1.2, o recetor RXR é um regulador de adipogénese e também está presente na *Daphnia*. Sabe-se que este recetor é ativado quando em contacto com o tributilestanho, o obesogénio de referência (Wang, Wang et al. 2007, Wang and LeBlanc 2009).

## Capítulo 2 - Objetivo

Atualmente, existem muitos compostos identificados com obesogênicos, no entanto, ainda existem muitas lacunas importantes, nomeadamente na identificação de misturas de compostos com potencial obesogénico e na avaliação de exposições que reflitam o cenário real a que os organismos, incluindo humanos, estão expostos diariamente.

Assim, esta dissertação tem como objetivo estudar o efeito da exposição a produtos de uso quotidiano, nomeadamente bijuteria e comparar os resultados obtidos com a exposição ao obesogénio modelo, o TBT. Para tal será usado como organismo modelo o invertebrado *Daphnia magna*.

## Capítulo 3 - Métodos

### 3.1. Manutenção das culturas de *Daphnia magna*

Os organismos adultos foram mantidos em meio ASTM (20 organismos em frascos com 800mL de meio) em câmaras climáticas com uma temperatura constante de 20°C ( $\pm 2^\circ\text{C}$ ), com períodos de 16 horas de luz e 8 horas de escuro. As culturas foram alimentadas todos os dias com a alga *Raphidocellis subcapitata* a uma concentração de  $3,05 \times 10^5$  células/mL/*daphnia* e suplementado com extrato de alga filtrado (4,8 mL). Cada cultura foi iniciada a partir de neonatos da terceira à sexta ninhada. Paralelamente, pelo menos 5 *Daphnias* foram mantidas isoladas em recipientes com 100mL para contagem do número de neonatos por forma a aferir a saúde da cultura. Antes da realização dos ensaios, *Daphnias* da cultura stock foram isoladas em recipientes com 100mL de meio e os neonatos da 3<sup>a</sup> à 6<sup>a</sup> ninhada foram usados nos testes.

### 3.2. Validação dos testes de toxicidade

Para avaliar a saúde da cultura e para validar os testes realizados, é necessário a realização periódica de um teste de toxicidade aguda com um tóxico de referência. De acordo com a norma da OECD, foi utilizado o dicromato de potássio. Para a realização do teste do dicromato foi necessário preparar uma primeira solução stock de  $100 \text{ mg.L}^{-1}$  de  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$  (AnalaR NORMAPUR®, grau de pureza  $\geq 99,8\%$ ), em ASTM *Hard Water*.

A partir desta primeira solução stock, procedeu-se a preparação de uma nova solução stock ( $10 \text{ mg.L}^{-1}$ ). Cada solução de trabalho foi preparada num balão volumétrico de 50 mL, a partir da solução stock de  $10 \text{ mg.L}^{-1}$ , adicionando o respetivo volume de  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$  e perfazendo o volume restante com ASTM *Hard Water*. Depois da preparação de cada solução de trabalho, procedeu-se à transferência da solução do balão volumétrico para um copo de vidro de 100 mL, a partir do qual 10 mL são pipetados para os respetivos poços nas placas *multiwell* de 6 poços. São realizadas 5 réplicas com 5 *Daphnias* com menos de 24 horas de idade por réplica (ie, 5 *Daphnias* por poço, 5 poços por concentração).

No final, quaisquer soluções excedentes foram descartadas no recipiente apropriado (resíduos de metais) e todo o material utilizado foi descontaminado num banho ácido ( $[\text{HNO}_3] = 10\%$ ) durante 48h.

### 3.3. Avaliação da toxicidade

#### 3.3.1. Toxicidade aguda

Todos os testes de toxicidade aguda foram realizados seguindo a norma 202 da OECD (OECD/OCDE 2004). Foram utilizados neonatos com menos de 24h provenientes de um stock de *Daphnias* adultas saudáveis e usando apenas neonatos da terceira à sexta ninhada.

Para cada ensaio foram realizadas pelo menos 4 réplicas com no mínimo 5 concentrações e um controlo. Em cada concentração, foram colocadas 5 *Daphnias* com o mínimo de 2 mL de volume por cada *Daphnia*, ou seja, 5 *Daphnias* em 10 mL de volume para cada concentração testada. Os testes foram realizados a uma temperatura constante de  $20^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ , com um fotoperíodo de 16 horas de luz e 8 horas de escuro e sem alimentação durante 48h (OECD/OCDE 2004).

Às 24h e 48h foram registadas as *Daphnias* imóveis. A imobilização é caracterizada pela falta de mobilidade pelo menos durante 15 segundos. Segundo a norma 202 o teste é validado se a imobilização no grupo de controlo não ultrapassar 10%, se nenhum organismo tiver sinal de stress ou doença (*Daphnias* descoloradas) e, também, se o animal em teste não apresentar nenhum comportamento estranho, como por exemplo, os neonatos estarem a nadar “presos” à superfície do meio (OECD/OCDE 2004).

##### 3.3.1.1. Toxicidade aguda - TBT

O teste agudo de TBT (Aldrich, CAS: 1461-22-9, pureza: 96%) foi realizado com 5 réplicas, com 2 concentrações de TBT ( $0,1 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  e  $1,0 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) e 2 controlos, um negativo (baixa quantidade de comida) e um positivo (elevada quantidade de comida).

Estes testes foram realizados segundo o protocolo previamente descrito por Jordão et al (2015) para o qual os ensaios foram realizados não com neonatos mas com “adolescentes” no final do 3º instar. Os neonatos com menos de 24h foram colocados em placas *multiwell* de 6 poços, em cada poço foram colocadas 5 *Daphnias* com 10 mL de solução teste. Durante aproximadamente 72h, os neonatos foram mantidos em meio ASTM *HARD Water* e foi fornecida comida em excesso e extrato de alga filtrado, exceto para os animais correspondentes ao controlo negativo (baixa quantidade de comida). Durante este período foram monitorizadas as horas a que os neonatos deram a carapaça. No 3º dia de vida e 4 a 8h antes das *Daphnias* darem a 3ª carapaça foi iniciado o teste, e os organismos foram colocados em contacto com o contaminante durante 48h nas condições descritas na secção anterior (sem qualquer acesso a alimentação). As concentrações utilizadas foram  $0,1 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  e  $1,0 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  de TBT e 2 controlos, sendo que o controlo negativo foi o grupo que desde a eclosão até à hora de realização do teste não foi alimentado com comida em excesso.

### 3.3.1.2. Visualização dos lípidos

Depois de registrar a imobilização das *Daphnias*, procedeu-se à realização do protocolo para visualização dos lípidos através de fluorescência. O fluorocromo utilizado foi o *Nile red* (CAS 7385-67-3, Sigma-Aldrich) que tem como comprimento de onda de excitação 530 nm e de emissão de 590 nm. No fim do teste agudo (após 48h), as *Daphnias* foram colocadas 1h em contacto com o *Nile red*. Ao fim desse tempo, os lípidos foram observados no microscópio confocal (Zeiss LSM 710), com uma ampliação de 10x (EC Plan-Neofluar) e um laser de 488 nm. A aquisição das imagens foi feita com o programa Zen Black 2010. Para cada condição foram estudadas três dáfrias, tendo assim sido tiradas três fotografias (em animais diferentes) para cada tratamento.

A quantificação da fluorescência foi realizada nas imagens capturadas com o Software Fiji (versão 1.52i). A fluorescência foi quantificada numa área predefinida e idêntica para todas as imagens (altura de 424 pixels e largura de 464 pixels), tal como ilustrado na figura 5. Os resultados foram expressos em valores médios de fluorescência para cada três *Daphnias*.

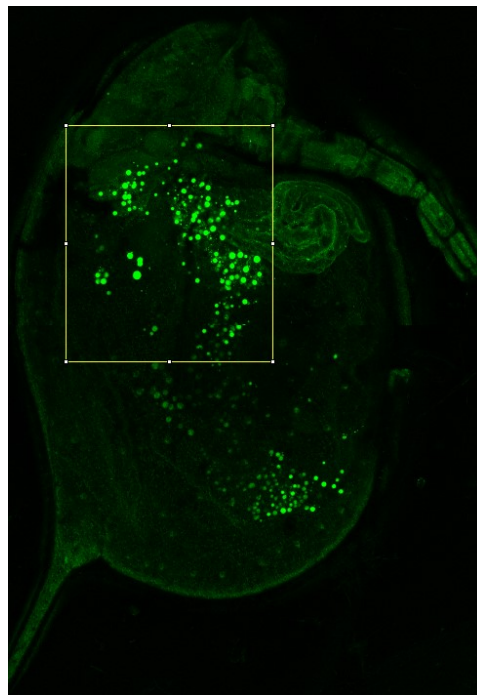


Figura 5: Visualização dos lípidos em *Daphnia magna* com a coloração de *Nile red*. A área delimitada pelo retângulo amarelo corresponde à área onde foi quantificada a fluorescência.

### 3.3.1.3. Toxicidade aguda - Bijuteria

#### 3.3.1.3.1. Preparação das soluções teste

As soluções teste foram preparadas a partir de uma solução stock de “extrato” de bijuteria comercial. A bijuteria foi colocada em meio ASTM, e a solução obtida após 12 h de agitação contínua foi considerada como solução Stock (Concentração= 100%). Por motivos logísticos foram preparadas duas soluções distintas de bijuteria, uma para a realização dos primeiros testes agudos, comprada numa loja especializada em bijuteria (Fig. 6), e uma segunda, para os testes crónicos, preparada em quantidade muito superior a partir de bijuteria comprada numa superfície comercial generalista (Fig. 7).



Figura 6: Exemplo de bijuteria utilizada para o ensaio A (teste toxicidade aguda).



Figura 7: Exemplos de bijuteria utilizada para o ensaio B (testes de toxicidade aguda e crónica).

### 3.3.1.3.2. Ensaio A

Neste primeiro ensaio, a bijuteria foi pesada (11626,8 mg) e colocada num litro de meio ASTM *Hard Water* que ficou em agitação constante no escuro durante 12 horas (numa placa de agitação, com um agitador magnético). Após as 12 horas de agitação, a solução obtida ([Stock A]=100%) foi separada da bijuteria. Neste dia foi realizado o primeiro teste agudo.

A partir da solução stock A foram preparadas as soluções de trabalho com as concentrações de 15%, 25%, 50%, 75% e 80%, pipetando o respetivo volume da Solução Stock A e aferindo o volume de 50 mL com meio ASTM *HARD Water* para cada concentração. Depois de cada solução de trabalho preparada, foram pipetados 10 mL para cada poço.

O resto da Solução Stock A que não foi utilizada foi preservada a -20 °C para posterior quantificação dos metais.

Tal como foi realizado para o ensaio agudo de TBT, com 3 dias de antecedência foram separadas *Daphnias* (da terceira ninhada) com menos de 24h, que foram mantidas em placas *multiwell* de 6 poços. As *Daphnias* foram alimentadas todos os dias com alta quantidade de comida e suplementadas com extrato de alga filtrado, com exceção de uma placa correspondente ao controlo negativo que foi alimentada com a quantidade normal de alga. Durante este período foi monitorizada a hora a que elas deram a carapaça. Quatro a oito horas antes de darem à terceira carapaça foi iniciado o teste com as soluções de bijuteria preparadas de fresco.

Todo o procedimento posterior foi realizado tal como para o teste agudo do TBT descrito anteriormente.

### 3.3.1.3.3. Ensaio B

Este segundo ensaio foi realizado com o objetivo de realizar também um teste crónico. Assim foi necessário preparar 15L de “solução Stock de bijuteria ([Stock B]=100%)”. Por tal, foram preparados por três vezes 5L de Stock B, usando a mesma quantidade de bijuteria que para o Stock A (i.e., 11626,8 mg/L, ou seja, 56126 mg para 5 L). As condições de agitação foram idênticas às da preparação do Stock A (12 horas em agitação ao escuro). No final a solução foi armazenada num jerricã de 25L à temperatura ambiente e uma alíquota de 50 mL foi separada e congelada de imediato para ser utilizada posteriormente para a quantificação de metais.

Todo o procedimento foi realizado tal como o ensaio anterior, sendo que, neste ensaio foram preparadas 5 réplicas com as concentrações de 12,5%, 25%, 50%, 75% e 100%.

### 3.3.2. Toxicidade Crónica

Os testes de toxicidade crónica foram realizados segundo a norma 211 da OECD (OECD/OCDE 2012). Este teste tem como objetivo verificar como é que um determinado contaminante ambiental em diferentes concentrações afeta a reprodução de *Daphnia magna*, durante 21 dias. Para a realização deste teste são utilizados neonatos de *Daphnia magna*, com menos de 24h, que são retirados de uma cultura “mãe” de ninhadas da N2 à N6. Os testes são realizados a uma temperatura constante de  $20^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  e com um fotoperíodo de 16 horas de luz e 8 horas de escuro. Durante os 21 dias, ao contrário do que acontece com os testes agudos, a renovação do meio e/ou solução teste é realizada de dois em dois dias com ASTM HARD Water suplementado com extrato de alga filtrado. As *Daphnias* são alimentadas com  $3,05 \times 10^5$  células/mL/*daphnia* de alga concentrada (*R. subcapitata*). A mudança de meio é feita com a ajuda de uma pipeta de Pasteur para facilitar a transferência das *Daphnias* de um copo para outro. O teste crónico é válido se a mortalidade no grupo de controlo não ultrapassar os 20% e quando o número médio de descendentes por progenitor for superior a 60.

