



DESCRIPCIÓ I COMPARACIÓ DE MÈTODES DE DETECCIÓ DE CONTAMINACIÓ PRODUÏDA PER PESTICIDES EN PEIXOS

Grau de Biotecnologia

Autora: Laura Sementé Bellmunt

Tutor: Delfí Sanuy Castells

Índex

Llista de sigles i acrònims.....	II
Resum.....	IV
1. Introducció.....	1
1.1- La contaminació en el medi ambient.....	1
1.2.- Tipus de contaminants.....	2
1.2.1 Fàrmacs.....	2
1.2.2. Metalls pesants.....	3
1.2.3. Pesticides.....	4
2. Objectius.....	7
3. Metodologia.....	8
4. Estudi d'alternatives.....	10
4.1. Mètodes de detecció dels efectes de la toxicitat causada per pesticides sobre peixos.....	10
4.1.1. Indicadors de variacions en el comportament dels peixos.....	10
4.1.2. Indicadors de variacions en la fisiologia/bioquímica dels peixos.....	13
4.1.3. Discussió d'alternatives.....	16
4.2. Tècniques analítiques per a l'anàlisi de biomarcadors.....	18
4.3. Tècniques analítiques per a la quantificació de residus de pesticides.....	20
5. Conclusions.....	22
6. Bibliografia.....	24

Llista de sigles i acrònims

ACh: Acetilcolina

AChE: Acetilcolinesterasa

ADN: Àcid Desoxirribonucleic

AgNIC: Agriculture Network Information Center

CAT: Catalasa

CYP: Cytochrome Pigment

EDAR: Estació Depuradora d'Aigües Residuals

EI: Ionització per electroimpacte

ELISA: Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay

ESI: Ionització per electroesprai

GC: Cromatografia de gasos

GPx: Glutatió peroxidasa

GR: Glutatió reductasa

GST: Glutatió S-transferasa

HPLC-UV: High Performance Liquid Chromatography

LC: Cromatografia líquida

LC₅₀: Concentració Letal 50

LD₅₀: Dosi Letal 50

MS: Espectrometria de masses

NCBI: National Centre for Biotechnology Information

PAH: Hidrocarburs Aromàtics Policíclics

PAN: Pesticide Action Network

PCB: Bifenils policlorats

RMN: Ressonància Magnètica Nuclear

ROS: Espècies reactives de l'oxigen

SOD: Superòxid dismutasa

SPE: Extracció en fase sòlida

TCDD: 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-p-dioxina

XOD: Xantina oxidasa

Resum

La contaminació és un dels problemes que contribueix a la pèrdua de la biodiversitat. En el cas de la contaminació de les aigües superficials, pot afectar tant a la supervivència de les espècies aquàtiques (per exemple els peixos) com també a la salut dels humans, ja que pot arribar-nos a través de la cadena tròfica. Però com podem saber que s'ha produït una contaminació per pesticides?

Aquest treball intentarà respondre a aquesta qüestió mitjançant tres tipus de comparatives. En primer lloc, es realitzarà una revisió bibliogràfica sobre els mètodes de detecció de la contaminació produïda per pesticides en els peixos. La comparativa es produirà entre els mètodes de detecció "tradicionals" que correspondrien a aquells basats en l'observació de canvis de comportament en els organismes i els més "innovadors" com són l'ús de biomarcadors fisiològics, químics, metabòlics, etc. Posteriorment, es contraposaran les tècniques analítiques emprades en la determinació dels biomarcadors: l'espectrometria de masses (MS) i la ressonància magnètica nuclear (RMN), àmpliament usades en la metabolòmica. Finalment, l'última comparació serà entre aquelles tècniques que permeten quantificar la presència de pesticides en els peixos, on bàsicament es caracteritzarà la MS, distingint en aquest cas, quina tècnica cromatogràfica prèvia al seu ús pot ser més adient.