Para além da monitorização da reprodução, é possível com estes testes verificar o crescimento das *Daphnias*, ao longo dos 21 dias, a partir da medição do exopodito. Em cada ninhada, depois do nascimento dos neonatos, a *Daphnia* adulta liberta a carapaça que é retirada e vista ao microscópio para medição do exopodito (Figura 8). O tamanho da *Daphnia* é extrapolado a partir da equação:

$$y = mx + b \Leftrightarrow y = 10.499x - 0.329$$

Onde  $y$  é o tamanho da *Daphnia* e  $x$  é o tamanho do exopodito (Pereira, Marques et al. 2004).

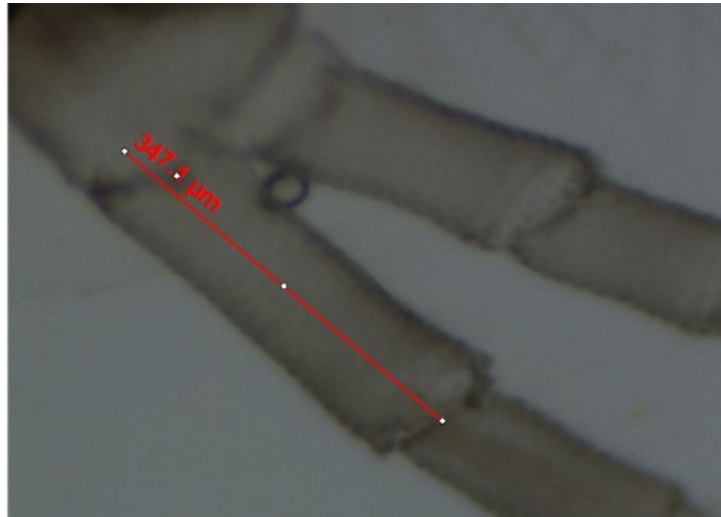


Figura 8: Medição do exopodito com uma ampliação de 5x.

As fotografias foram tiradas numa câmara Nikon SMZ 745T Modelo C-LEDS com fonte de imagem DFK 72AUC02. Foi usado o programa IC Capture 2.4 para fazer o registo (tamanho de vídeo e formato de cor RGB24 (1280x960), 7,50 FPS, ficheiro BMP com profundidade de 24 bits) com ampliação de 5x.

A medição do exopodito, foi realizada, com o software Axiovision SE64 Rel. 4.9.1. Inicialmente foi realizada uma calibração com uma lâmina de régua de microscópio de 0,5 mm, com a lupa na ampliação de 5x e com uma calibração consistindo na medição de 500  $\mu\text{m}$  (0,7903  $\mu\text{m}/\text{pixel}$  nos eixos  $xx$  e  $yy$ ). Cada exopodito é medido três vezes, usando em cada nova fotografia a calibração anterior definida.

### 3.3.2.1. Toxicidade Crónica Bijutaria

Tal como descrito na secção 3.3.1.3.1, depois de adquirida, a bijuteria foi pesada, colocada em meio ASTM *hard water* e mantida em agitação durante 12h. Como para a realização deste teste foi necessária uma quantidade grande de meio foi necessário repetir este processo 3 vezes para obter um volume total de 15L. Os 15L foram mantidos num jerrican de 25L e utilizados para a mudança de meio que foi efetuada de 2 em 2 dias.

As concentrações utilizadas para este teste foram de 12,5%, 25%, 50%, 75% e 100%. Durante 21 dias, foram mantidas 10 *Daphnias* para cada concentração individualizadas em copos de 100 mL com 50 mL da solução de teste respetiva. O objetivo da realização deste teste é verificar como é que a bijuteria afeta a reprodução, o crescimento (tal como descrito na secção anterior) e a acumulação de lípidos.

### 3.4. Análise de metais

Em cada teste agudo de bijuteria, depois de preparadas as soluções, foi preservada uma alíquota de 50 mL da solução Stock de bijuteria a -20 °C (solução inicial) em *falcons metal free* para posterior análise de metais.

A análise foi realizada no Departamento de Geociências da Universidade de Aveiro (DGeo) por *ICP-MS* (Espectrometria de massa por plasma indutivamente acoplado) após acidificação das amostras com  $\text{HNO}_3$ , seguindo os protocolos de rotina do laboratório de geoquímica do DGeo.

Foram analisados os seguintes metais: prata, alumínio, cádmio, crómio, cobre, manganês, zinco e ferro. O limite de deteção foi de  $1 \mu\text{g.L}^{-1}$  para o crómio, cobre e manganês. A prata teve um limite de deteção de  $0.3 \mu\text{g.L}^{-1}$ , o alumínio de  $2.5 \mu\text{g.L}^{-1}$ , para o cádmio e o zinco o limite de deteção foi de  $4 \mu\text{g.L}^{-1}$  e para ferro foi de  $10 \mu\text{g.L}^{-1}$ .

## Capítulo 4 - Resultados

### 4.1. Teste do Dicromato de potássio

A OECD considera que o dicromato de potássio deve ser utilizado como um tóxico de referência para avaliar o fitness da cultura de *D. magna*. O valor de EC<sub>50</sub> para as 24h deve situar-se entre 0,6 e 2,1 mg/L, sendo que este teste se deve realizar pelo menos duas vezes por ano (OECD/OCDE 2004).

O teste foi realizado a 6 de Outubro de 2019 e o valor de EC<sub>50</sub> obtido foi de 1,714 mg.L<sup>-1</sup> com um erro de  $1,205 \times 10^{-9}$ . Desta forma foi possível confirmar o *fitness* das *Daphnias* e validar a sua utilização.

### 4.2. Teste de toxicidade aguda - TBT

As *Daphnias* foram expostas a duas concentrações de TBT (0,1 mg.L<sup>-1</sup> e 1,0 mg.L<sup>-1</sup>), tal como sugerido por Jordão, Casas et al. (2015). Foram utilizadas apenas duas concentrações, uma vez que este teste foi realizado com o objetivo de fornecer dados relativos ao obesogénio modelo que pudessem servir como comparação para os resultados obtidos com a bijutaria.

Nas concentrações realizadas, não obtivemos qualquer imobilização tanto às 24h como às 48h, pelo que podemos concluir que o TBT a uma concentração de 0,1 mg.L<sup>-1</sup> e de 1,0 mg.L<sup>-1</sup> não induz mortalidade em *D. magna*.

Após 48h de exposição a TBT, foi avaliada a acumulação lipídica nas *Daphnias* (figura 9). Tal como pode ser observado na figura 10 houve um aumento da acumulação lipídica nas *Daphnias* alimentadas em excesso face às *Daphnias* com alimentação “normal”. Tal como era esperado, o controlo negativo é o grupo com menor quantidade de lípidos nas *Daphnias*, logo de seguida vemos um aumento para o dobro do controlo negativo para o controlo positivo. Houve também um aumento na quantidade de lípidos com as concentrações crescentes de TBT. No entanto, não se registaram diferenças estatisticamente significativas entre os diferentes tratamentos (Teste Kruskal-Wallis,  $p=0,32$ ). Podemos, no entanto, ver um aumento ligeiro na concentração de 0,1 mg.L<sup>-1</sup> em comparação com o controlo positivo. A concentração de 1,0 mg.L<sup>-1</sup>, que é a concentração mais alta, tem, tal como era de esperar, a maior quantidade de lípidos. De facto, face ao controlo positivo, as *Daphnias* expostas a 1,0 mg.L<sup>-1</sup> de TBT acumularam praticamente o dobro dos lípidos.

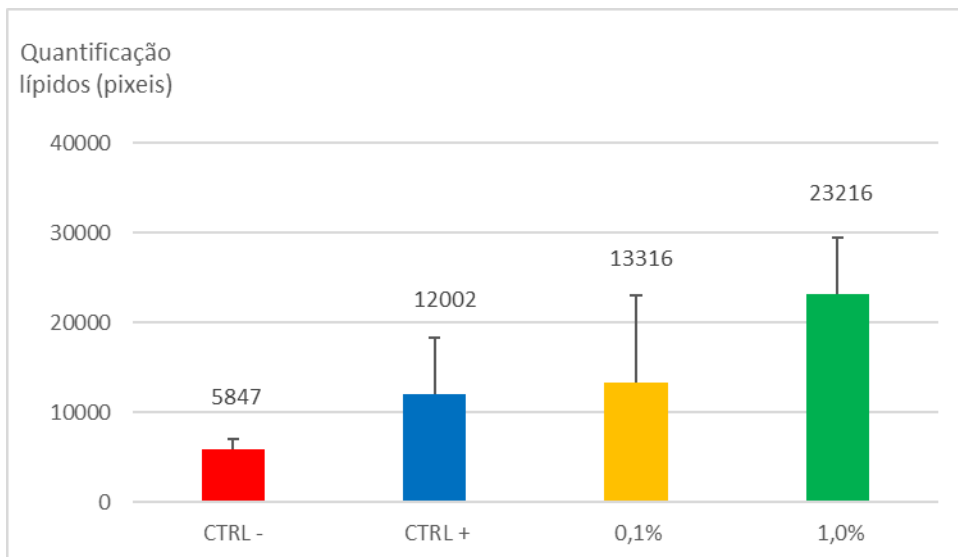


Figura 9: Quantificação dos lípidos (em pixéis) para o teste agudo do TBT. As colunas correspondem à medida dos pixéis observados em 3 *Daphnias* por cada tratamento e as barras correspondem ao desvio padrão.

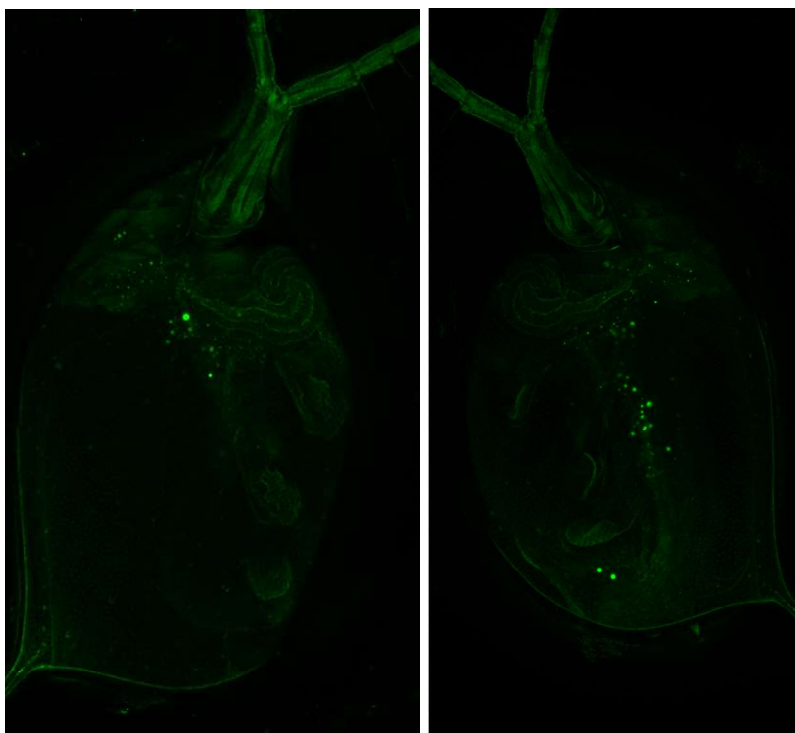


Figura 10: Fotografias de microscopia eletrónica confocal evidenciando as acumulações lipídicas (marcadas a verde). A imagem do lado esquerdo representa uma *Daphnia* não exposta a TBT (Controlo positivo) e a imagem, do lado direito corresponde a uma *Daphnia* exposta a uma solução com uma concentração de  $1.0 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ .

### 4.3. Teste de toxicidade aguda - Bijuteria

#### 4.3.1. Ensaio A

Neste ensaio, as *Daphnias* foram expostas às seguintes diluições da Solução Stock A: 15%, 25%, 50%, 75% e 80%. A figura 11 descreve os resultados em termos de imobilização obtidos às 24 e 48 h. É notório um aumento da mortalidade nas concentrações mais elevadas (a partir de 50%), sendo que na concentração mais elevada testada (80%), houve uma mortalidade de 100% para as 48h.

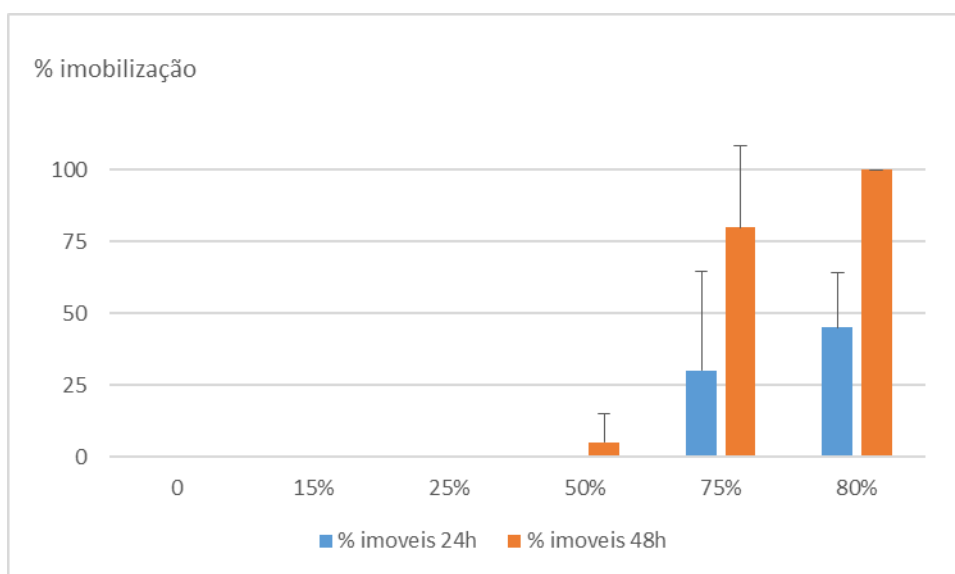


Figura 11: Percentagem de imobilização para o teste agudo da bijuteria às 24h (a azul) e 48h (a laranja).

No final da exposição (48h), as *Daphnias* são coradas com *nile red* para posterior quantificação dos lípidos. Na figura 12 encontram-se os resultados obtidos.

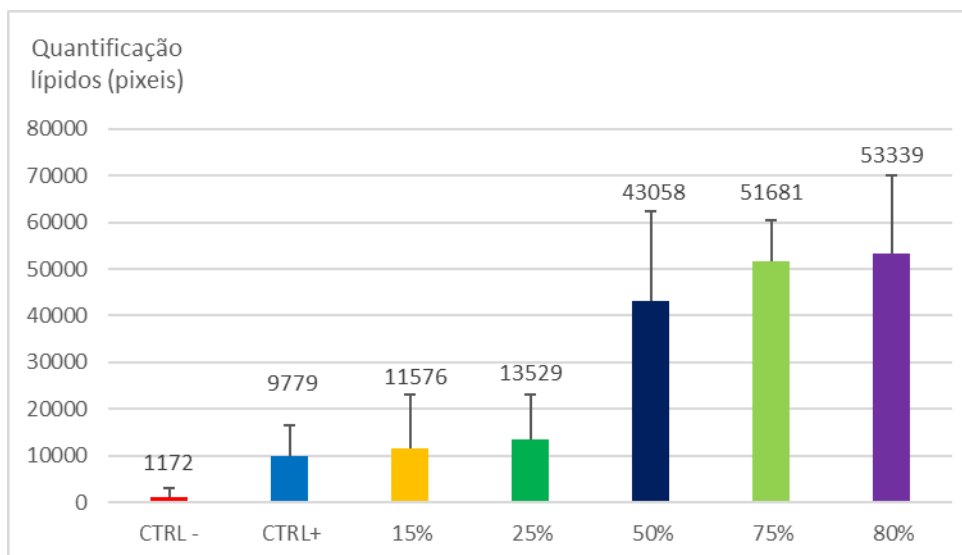


Figura 12: Quantificação dos lípidos (em pixéis) para o teste agudo de bijutaria (ensaio A). As colunas correspondem à medida dos pixéis observados em 3 *Daphnias* por cada tratamento e as barras correspondem ao desvio padrão.

De uma forma geral, o controlo negativo é o grupo com menor quantidade de lípidos medido, seguido do controlo positivo.

Para as concentrações de “solução de bijutaria” testadas, conseguimos ver um aumento ao longo do aumento das concentrações testadas. A maior quantidade de lípidos foi registada na concentração de 80% e existe uma clara diferença entre a quantidade de lípidos nos animais expostos a baixas concentrações e altas concentrações figura 13. Registaram-se diferenças significativas entre os controlos (quer negativo quer positivo) e as diluições de 50%, 75% e 80%, sendo que essa diferença foi muito significativa ( $p < 0,01$ ) para o grupo exposto a 80% (Teste Tukey,  $p < 0,05$ ). Também se registaram diferenças significativas entre as concentrações mais baixas (15% e 25%) e as mais altas (50%, 75% e 80%).

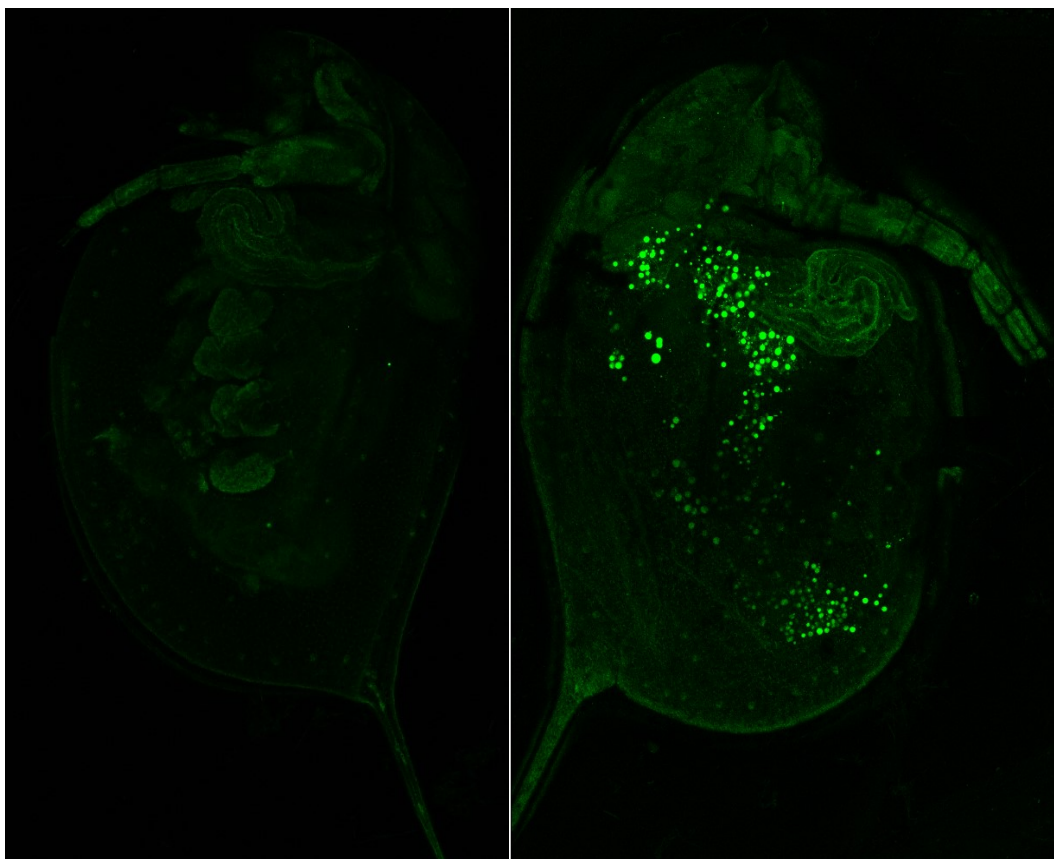


Figura 13: Fotografias de microscopia eletrónica confocal evidenciando as acumulações lipídicas (marcadas a verde). A imagem do lado esquerdo representa uma *Daphnia* exposta a uma solução de 15% de bijutaria e a imagem do lado direito corresponde a uma *Daphnia* exposta a uma solução de 80%.

#### 4.3.2. Ensaio B

Os resultados da toxicidade aguda para a bijutaria do ensaio B, demonstraram que estas soluções não induzem imobilização em *D. magna*. De facto, para todas as concentrações testadas (25%, 50%, 75%, 80% e 100%) nenhuma *Daphnia* se apresentou imóvel ao final de 24 e 48h.

Tal como no ensaio anterior, no final do teste (48h) as *Daphnias* foram coradas com *nile red* para a posterior quantificação dos lípidos (figura seguinte).

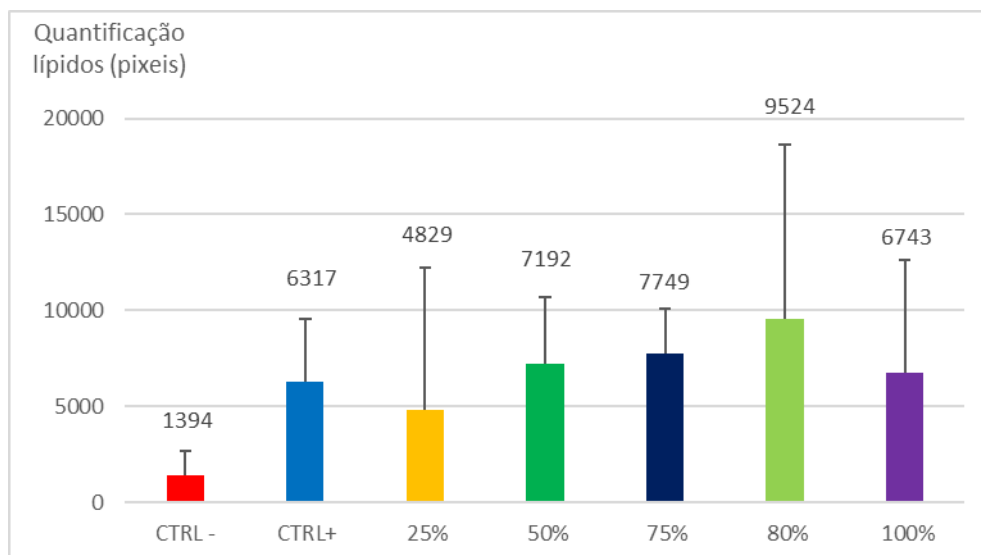


Figura 14: Quantificação dos lípidos (em pixéis) para o teste agudo de bijutaria (ensaio B). As colunas correspondem à medida dos pixéis observados em 3 *Daphnias* por cada tratamento e as barras correspondem ao desvio padrão.

Neste segundo ensaio, os resultados foram diferentes em relação ao ensaio A. Apesar do controlo negativo ter sido também o grupo com menos quantidade de lípidos, o controlo positivo apresentou em média maior quantidade de lípidos que os animais expostos a uma diluição de 25%. No entanto, é de salientar os desvios elevados observados para este grupo. De uma forma geral a acumulação lipídica segue a seguinte tendência: CTRL - < 25% < CTRL+ < 100% < 50% < 75% < 80%. O grupo exposto a 80% é aquele que apresenta maior quantidade de lípidos acumulada, mas mais uma vez existe uma grande variação entre os animais observados, como é visível pelos elevados desvios. Estas variações podem também explicar a ausência de diferenças significativas entre os vários tratamentos (Kruskal-Wallis,  $p=0,5344$ )

Tal como era de esperar, a diferença clara que vemos no ensaio anterior não é tão visível neste ensaio, tal como mostra a figura seguinte.

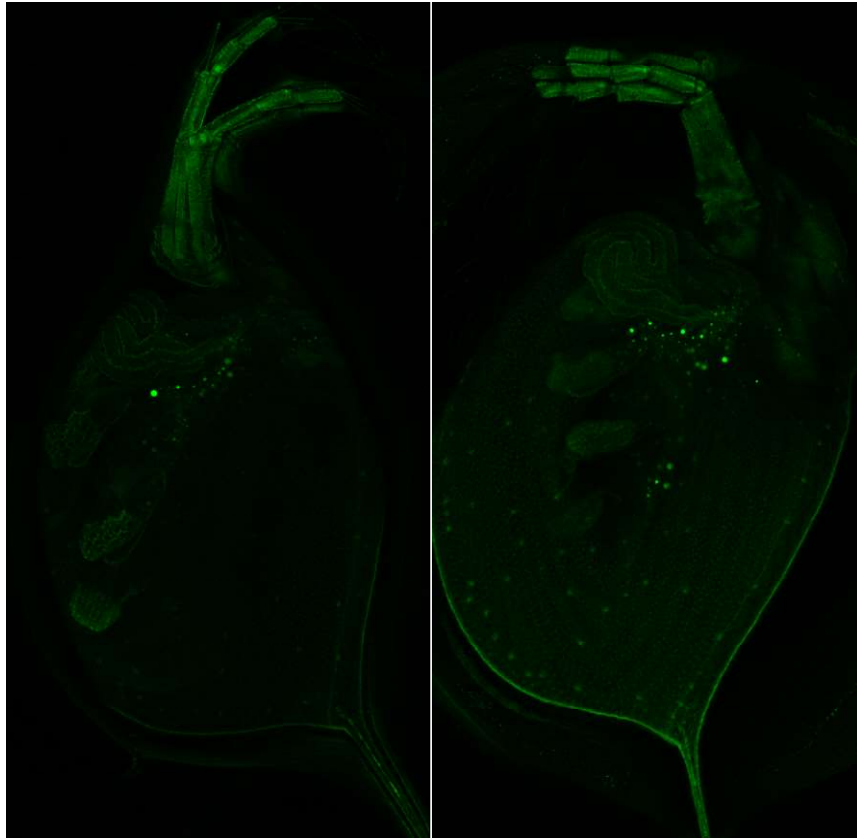


Figura 15: Fotografias de microscopia eletrónica confocal evidenciando as acumulações lipídicas (marcadas a verde). A imagem do lado esquerdo representa uma *Daphnia* não exposta a bijuteria (Controlo positivo) e a imagem do lado direito corresponde a uma *Daphnia* exposta a uma solução de bijuteria com uma concentração de 80%.

#### 4.4. Teste crónico - Bijuteria

O teste crónico da bijuteria foi realizado durante 21 dias, e os parâmetros medidos foram: mortalidade, reprodução, crescimento e quantidade de lípidos.

##### 4.4.1. Mortalidade

Apesar da mortalidade não ser um parâmetro normalmente medido no teste crónico, uma vez que é expectável não se obter mortalidade, neste teste tivemos mortalidade a partir do 8º dia nas concentrações mais elevadas.