Resumen

La contaminación es uno de los problemas que contribuyen a la pérdida de la biodiversidad. En el caso de la contaminación de las aguas superficiales, puede afectar tanto a la supervivencia de las especies acuáticas (por ejemplo a los peces), como a la salud de los seres humanos, ya que la contaminación puede llegarnos a través de la cadena trófica. ¿Pero cómo podemos saber que se ha producido una contaminación por pesticidas?

Este trabajo intentará responder a esta cuestión mediante tres tipos de comparativas. En primer lugar, se realizará una revisión bibliográfica sobre los métodos de detección de la contaminación producida por pesticidas en los peces. La comparativa se producirá entre los métodos de detección "tradicionales" que corresponderían a aquellos basados en la observación de cambios de comportamiento en los organismos, y los más "innovadores" como son el uso de biomarcadores fisiológicos, químicos, metabólicos, etc. Posteriormente, se contrapondrán las técnicas analíticas utilizadas en la determinación de los biomarcadores: la espectrometría de masas (MS) y la resonancia magnética nuclear (RMN), ambas ampliamente usadas en la

metabolómica. Finalmente, la última comparación será entre aquellas técnicas que permiten cuantificar la presencia de pesticidas en los peces, donde básicamente se caracterizará la MS, distinguiendo en este caso, qué técnica cromatográfica previa a su uso puede ser la más adecuada.

Abstract

Pollution is one of the many problems that contribute to the loss of biodiversity. In surface water pollution's case it can affect both survival of the aquatic organisms (just like fish) and human health since the pollution could reach us through the food chain. But how can we know that there has been a pesticide contamination?

This work will try to answer this question through three types of comparatives. First of all, a bibliographic review will be carried out on the methods of detecting pollution caused by pesticides in fish. The comparison will be made between "traditional" detection methods that correspond to those based on the observation of behavioral changes in organisms and the most "innovative" ones, such as the use of physiological, chemical, metabolic, etc. biomarkers. Subsequently, the analytical techniques used in the determination of biomarkers as are mass spectrometry (MS) and nuclear magnetic resonance (NMR) (widely used in metabolomics) will be contrasted. Finally, the last comparison will be between those techniques that allow to quantify the presence of pesticides in fish, where basically the MS will be characterized, distinguishing in this case, what chromatographic technique prior to its use may be more appropriate.

1. Introducció

1.1- La contaminació en el medi ambient

Avui en dia, la investigació pel que fa a la contaminació de les aigües superficials (rius, llacs, aigües de transició i aigües costeres) o dels sediments s'ha convertit en una gran preocupació per a la ciència mediambiental (Lazartigues et al., 2011). Com que es tracta d'una contaminació que s'expandeix fàcilment, produeix un impacte en la salut dels peixos i fa que aquesta contaminació s'acumuli en els seus teixits comestibles, fet que comporta un risc potencial per als consumidors (Lazartigues et al., 2011).

Tots els tipus de contaminació de les aigües afecten als organismes i plantes que hi viuen i en pràcticament tots els casos, aquest efecte no només és perjudicial per als individus i poblacions, sinó també per a les comunitats biològiques naturals (Agrawal, Pandey i Sharma, 2010).

La contaminació de les aigües superficials per part de contaminants ambientals com metalls pesants, pesticides i altres contaminants orgànics produeixen efectes adversos sobre la biodiversitat. Per una banda, suposen un seriós risc per a la salut dels organismes aquàtics (Scott i Sloman, 2004) produint-los toxicitat directa ja sigui a curt o a llarg termini (Hook, Gallagher i Batley, 2016).

La toxicitat d'aquests contaminants químics també pot tenir un greu efecte sobre la salut humana. Tot i que una determinada quantitat de contaminant pot estar dins dels límits de tolerància humana, una exposició constant pot causar problemes crònics que poden arribar a ser més greus que els problemes derivats d'una exposició a curt termini (Cook et al., 2008). Per exemple, els metalls pesants no són degradables i es poden acumular al cos afectant al sistema nerviós i als òrgans interns (Lee et al., 2007; Lohani et al., 2008).