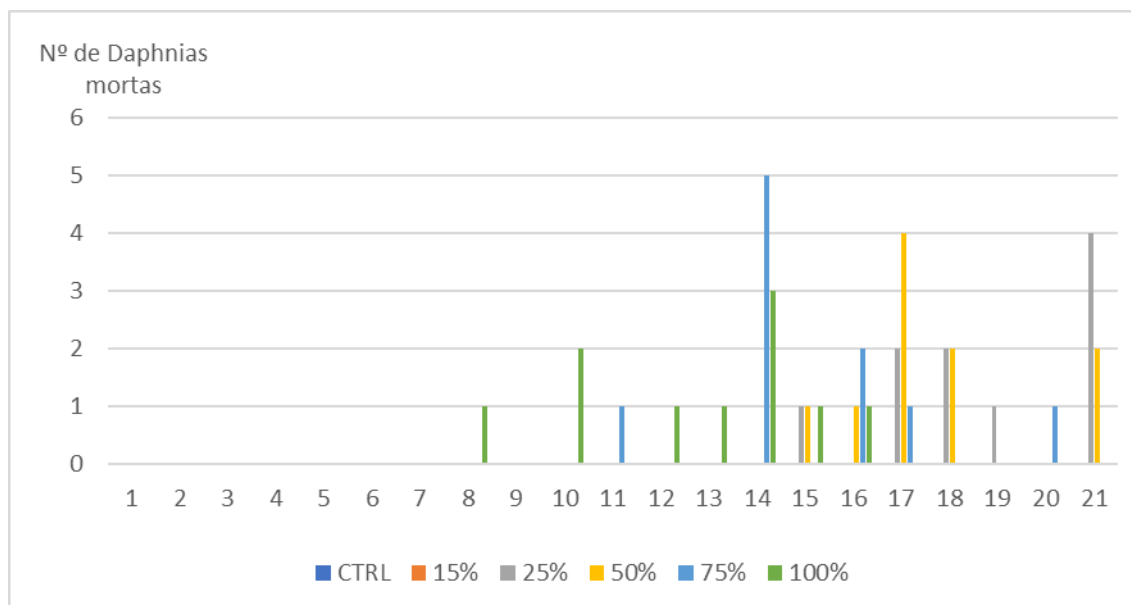


Figura 16: *Daphnias* mortas no teste crónico de bijuteria ao longo dos 21 dias.

Tal como podemos analisar na figura anterior (figura 16), a mortalidade foi acontecendo ao longo dos 21 dias, sendo que a primeira *Daphnia* morta foi ao 8º dia. Até ao final do teste, todas as *Daphnias* da concentração de 25%, 50%, 75% e 100% morreram, pelo que no final dos 21 dias, só sobreviveram as *Daphnias* da concentração de 12,5% e do controlo.

#### 4.4.2. Reprodução

Face aos resultados obtidos na sobrevivência das *Daphnias* e considerando que a mortalidade observada é dependente da concentração, foram contabilizadas o número total de neonatos em relação ao nº inicial de *Daphnias* tal como recomendado pelo protocolo 211 da OCDE. Os resultados obtidos encontram-se ilustrados na figura 17.

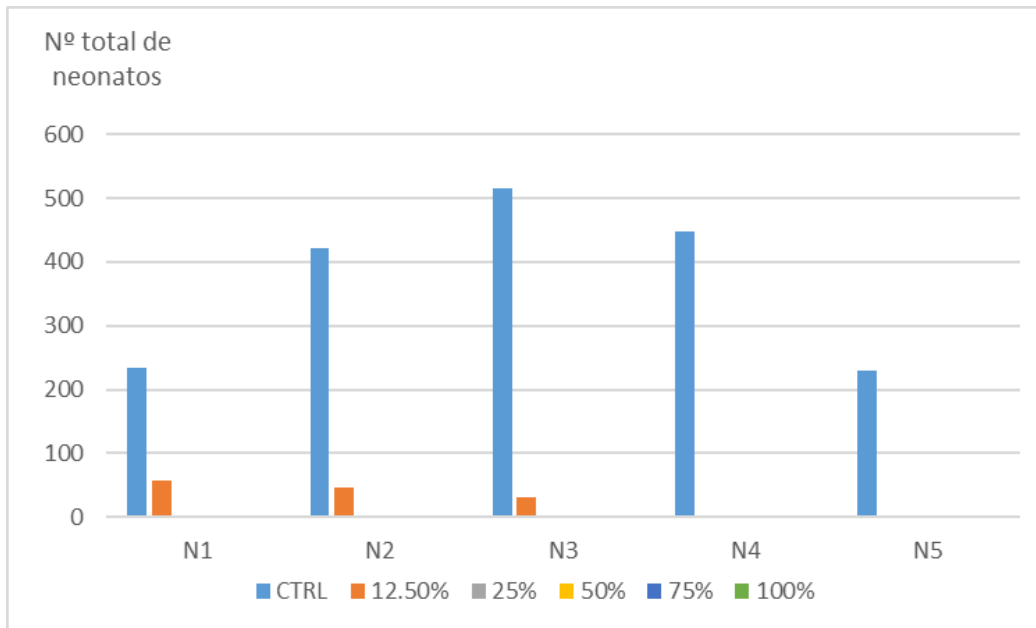


Figura 17: Número total de neonatos obtidos em cada tratamento.

Os resultados obtidos demonstram que existe claramente um comprometimento severo no sucesso reprodutivo das *Daphnias* expostas. De facto, à exceção da menor concentração testada (12,5%), não houve eclosão de neonatos vivos, indicando um comprometimento total na reprodução. Mesmo na menor concentração testada, o nº total de neonatos foi apenas de 4 *Daphnias* adultas, exceto na terceira ninhada que apenas uma *Daphnia* eclodiu. Em relação ao controlo o aumento do nº de neonatos foi progressivo ao longo das ninhadas, sendo que na última ninhada tivemos uma ligeira diminuição. A ninhada com maior número de neonatos foi a terceira.

### 4.4.3. Crescimento

Para este parâmetro apenas monitorizamos as *Daphnias* que vivas que deram neonatos, uma vez que a medição é realizada nas carapaças que são “largadas” pelas progenitoras após a eclosão das ninhadas. Os resultados obtidos estão ilustrados na figura 18.

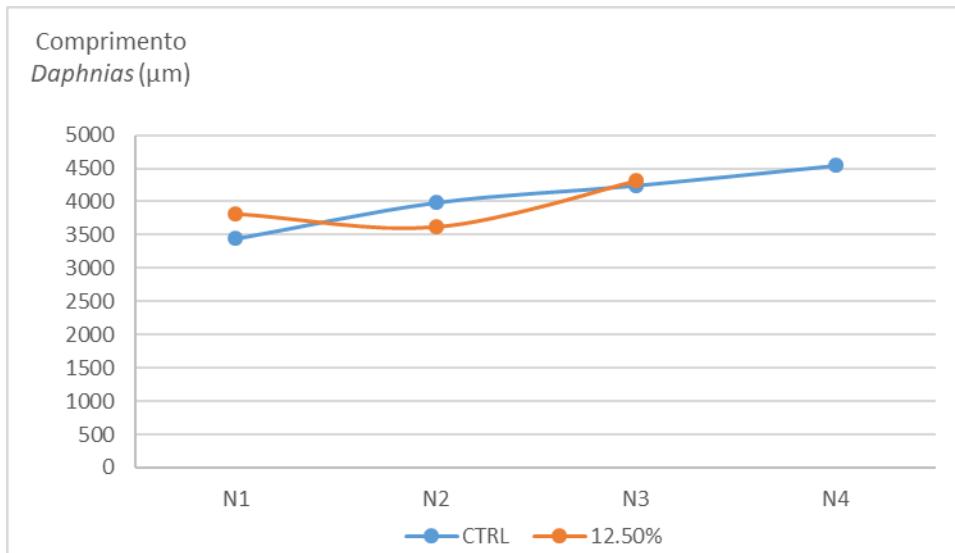


Figura 18: Comprimento médio da *Daphnia* ao longo das ninhadas para a concentração de 12,5% e para o controlo.

O grupo controlo teve um aumento do crescimento progressivo ao longo do tempo, atingindo o máximo na quarta ninhada (após 17 dias). Ao contrário do registado para o número de neonatos, o crescimento não foi superior para o grupo controlo tanto na primeira ninhada como na terceira ninhada. Para os animais expostos o efeito no crescimento foi subtil, tendo-se registado um ligeiro decréscimo após a 2ª ninhada (a partir do 14º dia) seguido de um ligeiro aumento após a eclosão da 3ª ninhada (ao 21º dia). Na 4ª ninhada não houve eclosão de neonatos pelo que o tamanho não foi medido.

#### 4.4.4. Quantificação dos lípidos

Depois dos 21 dias de teste, 5 *Daphnias* do grupo controlo e 12,5% (os únicos grupos com sobreviventes) foram coloradas com *nile red*, para a quantificação dos lípidos.

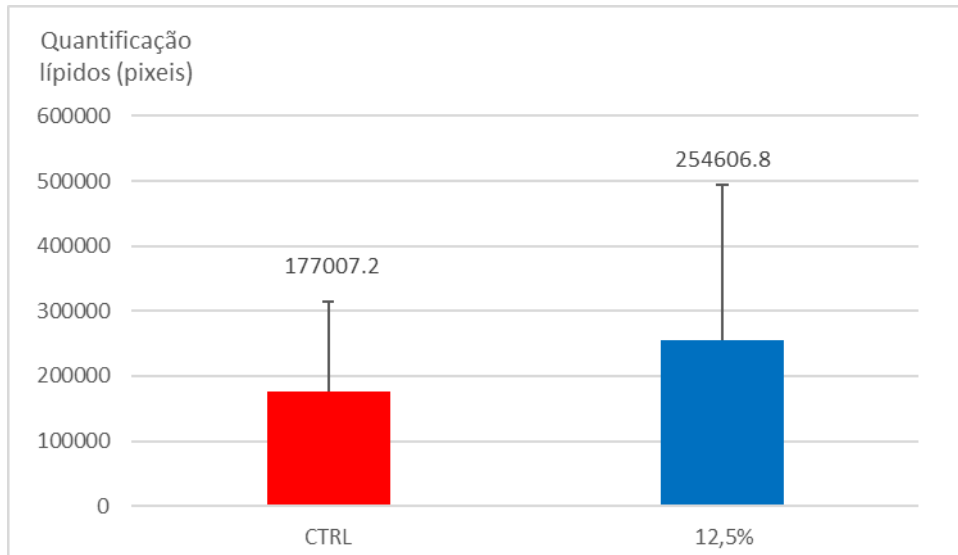


Figura 19: Quantificação dos lípidos (em pixéis) para o teste crónico de bijutaria (ensaio B). As colunas correspondem à medida dos pixéis observados em 5 *Daphnias* por cada tratamento e as barras correspondem ao desvio padrão.

Na figura 19, está representada a quantidade média de lípidos das *Daphnias* no controlo e na concentração de 12,5%. A exposição a uma concentração de 12,5% resultou numa maior acumulação de lípidos em relação ao controlo, no entanto esta diferença não foi estatisticamente significativa (Teste Mann-Whitney,  $p > 0,05$ ).

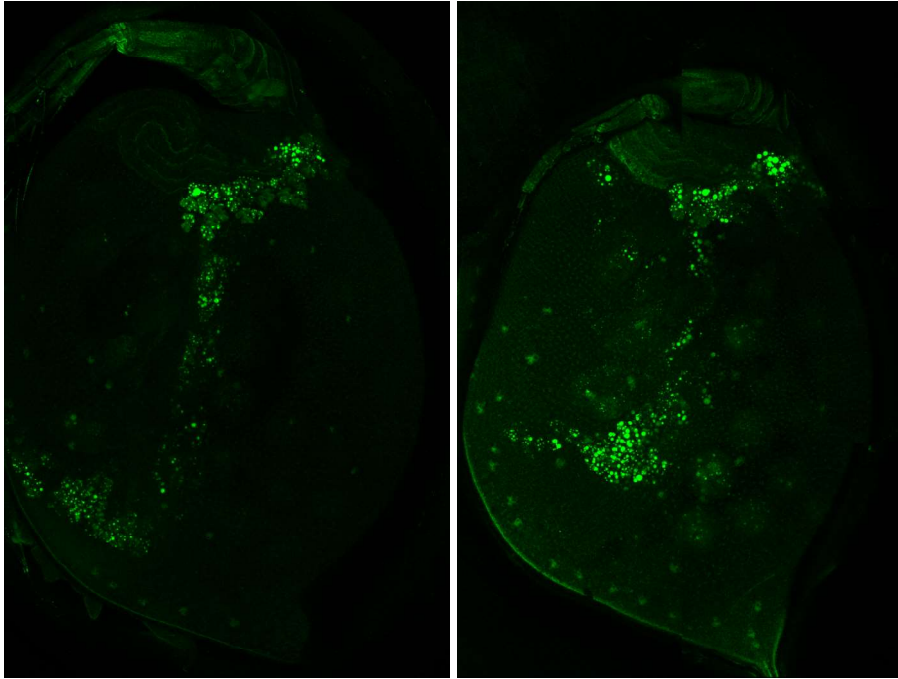


Figura 20: Fotografias de microscopia eletrónica confocal evidenciando as acumulações lipídicas (marcadas a verde). A imagem do lado esquerdo representa uma *Daphnia* não exposta a bijutaria (Controlo) durante 21 dias e a imagem do lado direito corresponde a uma *Daphnia* exposta durante 21 dias a uma solução de bijutaria com uma concentração de 12,5%.

## 4.5. Análise de metais

Os níveis de arsénio, titânio, chumbo, prata, alumínio, cádmio, crómio, cobre, manganésio, zinco e ferro foram quantificados nas soluções stock de bijutaria (Solução A e Solução B). Para ambas as amostras os valores de arsénio, titânio e chumbo estavam abaixo do limite de deteção ( $5 \mu\text{g.L}^{-1}$ ,  $1 \mu\text{g.L}^{-1}$  e  $2 \mu\text{g.L}^{-1}$ , respetivamente) e por esse motivo não serão discutidos. As figuras seguintes ilustram as concentrações de metais não essenciais e essenciais obtidos para cada uma das soluções teste.

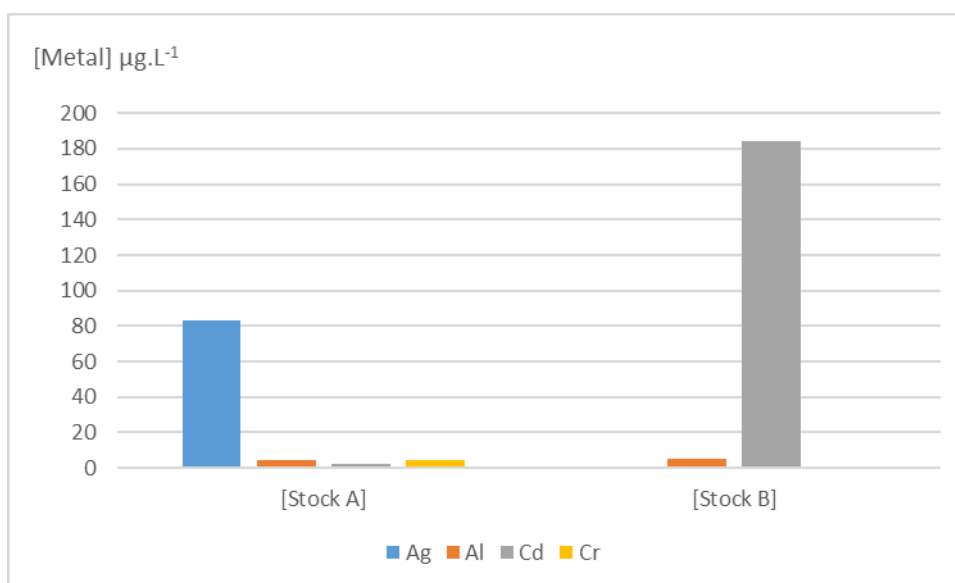


Figura 21: Concentrações de prata, alumínio, cádmio e crómio nas duas soluções de bijutaria usadas.

De uma forma geral, os níveis de prata foram superiores no Stock A e os níveis de cádmio foram superiores no Stock B. De facto, este metal não essencial foi aquele que apresentou níveis mais elevados comparativamente com os restantes. De salientar que para o Stock A, os níveis de cádmio estavam abaixo do limite de deteção (dl), tendo sido considerado para efeitos computacionais metade do valor de limite de deteção, e que para o Stock B tal sucedeu para o crómio.

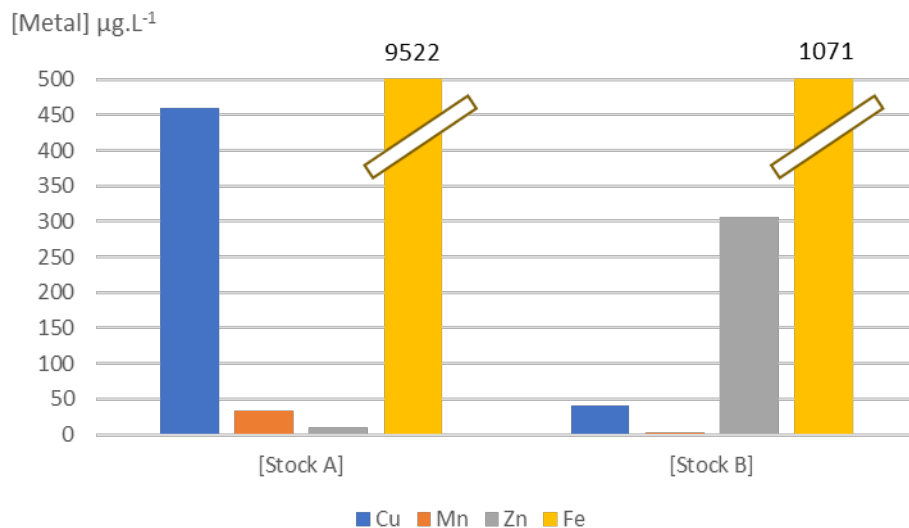


Figura 22: Concentrações dos metais essenciais cobre, manganésio, zinco e ferro nas duas soluções de bijutaria usadas.

Em relação aos metais essenciais, o ferro foi aquele que apresentou valores mais elevados com níveis uma ordem de grandeza acima dos restantes. De seguida destaca-se o cobre na solução A e o zinco na solução B.

De uma forma geral, é notória a diferença entre os dois lotes distintos de bijutaria utilizados com níveis e proporções relativas de cada metal muito diferentes.

## Capítulo 5 - Discussão

### 5.1. TBT

Os resultados da toxicidade aguda com TBT mostram que, nas concentrações utilizadas, não é observável qualquer imobilização tanto às 24h como às 48h, pelo que podemos concluir que o TBT a uma concentração de 0,1 mg.L<sup>-1</sup> e de 1,0 mg.L<sup>-1</sup> não induz mortalidade em *D. magna*. Estes valores estão de acordo com o valor de EC<sub>50</sub> (concentração que induz 50% de imobilização) para o TBT em neonatos de *D. magna* de 90 mg.L<sup>-1</sup> às 24h (Dobson, Howe et al. 2006).

O TBT é considerado um obesogénio de referência, e tal como já referimos na secção 1.2., este já foi testado em *Daphnia magna* em concentrações semelhantes às utilizadas neste trabalho. Pela análise da figura 9, é notório o aumento da quantidade de lípidos que é mais pronunciado nas concentrações mais elevadas de TBT (Figura 9 e 10). Já Jordão et al (2015) tinha verificado o mesmo padrão. Um dado interessante que podemos retirar também da figura 9, é que há um aumento notório da acumulação lipídica nas *Daphnias* alimentadas em excesso (Controlo positivo), *versus* *Daphnias* alimentadas com a quantidade normal de comida (controlo negativo). Apesar de inovadores, estes resultados são expectáveis uma vez que a acumulação lipídica (equivalente a "obesidade") está associada a um aumento do consumo de alimentos. Também é notório que quando comparado com o controlo positivo as *Daphnias* expostas a TBT aumentaram o conteúdo lipídico. Estes resultados fornecem evidências adicionais de que a exposição a contaminantes ambientais está associada à acumulação lipídica que pode ser traduzida em excesso de peso e/ou obesidade.

### 5.2. Bijuteria

A bijuteria foi o cenário real escolhido para avaliar o potencial obesogénico de um produto de uso quotidiano. A bijuteria está ao acesso de praticamente toda a população, sendo cada vez mais usada tanto por crianças, adolescentes e adultos, particularmente do sexo feminino.

#### 5.2.1. Testes agudos

Pela análise da figura 11, que foi o primeiro teste agudo que realizámos para a bijuteria podemos ver que houve uma imobilização mais forte às 48h e a partir da concentração de 75% e 80%. Estes resultados sugerem que "solução de bijuteria" do ensaio A afeta a saúde e a integridade dos neonatos de *Daphnia magna* testados. Depois da imobilização, um dos parâmetros mais importantes é a quantificação dos lípidos na *Daphnia* exposta a este cenário

real. Os resultados obtidos são muito interessantes, demonstrando que o aumento da bijuteria provoca um aumento dos lípidos (“obesidade”) nas *Daphnias* (figura 12). Mais uma vez, tal como no estudo do TBT, o controlo positivo teve um aumento dos lípidos em relação ao controlo negativo e a concentração mais alta foi a que teve uma maior quantidade de lípidos. A maior quantidade de lípidos surge a partir da concentração de 50%, em que a quantidade de lípidos aumenta para mais do dobro. A figura 23 mostra os resultados da acumulação lipídica normalizados ao controlo positivo das *Daphnias* expostas a bijuteria no ensaio A quando comparadas com os resultados obtidos para o obesogénio modelo ([TBT]= 1 mg.L<sup>-1</sup>, também normalizados ao respetivo controlo) é notório que a exposição a concentrações superiores a 50% induz um efeito muito superior ao do próprio obesogénio modelo.

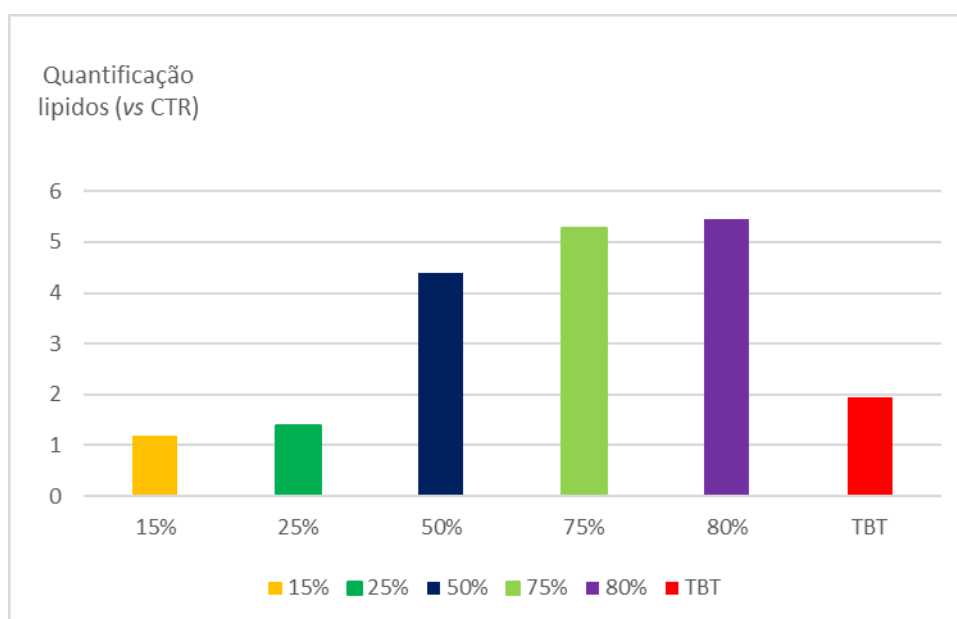


Figura 23: Resultados da avaliação do conteúdo em lípidos normalizados ao respetivo controlo positivo para as diferentes concentrações de bijuteria do Ensaio A comparados com o valor obtido para o obesogénio modelo ([TBT]= 1 mg.L<sup>-1</sup>) também normalizado ao respetivo controlo.

O segundo ensaio agudo realizado com a bijuteria, ensaio B, não teve os mesmos resultados que o primeiro. No primeiro parâmetro monitorizado, apesar das concentrações deste ensaio serem mais altas, não tivemos nenhuma imobilização, nem às 24 nem as 48h do teste. Ou seja, esta segunda bijuteria testada não afeta da mesma forma a saúde das *Daphnias* como a primeira.

Em relação ao parâmetro dos lípidos, a quantidade de lípidos não aumenta com o aumento da concentração da “solução de bijuteria”, sendo maior no controlo positivo do que negativo, tal como já tínhamos verificado para os outros testes agudos anteriores, mas não aumentando de uma forma clara com o aumento da concentração. Através da análise da figura 14, conseguimos perceber que a concentração de 25%, ao contrário do esperado, diminuiu a quantidade de lípidos. Ou seja, nesta bijuteria testada, a baixa quantidade “emagrece” as *Daphnias*. No entanto, este efeito deve ser analisado com cuidado devido aos elevados desvios observados. Outro dado importante é que apenas a partir dos 50% é que a quantidade de lípidos aumenta, até que na concentração de 100% esta quantidade é praticamente igual ao controlo positivo. Quando analisando os resultados normalizados aos respetivos controlos (figura 24), é bem patente que esta solução de bijuteria tem um potencial obesogénico inferior ao do TBT e muito inferior à bijuteria usada no Ensaio A. As diferenças dos resultados dos lípidos entre os dois ensaios, provam que diferentes tipos de bijuteria podem provocar diferentes efeitos no organismo testado.

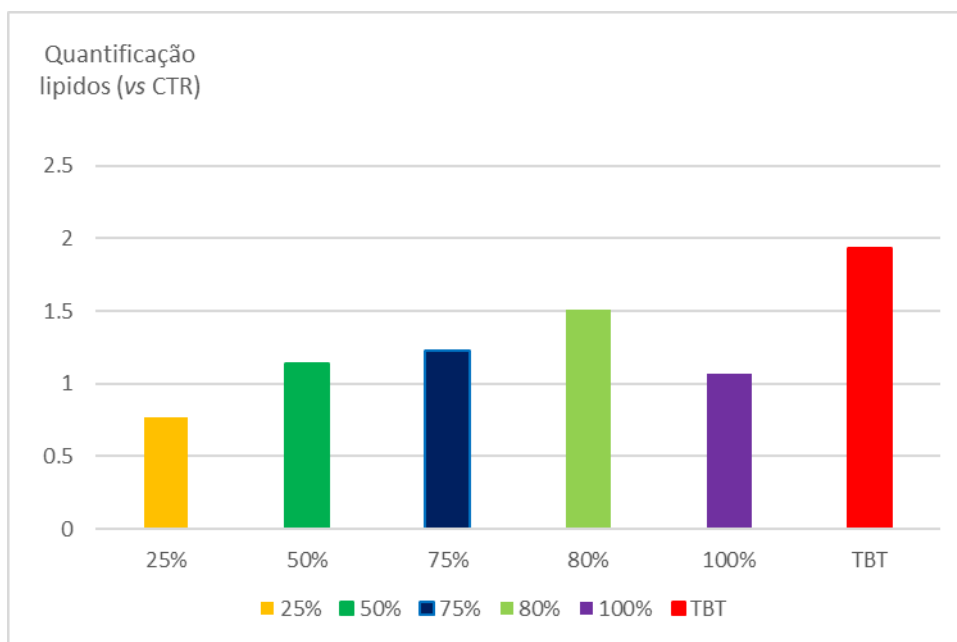


Figura 24: Resultados da avaliação do conteúdo em lípidos normalizados ao respetivo controlo positivo para as diferentes concentrações de bijuteria do Ensaio B comparados com o valor obtido para o obesogénico modelo ([TBT]= 1 mg.L-1) também normalizado ao respetivo controlo.

### 5.2.2. Teste crónico

O objetivo principal do teste crónico é verificar se um determinado contaminante em estudo afeta a reprodução e o crescimento das *Daphnias*. Para tal é necessário monitorizar os neonatos que nascem em cada concentração e registar o crescimento através da medição do exopodito. Para além destes parâmetros também quantificamos no final do teste (após 21 dias) os lípidos.

Através da análise da figura 16, conseguimos perceber que as *Daphnias* em estudo foram morrendo de forma gradual ao longo do teste, começando por morrer na concentração de 100% ao oitavo dia de teste até que no final dos 21 dias todas as *Daphnias* das concentrações de 100%, 75%, 50% e 25% se encontravam mortas.

Estes resultados mostram de forma clara que a exposição mais prolongada à “solução de bijuteria” afeta a integridade e saúde das *Daphnias*, pois apesar de não termos tido qualquer tipo de imobilização às 48h no teste agudo (ensaio B) uma exposição mais prolongada afetou a saúde das *Daphnias* provocando a sua morte.

Em relação à reprodução, esta também é muito afetada pela exposição à bijuteria. As concentrações de 25%, 50%, 75% e 100% que tiveram mortalidade de 100% no final do teste nunca deram neonatos. Um pormenor também muito relevante em relação às concentrações de 25% e 50% é que as *Daphnias* “davam à carapaça”, que estava cheia de ovos mas que nunca eclodiram (figura 25). Para as duas concentrações mais elevadas, as *Daphnias* em nenhuma altura do teste deram à carapaça. Assim, é possível concluir que a exposição a bijuteria afeta de uma forma substancial a reprodução. De salientar que mesmo para a concentração de 12,5%, para a qual eclodiram neonatos (figura 17), estes neonatos resultaram de 4 *Daphnias* de um total de 10 em estudo para a 1ª e 2ª ninhada (N1 e N2) enquanto que na 3ª ninhada resultarem apenas de uma *Daphnia*. Também nesta concentração as *Daphnias* largaram carapaças cheias de ovos e originando neonatos mortos (N3).



Figura 25: Carapaça com ovos no interior (ampliação 1x) resultante de uma de *Daphnia* exposta a uma concentração de 12.5%.

Outro parâmetro monitorizado foi o crescimento das *Daphnias* adultas ao longo dos 21 dias. Tal como já foi referido anteriormente, nas duas concentrações mais elevadas (100% e 75%) nenhuma *Daphnia* em estudo deu à carapaça e por isso apenas monitorizámos o crescimento para as *Daphnias* que deram neonatos, nos grupos controlo e 12,5%.

Na figura 18, podemos ver que no grupo controlo existe um aumento crescente do tamanho da *Daphnia* ao longo do tempo. Mas pela análise da concentração de 12,5%, ao longo das ninhadas, podemos perceber que as *Daphnias* não são muito afetadas, pelo menos não na mesma extensão que os parâmetros anteriores. No entanto, estes resultados são condicionados pelo nº muito limitado *Daphnias* medidas (apenas 4 em 10).

Relativamente à quantificação dos lípidos, foi apenas possível avaliar *Daphnias* que estavam vivas no final do teste. Os resultados demonstram que quantidade de lípidos é superior na concentração de 12,5% do que no controlo. A comparação com o obesogénico modelo não é possível visto não existirem dados para a acumulação lipídica em *Daphnias* expostas a TBT durante 21 dias.

### 5.3. Metais

A bijuteria tradicional é composta tipicamente por ouro ou prata, no entanto, a bijuteria de baixo custo raramente é de ouro ou prata e contém muitos outros metais tóxicos. A bijuteria de baixo custo pode conter cobre (o mais abundante), níquel, cádmio, chumbo, arsénio, antimónio, crómio, entre outras substâncias tóxicas (Guney and Zagury 2013). Os resultados obtidos demonstram metais como o arsénio e chumbo comumente encontrados neste tipo de artigos não foram detetados. No entanto níveis elevados de cádmio foram detetados nas soluções de bijuteria usada no ensaio B.

A tabela 5 resume os principais resultados das concentrações de metais nas soluções stock dos ensaios A e B, comparando com o valor de EC<sub>50</sub> descrito por Okamoto et al (2015) para a *Daphnia magna* (Okamoto, Yamamuro et al. 2015).

Tabela 4: Sumário das concentrações ( $\mu\text{g.L}^{-1}$ ) dos diferentes metais analisados por ICP-MS e valores de EC<sub>50</sub> ( $\mu\text{g.L}^{-1}$ ) reportados na literatura para os metais em questão (Decreto-Lei n.º 152/2017 2017). A laranja estão assinalados os valores acima do EC<sub>50</sub> e a itálico aqueles acima do máximo legal.

Metal	Ensaio A	Ensaio B	EC <sub>50</sub>	DL 235/2017
Ag	83,1	0,4	0,91	-
Al	4,59	4,87	3900	200
Cd	<ld	183,95	3,6	5
Cr	4,11	<ld	130	50
Cu	459,77	40,62	13	2000
Mn	32,99	2,51	9300	50
Zn	9,51	306,55	720	-
Fe	9521,99	1070,73	2300	200
Ni	32,12	2,27	650	-

Na tabela 4, podemos perceber que existem alguns metais que têm um valor muito superior ao EC<sub>50</sub> para a *Daphnia magna* (Imobilização, 48h), tornando-se assim tóxicos. Tal é o caso do ferro, com um EC<sub>50</sub> de 2300  $\mu\text{g.L}^{-1}$ , e com concentrações na solução stock entre 9521.99 e 1070.73  $\mu\text{g.L}^{-1}$ . Também para o cobre foram detetadas concentrações entre os 40.62 e os 459.77  $\mu\text{g.L}^{-1}$ , que excedem em muito o EC<sub>50</sub> da *Daphnia* que é de 13  $\mu\text{g.L}^{-1}$ . Relativamente aos metais não essenciais, a prata tem um valor de EC<sub>50</sub> de 0.91  $\mu\text{g.L}^{-1}$  e a “solução de bijuteria” do ensaio A contém 83.10  $\mu\text{g.L}^{-1}$ . Já o cádmio só foi quantificado na solução stock do ensaio B com valores também muito altos (183.95  $\mu\text{g.L}^{-1}$ ) quando comparados com o EC<sub>50</sub>

(3.6  $\mu\text{g.L}^{-1}$ ). Dada a disparidade dos resultados é nesta fase difícil interpretar os resultados de toxicidade aguda e crónica com base nos níveis de metais detetados nas soluções de bijutaria.

Na tentativa de perceber melhor os possíveis impactos destes níveis de metais fomos comparar os valores obtidos com os legislados para água para consumo humano (DL 235/2017).

O Decreto-Lei n.º 235/2017 de 7 de dezembro, define a concentração de alguns metais para a água destinada a consumo humano. Os nossos resultados demonstram que em comparação com os valores legislados apenas os metais ferro e cádmio apresentam níveis superiores nas soluções de bijutaria.

## Capítulo VI - Conclusão e perspectivas futuras

Com esta dissertação, conseguimos perceber que o produto de uso cotidiano escolhido (bijutaria) provoca efeitos letais e sub-letais em *Daphnia magna*, nomeadamente acumulação lipídica. Essa acumulação lipídica, que se considera um marcador de “obesidade” neste organismo é dependente da bijutaria em questão, podendo no caso do ensaio A apresentar uma curva dose resposta bem definida.

Os resultados obtidos são muito inovadores e extremamente pertinentes uma vez que se trata da primeira descrição científica dos efeitos obesogénicos da exposição a bijutaria.

De futuro pretende-se completar este trabalho com diferentes cenários de exposição através da variação da quantidade de alimento fornecido e de diferentes classes de produtos de consumo. Pretendemos ainda estudar os efeitos transgeracionais e multitransgeracionais deste tipo de produtos, tanto na obesidade como na mortalidade, reprodução e crescimento.

Os resultados obtidos reforçam o potencial da *D. magna* como organismo modelo para o estudo da obesogénese. Assim, de futuro, pretendemos continuar a avaliar o efeito de potenciais tratamentos da obesidade neste organismo modelo, incluindo por exemplo a estimulação magnética transcraniana, cuja avaliação preliminar de toxicidade aguda já foi realizada (dados não incluídos na presente tese, cf Anexo II) e cujos resultados preliminares são bastante encorajadores.

## Bibliografia

Antizar-Ladislao, B. (2008). "Environmental levels, toxicity and human exposure to tributyltin (TBT)-contaminated marine environment. a review. b\_antizar@hotmail.com." Environ Int **34**(2): 292-308.

ATSDR (2005). Toxicological profile for tin and tin compounds. U.S. Department of Health and Human Services: Public Health Service Agency for Toxic Substances and Disease Registry, Atlanta.

Barros, A. R., R. T. Mendes, G. C. Santos and A. C. Sousa (2014). "A história de um biomarcador de sucesso: o imposexo em gastrópodes como ferramenta de estudo no ensino experimental das ciências." Revista Captar: Ciência e Ambiente para Todos **5**(2).

Bownik, A. (2017). "Daphnia swimming behaviour as a biomarker in toxicity assessment: A review." Sci Total Environ **601-602**: 194-205.

Brown, R. E., A. M. Sharma, C. I. Ardern, P. Mirdamadi, P. Mirdamadi and J. L. Kuk (2016). "Secular differences in the association between caloric intake, macronutrient intake, and physical activity with obesity." Obes Res Clin Pract **10**(3): 243-255.

Brtko, J. and Z. Dvorak (2015). "Triorganotin compounds--ligands for "rexinoid" inducible transcription factors: biological effects." Toxicol Lett **234**(1): 50-58.

Calafat, A. M., X. Ye, L. Y. Wong, J. A. Reidy and L. L. Needham (2008). "Exposure of the U.S. population to bisphenol A and 4-tertiary-octylphenol: 2003-2004." Environ Health Perspect **116**(1): 39-44.

Camolas, J., M. Gregório, S. Sousa and P. Graça (2017). Obesidade: Otimização da Abordagem Terapêutica no Serviço Nacional de Saúde.

Chamorro-Garcia, R. and B. Blumberg (2019). "Current research approaches and challenges in the obesogen field." Frontiers in Endocrinology **10**: 167.

Chamorro-Garcia, R., B. M. Shoucri, S. Willner, H. Kach, A. Janesick and B. Blumberg (2018). "Effects of Perinatal Exposure to Dibutyltin Chloride on Fat and Glucose Metabolism in Mice, and Molecular Mechanisms, in Vitro." Environ Health Perspect **126**(5): 057006.

Cocci, P., G. Mosconi, A. Arukwe, M. Mozzicafreddo, M. Angeletti, G. Aretusi and F. A. Palermo (2015). "Effects of Diisodecyl Phthalate on PPAR:RXR-Dependent Gene Expression Pathways in Sea Bream Hepatocytes." Chem Res Toxicol **28**(5): 935-947.

Coelho, S. D., A. C. Sousa, T. Isobe, J.-W. Kim, T. Kunisue, A. J. Nogueira and S. Tanabe (2016). "Brominated, chlorinated and phosphate organic contaminants in house dust from Portugal." Science of The Total Environment **569**: 442-449.

Colbourne, J. K., M. E. Pfrender, D. Gilbert, W. K. Thomas, A. Tucker, T. H. Oakley, S. Tokishita, A. Aerts, G. J. Arnold and M. K. Basu (2011). "The ecoresponsive genome of *Daphnia pulex*." Science **331**(6017): 555-561.

Comissão Europeia (2018). "COMUNICAÇÃO DA COMISSÃO AO PARLAMENTO EUROPEU, AO CONSELHO, AO COMITÉ ECONÓMICO E SOCIAL EUROPEU E AO COMITÉ DAS REGIÕES."

de Carvalho Oliveira, R. and R. E. Santelli (2010). "Occurrence and chemical speciation analysis of organotin compounds in the environment: a review." Talanta **82**(1): 9-24.

Decreto-Lei n.º 152/2017 (2017). "Decreto-Lei n.º 152/2017, Alteração do regime da qualidade da água para consumo humano,."

DIRECTIVA 2010/63/UE DO PARLAMENTO EUROPEU E DO CONSELHO (2010). Relativa à protecção dos animais utilizados para fins científicos.

Dirinck, E., A. C. Dirtu, P. G. Jorens, G. Malarvannan, A. Covaci and L. F. Van Gaal (2015). "Pivotal Role for the Visceral Fat Compartment in the Release of Persistent Organic Pollutants During Weight Loss." J Clin Endocrinol Metab **100**(12): 4463-4471.

Dobson, S., P. Howe and P. Floyd (2006). Mono-and disubstituted methyltin, butyltin, and octyltin compounds, World Health Organization.

Dusserre, C., J. Mollergues, E. Lo Piparo, M. Smiesko, M. Marin-Kuan, B. Schilter and K. Fussell (2018). "Using bisphenol A and its analogs to address the feasibility and usefulness of the CALUX-PPARgamma assay to identify chemicals with obesogenic potential." Toxicol In Vitro **53**: 208-221.

Ebert, D. (2005). "Ecology, Epidemiology, and Evolution of Parasitism in *Daphnia*." National Center for Biotechnology Information (US).

Ebert, D. (2005). "Ecology, Epidemiology, and Evolution of Parasitism in *Daphnia*. Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Information (US)."

European Chemicals Agency (2018). "Guidance for the identification of endocrine disruptors in the context of Regulations (EU) No 528/2012 and (EC) No 1107/2009." EFSA Journal **16**(6): e05311.

Fang, M., T. F. Webster, P. L. Ferguson and H. M. Stapleton (2015). "Characterizing the peroxisome proliferator-activated receptor (PPARgamma) ligand binding potential of several major flame retardants, their metabolites, and chemical mixtures in house dust." Environ Health Perspect **123**(2): 166-172.

Ferrante, M. C., P. Amero, A. Santoro, A. Monnolo, R. Simeoli, F. Di Guida, G. Mattace Raso and R. Meli (2014). "Polychlorinated biphenyls (PCB 101, PCB 153 and PCB 180) alter leptin signaling and lipid metabolism in differentiated 3T3-L1 adipocytes." Toxicol Appl Pharmacol **279**(3): 401-408.

Foley, B., D. L. Doheny, M. B. Black, S. N. Pendse, B. A. Wetmore, R. A. Clewell, M. E. Andersen and C. Deisenroth (2017). "Editor's Highlight: Screening ToxCast Prioritized Chemicals for PPARG Function in a Human Adipose-Derived Stem Cell Model of Adipogenesis." Toxicol Sci **155**(1): 85-100.

Grun, F. and B. Blumberg (2006). "Environmental obesogens: organotins and endocrine disruption via nuclear receptor signaling." Endocrinology **147**(6 Suppl): S50-55.

Grün, F. and B. Blumberg (2009). "Endocrine disruptors as obesogens." Molecular and cellular endocrinology **304**(1-2): 19-29.

Guney, M. and G. J. Zagury (2013). "Contamination by ten harmful elements in toys and children's jewelry bought on the North American market." Environ Sci Technol **47**(11): 5921-5930.

Hao, C., X. Cheng, J. Guo, H. Xia and X. Ma (2013). "Perinatal exposure to diethyl-hexyl-phthalate induces obesity in mice." Front Biosci (Elite Ed) **5**(1): 725-733.

Harley, K. G., K. Berger, S. Rauch, K. Kogut, B. C. Henn, A. M. Calafat, K. Huen, B. Eskenazi and N. Holland (2017). "Association of prenatal urinary phthalate metabolite concentrations and childhood BMI and obesity." Pediatric research **82**(3): 405.

Heindel, J. J., B. Blumberg, M. Cave, R. Machtinger, A. Mantovani, M. A. Mendez, A. Nadal, P. Palanza, G. Panzica, R. Sargis, L. N. Vandenberg and F. vom Saal (2017). "Metabolism disrupting chemicals and metabolic disorders." Reproductive Toxicology **68**: 3-33.

Heindel, J. J., B. Blumberg, M. Cave, R. Machtinger, A. Mantovani, M. A. Mendez, A. Nadal, P. Palanza, G. Panzica, R. Sargis, L. N. Vandenberg and F. Vom Saal (2017). "Metabolism disrupting chemicals and metabolic disorders." Reprod Toxicol **68**: 3-33.

Heindel, J. J., R. Newbold and T. T. Schug (2015). "Endocrine disruptors and obesity." Nature Reviews Endocrinology **11**(11): 653-661.

Hoch, M. (2001). "Organotin compounds in the environment—an overview." Applied geochemistry **16**(7-8): 719-743.

Jeremias, G., J. Barbosa, S. M. Marques, K. A. C. De Schamphelaere, F. Van Nieuwerburgh, D. Deforce, F. J. M. Goncalves, J. L. Pereira and J. Asselman (2018). "Transgenerational Inheritance of DNA Hypomethylation in *Daphnia magna* in Response to Salinity Stress." Environ Sci Technol **52**(17): 10114-10123.

Jordao, R., J. Casas, G. Fabrias, B. Campos, B. Pina, M. F. Lemos, A. M. Soares, R. Tauler and C. Barata (2015). "Obesogens beyond Vertebrates: Lipid Perturbation by Tributyltin in the Crustacean *Daphnia magna*." Environ Health Perspect **123**(8): 813-819.

Jordao, R., E. Garreta, B. Campos, M. F. Lemos, A. M. Soares, R. Tauler and C. Barata (2016). "Compounds altering fat storage in *Daphnia magna*." Sci Total Environ **545-546**: 127-136.

Kaur, P., N. Saxena and Z. Zhu (2018). "Effect of Asian BMI on risk of chronic disease progression: A Singapore perspective." Proceedings of Singapore Healthcare: 201010581877940-201010581877940.

Kim, H. W., S. Kam and D. H. Lee (2014). "Synergistic interaction between polycyclic aromatic hydrocarbons and environmental tobacco smoke on the risk of obesity in children and adolescents: The U.S. National Health and Nutrition Examination Survey 2003-2008." Environ Res **135**: 354-360.

Kim, J., Q. Sun, Y. Yue, K. S. Yoon, K. Y. Whang, J. Marshall Clark and Y. Park (2016). "4,4'-Dichlorodiphenyltrichloroethane (DDT) and 4,4'-dichlorodipenyldichloroethylene (DDE) promote adipogenesis in 3T3-L1 adipocyte cell culture." Pestic Biochem Physiol **131**: 40-45.

Lamb, J. C. t., P. Boffetta, W. G. Foster, J. E. Goodman, K. L. Hentz, L. R. Rhomberg, J. Staveley, G. Swaen, G. Van Der Kraak and A. L. Williams (2014). "Critical comments on the

WHO-UNEP State of the Science of Endocrine Disrupting Chemicals - 2012." Regul Toxicol Pharmacol **69**(1): 22-40.

Lang, I. A., T. S. Galloway, A. Scarlett, W. E. Henley, M. Depledge, R. B. Wallace and D. Melzer (2008). "Association of urinary bisphenol A concentration with medical disorders and laboratory abnormalities in adults." Jama **300**(11): 1303-1310.

Legler, J., T. Fletcher, E. Govarts, M. Porta, B. Blumberg, J. J. Heindel and L. Trasande (2015). "Obesity , Diabetes , and Associated Costs of Exposure to Endocrine-Disrupting Chemicals in the European Union." **100**(April): 1278-1288.

Lien, G. W., J. H. Chen, F. W. Tien, P. C. Chen, H. W. Chen, H. L. Hwa, C. C. Fang, T. I. Weng and P. S. Chen (2018). "Dilute-and-shoot enhances sensitivity of phthalate urinary concentrations for assessing the exposure in children." J Hazard Mater **351**: 124-130.

Liu, B., H. J. Lehmler, Y. Sun, G. Xu, Y. Liu, G. Zong, Q. Sun, F. B. Hu, R. B. Wallace and W. Bao (2017). "Bisphenol A substitutes and obesity in US adults: analysis of a population-based, cross-sectional study." Lancet Planet Health **1**(3): e114-e122.

Lutfi, E., N. Riera-Heredia, M. Cordoba, C. Porte, J. Gutierrez, E. Capilla and I. Navarro (2017). "Tributyltin and triphenyltin exposure promotes in vitro adipogenic differentiation but alters the adipocyte phenotype in rainbow trout." Aquat Toxicol **188**: 148-158.

Maisano, M., T. Cappello, S. Oliva, A. Natalotto, A. Giannetto, V. Parrino, P. Battaglia, T. Romeo, A. Salvo, N. Spano and A. Mauceri (2016). "PCB and OCP accumulation and evidence of hepatic alteration in the Atlantic bluefin tuna, *T. thynnus*, from the Mediterranean Sea." Mar Environ Res **121**: 40-48.

Martinez, R., A. Esteve-Codina, L. Herrero-Nogareda, E. Ortiz-Villanueva, C. Barata, R. Tauler, D. Raldua, B. Pina and L. Navarro-Martin (2018). "Dose-dependent transcriptomic responses of zebrafish eleutheroembryos to Bisphenol A." Environ Pollut **243**(Pt B): 988-997.

Milton, F. A., M. G. Lacerda, S. B. Sinoti, P. G. Mesquita, D. Prakasan, M. S. Coelho, C. L. de Lima, A. G. Martini, G. T. Pazzino and M. d. F. Borin (2017). "Dibutyltin compounds effects on PPAR $\gamma$ /RXR $\alpha$  activity, adipogenesis, and inflammation in mammals cells." Frontiers in pharmacology **8**: 507.

Muscogiuri, G., L. Barrea, D. Laudisio, S. Savastano and A. Colao (2017). "Obesogenic endocrine disruptors and obesity: myths and truths." Arch Toxicol **91**(11): 3469-3475.

OCDE. (2019). "Non-Medical Determinants of Health: *Body weight*." Retrieved 12 Março 2019, 2019, from [https://stats.oecd.org/Index.aspx?DataSetCode=HEALTH\\_STAT&\\_ga=2.200819694.116900903.1545932022-768073253.1545932022](https://stats.oecd.org/Index.aspx?DataSetCode=HEALTH_STAT&_ga=2.200819694.116900903.1545932022-768073253.1545932022).

OECD (2014). Detailed Review Paper on the State of the Science on Novel In Vitro and In Vivo Screening and Testing Methods and Endpoints for Evaluating Endocrine Disruptors.

OECD (2017). "Obesity update 2017."

OECD/OCDE (2004). "OECD GUIDELINE FOR TESTING OF CHEMICALS - *Daphnia sp.*, Acute Immobilisation test."

OECD/OCDE (2012). "OECD GUIDELINE FOR THE TESTING OF CHEMICALS - *Daphnia magna* Reproduction Test."

Okamoto, A., M. Yamamuro and N. Tatarazako (2015). "Acute toxicity of 50 metals to *Daphnia magna*." J Appl Toxicol **35**(7): 824-830.

Palanza, P., S. Parmigiani and F. S. vom Saal (2001). "Effects of prenatal exposure to low doses of diethylstilbestrol, o,p'DDT, and methoxychlor on postnatal growth and neurobehavioral development in male and female mice." Horm Behav **40**(2): 252-265.

Passos, H., A. C. Sousa, M. R. Pastorinho, A. J. Nogueira, L. P. N. Rebelo, J. A. Coutinho and M. G. Freire (2012). "Ionic-liquid-based aqueous biphasic systems for improved detection of bisphenol A in human fluids." Analytical Methods **4**(9): 2664-2667.

Pereira-Fernandes, A., C. Vanparys, L. Vergauwen, D. Knapen, P. G. Jorens and R. Blust (2014). "Toxicogenomics in the 3T3-L1 cell line, a new approach for screening of obesogenic compounds." Toxicol Sci **140**(2): 352-363.

Pereira, J., C. Marques and F. Gonçalves (2004). Allometric relations for Ceriodaphnia spp. and Daphnia spp. Annales de Limnologie-International Journal of Limnology, EDP Sciences.

Regnier, S. M., E. El-Hashani, W. Kamau, X. Zhang, N. L. Massad and R. M. Sargis (2015). "Tributyltin differentially promotes development of a phenotypically distinct adipocyte." Obesity (Silver Spring) **23**(9): 1864-1871.

RPA (2005). Risk assessment studies on targeted consumer applications of certain organotin compounds. Prepared for the European Commission by Risk and Policy Analysts Limited (RPA). Dated September 2005. European Commission, EC.

Siciliano, A., R. Gesuele, G. Pagano and M. Guida (2015). "How *Daphnia* (Cladocera) Assays may be used as Bioindicators of Health Effects?" Journal of Biodiversity & Endangered Species **2015**.

Sousa, A. C., M. R. Pastorinho, S. Takahashi and S. Tanabe (2013). Organotin compounds from snails to humans. Pollutant Diseases, Remediation and Recycling, Springer: 215-275.

Sousa, A. C. A., M. R. Pastorinho, S. Takahashi and S. Tanabe (2014). "History on organotin compounds, from snails to humans." Environmental Chemistry Letters **12**(1): 117-137.

Speakman, J. R. and S. O. Rahilly (2012). "Fat : an evolving issue." **573**: 569-573.

Speliotes, E. K., C. J. Willer, S. I. Berndt, K. L. Monda, G. Thorleifsson, A. U. Jackson, H. L. Allen, C. M. Lindgren, J. A. Luan, R. Mägi, J. C. Randall, S. Vedantam, T. W. Winkler, L. Qi, T. Workalemahu, I. Heid, V. Steinthorsdottir, H. Stringham, M. N. Weedon, E. Wheeler, A. R. Wood, T. Ferreira, R. J. Weyant, A. V. Segrè, K. Estrada, L. Liang, J. Nemesh, J. H. Park, S. Gustafsson, T. O. Kilpeläinen, J. Yang, N. Bouatia-Naji, T. Eesko, M. F. Feitosa, Z. Kutalik, M. Mangino, S. Raychaudhuri, A. Scherag, A. V. Smith, R. Welch, J. H. Zhao, K. K. Aben, D. M. Absher, N. Amin, A. L. Dixon, E. Fisher, N. Glazer, M. E. Goddard, N. Heard-Costa, V. Hoesel, J. J. Hottenga, Å. Johansson, T. Johnson, S. Ketkar, C. Lamina, S. Li, M. F. Moffatt, R. H. Myers, N. Narisu, J. R. B. Perry, M. J. Peters, M. Preuss, S. Ripatti, F. Rivadeneira, C. Sandholt, L. J. Scott, N. J. Timpson, J. P. Tyrer, S. Van Wingerden, R. Watanabe, C. C. White, F. Wiklund, C. Barlassina, D. I. Chasman, M. N. Cooper, J. O. Jansson, R. W.

Lawrence, N. Pellikka, I. Prokopenko, J. Shi, E. Thiering, H. Alavere, M. T. S. Alibrandi, P. Almgren, A. Arnold, T. Aspelund, L. D. Atwood, B. Balkau, A. J. Balmforth, A. J. Bennett, Y. Ben-Shlomo, R. Bergman, S. Bergmann, H. Biebertmann, A. I. F. Blakemore, T. Boes, L. Bonnycastle, S. R. Bornstein, M. J. Brown, T. A. Buchanan, F. Busonero, H. Campbell, F. P. Cappuccio, C. Cavalcanti-Proença, Y. D. Ida Chen, C. M. Chen, P. Chines, R. Clarke, L. Coin, J. Connell, I. Day, M. Den Heijer, J. Duan, S. Ebrahim, P. Elliott, R. Eelosua, G. Eiriksdottir, M. R. Eerdos, J. G. Eeriksson, M. F. Facheris, S. B. Felix, P. Fischer-Posovszky, A. R. Folsom, N. Friedrich, N. B. Freimer, M. Fu, S. Gaget, P. V. Gejman, E. J. Geus, C. Gieger, A. P. Gjesing, A. Goel, P. Goyette, H. Grallert, J. Gräßler, D. Greenawalt, C. J. Groves, V. Gudnason, C. Guiducci, A. L. Hartikainen, N. Hassanali, A. Hall, A. Havulinna, C. Hayward, A. Heath, C. Hengstenberg, A. A. Hicks, A. Hinney, A. Hofman, G. Homuth, J. Hui, W. Igl, C. Iribarren, B. Isomaa, K. B. Jacobs, I. Jarick, E. Jewell, U. John, T. Jørgensen, P. Jousilahti, A. Jula, M. Kaakinen, E. Kajantie, L. Kaplan, S. Kathiresan, J. Kettunen, L. Kinnunen, J. Knowles, I. Kolcic, I. R. König, S. Koskinen, P. Kovacs, J. Kusisto, P. Kraft, K. Kvaløy, J. Laitinen, O. Lantieri, C. Lanzani, L. J. Launer, C. Lecoeur, T. Lehtimäki, G. Lettre, J. Liu, M. L. Lokki, M. Lorentzon, R. Luben, B. Ludwig, Magic, P. Manunta, D. Marek, M. Marre, N. G. Martin, W. McArdle, A. McCarthy, B. McKnight, T. Meitinger, O. Melander, D. Meyre, K. Midthjell, G. Montgomery, M. A. Morken, A. P. Morris, R. Mulic, J. Ngwa, M. Nelis, M. J. Neville, D. R. Nyholt, C. J. O'Donnell, S. O'Rahilly, K. Ong, B. Ostra, G. Paré, A. Parker, M. Perola, I. Pichler, K. H. Pietiläinen, C. P. Platou, O. Polasek, A. Pouta, S. Rafelt, O. Raitakari, N. Rayner, M. Ridderstråle, W. Rief, A. Ruukonen, N. R. Robertson, P. Rzehak, V. Salomaa, A. R. Sanders, M. Sandhu, S. Sanna, J. Saramies, M. J. Savolainen, S. Scherag, S. Schipf, S. Schreiber, H. Schunkert, K. Silander, J. Sinisalo, D. S. Siscovick, J. H. Smit, N. Soranzo, U. Sovio, J. Stephens, I. Surakka, A. J. Swift, M. L. Tammesoo, J. C. Tardif, M. Teder-Laving, T. Teslovich, J. R. Thompson, B. Thomson, A. Tönjes, T. Tuomi, J. B. J. Van Meurs, G. J. Van Omen, V. Vatin, J. Viikari, S. Visvikis-Siest, V. Vitart, C. I. Vogel, B. F. Voight, L. Waite, H. Wallaschofski, B. Walters, E. Widen, S. Wiegand, S. H. Wild, G. Willemssen, D. R. Witte, J. Witteman, J. Xu, Q. Zhang, L. Zgaga, A. Ziegler, P. Zitting, J. P. Beilby, I. S. FarOqi, J. Hebebrand, H. V. Huikuri, A. James, M. Kähönen, D. F. Levinson, F. MacCiardi, M. S. Nieminen, C. Ohlsson, L. J. Palmer, P. Ridker, M. Stumvoll, J. Beckmann, H. Boeing, E. Boerwinkle, D. I. Bomsma, M. J. Caulfield, S. J. Chanock, F. Collins, L. A. Cupples, G. D. Smith, J. Eerdmann, P. Frogue, H. Grönberg, U. Gyllensten, P. Hall, T. Hansen, T. B. Harris, A. T. Hattersley, R. B. Hayes, J. Heinrich, F. B. Hu, K. Hveem, T. Illig, M. R. Jarvelin, J. Kaprio, F. Karpe, K. T. Khaw, L. A. Kiemeny, H. Krude, M. Laakso, D. A. Lawlor, A. Metspalu, P. B. Munroe, W. H. Ouwehand, O. Pedersen, B. W. Penninx, A. Peters, P. P. Pramstaller, T. Quertermous, T. Reinehr, A. Rissanen, I. Rudan, N. J. Samani, P. E. H. Schwarz, A. R. Shuldiner, T. D. Spector, J. Tuomilehto, M. Uda, A. Uitterlinden, T. Valle, M. Wabitsch, G. Waeber, N. J. Wareham, H. Watkins, J. F. Wilson, A. F. Wright, M. C. Zillikens, N. Chatterjee, S. A. McCarroll, S. Purcell, E. Schadt, P. Visscher, T. L. Assimes, I. B. Borecki, P. Deloukas, C. S. Fox, L. C. Groop, T. Haritunians, D. J. Hunter, R. Kaplan, K. Mohlke, J. R.

O'Connell, L. Peltonen, D. SchleSinger, D. P. P Strachan, C. Van Duijn, H. E. Wichmann, T. M. Frayling, U. Thorsteinsdottir, G. R. Abecasis, I. Barroso, M. Boehnke, K. StefanSon, K. E. North, M. I. McArthur, J. N. Hirschhorn, E. IngelSon and R. J. F. Loos (2010). "Association analyses of 249,796 individuals reveal 18 new loci associated with body mass index." Nature Genetics **42**(11): 937-948.

Stockholm Convention (2004). "Stockholm Convention on Persistent Organic Pollutants."

Stockholm Convention. (2019). "Listing of POPs in the Stockholm Convention." Retrieved Março 2019, from <http://chm.pops.int/TheConvention/ThePOPs/ListingofPOPs/tabid/2509/Default.aspx>.

Tang-Peronard, J. L., B. L. Heitmann, H. R. Andersen, U. Steuerwald, P. Grandjean, P. Weihe and T. K. Jensen (2014). "Association between prenatal polychlorinated biphenyl exposure and obesity development at ages 5 and 7 y: a prospective cohort study of 656 children from the Faroe Islands." Am J Clin Nutr **99**(1): 5-13.

United States Environmental Protection Agency. (2019). "Directive to Prioritize Efforts to Reduce Animal Testing ", from <https://www.epa.gov/sites/production/files/2019-09/documents/image2019-09-09-231249.pdf>.

Valvi, D., M. A. Mendez, D. Martinez, J. O. Grimalt, M. Torrent, J. Sunyer and M. Vrijheid (2012). "Prenatal concentrations of polychlorinated biphenyls, DDE, and DDT and overweight in children: a prospective birth cohort study." Environ Health Perspect **120**(3): 451-457.

Veiga-Lopez, A., Y. Pu, J. Gingrich and V. Padmanabhan (2018). "Obesogenic Endocrine Disrupting Chemicals: Identifying Knowledge Gaps." Trends Endocrinol Metab **29**(9): 607-625.

Wang, Y. H. and G. A. LeBlanc (2009). "Interactions of methyl farnesoate and related compounds with a crustacean retinoid X receptor." Molecular and cellular endocrinology **309**(1-2): 109-116.

Wang, Y. H., G. Wang and G. A. LeBlanc (2007). "Cloning and characterization of the retinoid X receptor from a primitive crustacean *Daphnia magna*." General and Comparative Endocrinology **150**(2): 309-318.

WHO (1990). "Tributyltin compounds." Environmental health criteria(116).

Yang, C., A. P. S. Kong, Z. Cai and A. C. K. Chung (2017). "Persistent Organic Pollutants as Risk Factors for Obesity and Diabetes." Curr Diab Rep **17**(12): 132.

Zoeller, R. T., T. R. Brown, L. L. Doan, A. C. Gore, N. E. Skakkebaek, A. M. Soto, T. J. Woodruff and F. S. Vom Saal (2012). "Endocrine-disrupting chemicals and public health protection: a statement of principles from The Endocrine Society." Endocrinology **153**(9): 4097-4110.

# Anexo I - Preparação de meios de cultura

## A. Meio ASTM *Hard Water*:

Preparação de 20L de ASTM *Hard Water*:

O meio ASTM é preparado em jerricãs de 25L previamente lavados\*.

Adicionar os seguintes reagentes a 18L de água destilada

Massa (mg)	Composto
4914,4	MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O
3840	NaHCO <sub>3</sub>
160	KCl
2400	CaSO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O*

\*O sulfato de cálcio dihidratado deve ser dissolvido previamente em água destilada (1L) antes de ser adicionado ao recipiente final.

1. Perfazer com água destilada até aos 20L.
2. Ajustar o pH, que deve estar entre 7,6 e 8,0.
3. Adicionar 1 mL de vitamina ASTM previamente preparada e congelada a -20 °C.

\*Lavagem dos jerricãs

1. Lavar com lixívia (manter o jerricã cheio com uma solução com lixívia durante 2 a 3 dias).
2. Enxaguar em abundância com água da torneira.
3. Lavar com água destilada (manter o jerricã cheio com água destilada durante 2 a 3 dias).

## B. Extrato de alga:

1. Diluir 9 mL do extrato de alga concentrado em 1L de água Milli-Q.
2. De seguida, medir a absorvância desta solução stock a 400 nm a um décimo de diluição com um espectrofotómetro de visível (o valor de absorvância deve estar compreendido entre 0,610 e 0,630). Esta solução stock deve ser mantida no frigorífico (4 °C) protegida da luz.
3. Por fim, o extrato de alga diluído deve ser filtrado com um filtro de membrana de acetato de celulose de poro 0,2 µm. O extrato de alga filtrado é rotulado e armazenado ao escuro a 4 °C.

## Anexo II - Lista de Publicações

### Capítulos de Livro:

Chamem O, Fernandes A, Pereira C, Coelho S, Sousa ACA, Pastorinho MR, Pacheco MJ, Ciriaco L, Zairi M, Lopes A (2019) Treatment of reverse osmosis concentrate from sanitary landfill leachate by combined processes: electrocoagulation followed by electro-fenton. In Morrisson G (ed) Landfill Leachate: Control, Treatment and Environmental Impact, Nova Science Publishers, New York, USA, ISBN 978-1-53616-523-4, p. 83-106.

### Comunicações orais em congressos internacionais:

Fernandes A, Pereira C, Coelho S, Sousa ACA, Pastorinho MR, Pacheco MJ, Ciriaco L, Lopes A (2019) Electrochemical degradation of emerging contaminants: Ecotoxicological evaluation. PTIM 2019, 3rd International Caparica Conference on Pollutant Toxic Ions and Molecules, 4-7 November 2019, Caparica, Portugal, p. 145.

### Comunicações em poster em Simpósios/congressos nacionais:

Coelho S, Monteiro L, Chamem O, Pereira C, Fernandes A, Pacheco MJ, Ciriaco L, Zairi M, Lopes A, Sousa ACA, Pastorinho MR (2019) Electrochemically Treated Sanitary Landfill Leachate Toxicity to *Daphnia magna* After Reverse Osmosis Concentration. XIV Annual CICS-UBI Symposium 2019, 4-5 July 2019, Covilhã, Portugal, p. 69

Coelho S, Marques D, Pinto N, Vaz PAtto M, Sousa ACA, Pastorinho MR (2019) Use of acute toxicity for the toxicological evaluation of Transcranial Magnetic Stimulation (TMS) in *Daphnia magna*. XIV Annual CICS-UBI Symposium 2019, 4-5 July 2019, Covilhã, Portugal, p. 121

Marques D, Coelho S, Sousa ACA, Cristovão AC, Pastorinho (2019) Evaluation of acute toxicity of paraquat in *Daphnia magna*. XIV Annual CICS-UBI Symposium 2019, 4-5 July 2019, Covilhã, Portugal, p. 75