A més a més, també cal tenir en compte que la contaminació de les aigües suposa una pèrdua econòmica pel que fa a la pesca. Per una banda, les altes concentracions dels contaminants poden matar els peixos de forma directa i les baixes concentracions poden causar la mort de peixos alevins altament susceptibles o poden eliminar aliments essencials per als peixos, com ara insectes i altres invertebrats (Pimentel, 2009). Així doncs, atès que està prohibida la venda de peixos contaminats, suposa en tot cas, una pèrdua econòmica (Pimentel, 2009).

1.2.- Tipus de contaminants

Prèviament a la determinació dels diferents tipus de contaminants de l'aigua, cal distingir en primer lloc que existeixen diferents cossos d'aigua i que per tant, uns contaminants predominaran més en un cos o en un altre (Agrawal et al., 2010). Els principals cossos d'aigua susceptibles de ser contaminats són els llacs, els rius, els oceans i les aigües subterrànies (Agrawal et al., 2010).

Les aigües superficials poden ser contaminades per activitats humanes com l'agricultura, la mineria, l'extracció de petroli, el clavegueram sanitari, la indústria o la construcció (Agrawal et al., 2010).

Dins de l'extensa llista de possibles contaminants de les aigües, aquells que han rebut més atenció i que per tant han estat més estudiats i reportats es poden classificar en 3 categories: metalls pesants, pesticides i fàrmacs. Aquestes es descriuran a continuació classificades per ordre alfabètic.

Abans però, cal definir el concepte de toxicitat. La toxicitat d'un agent tòxic és el grau al que és capaç de danyar un organisme que hi estigui exposat (Agrawal et al., 2010). Segons Cook et al. (2008) els termes més comuns a l'hora de parlar de toxicitat són LD₅₀ i LC₅₀. LD₅₀ fa referència a aquella dosi d'una substància que és capaç de matar la meitat dels animals testats. Normalment aquest terme és calculat en rates, per tant, els termes de toxicitat vindran referits a la LC₅₀, que normalment utilitza els peixos com a estàndards per als tests, i que és aquella concentració letal d'un material que permet matar la meitat dels animals testats en un període de temps específic. Aquesta concentració letal pot referir-se a un medi com l'aire o a un cos d'aigua; en aquest context, serà referit a la quantitat de substància en l'aigua que podria matar els animals que hi viuen.

1.2.1 Fàrmacs

Els compostos farmacèutics poden entrar dins del medi ambient a través de diferents vies com la descàrrega d'aigües residuals tractades (els fàrmacs sovint no es degraden completament i per tant, una part dels fàrmacs quedarà inalterada a la sortida de la planta de depuració (Almarcha i Riera, 2011)), la filtració dels abocadors, el clavegueram o l'escorriment dels residus d'origen animal i dels fems usats com a fertilitzants (Glassmeyer et al., 2005; Wu et al., 2010; Ternes, 1998).

Aquests inclouen medicaments d'ampli consum (ibuprofè, anticonceptius, antidepressius...), productes cosmètics (sabons, filtres ultraviolats...) i drogues

(cocaïna, cànnabis...). Tots ells s'agrupen dins del grup de contaminants emergents (Almarcha i Riera, 2011). Es consideren contaminants emergents els compostos no legislats que són presents de manera freqüent al medi ambient i a més a més dels contaminants anomenats anteriorment, també s'hi inclouen els retardants de flama, les nitrosamines, els surfactants, els plastificants i els additius de combustibles (Almarcha, 2011). Aquests contaminants emergents han començat a guanyar interès recentment (Hook et al., 2016).

Tot i això, no es creu (actualment) que els fàrmacs produeixin un efecte negatiu sobre la salut humana ja que es troben en concentracions molt petites (Almarcha i Riera, 2011). En canvi, en els organismes aquàtics si que hi poden tenir més efecte: poden promoure efectes ecotoxicològics aguts o crònics o provocar disrupció endocrina o intersexualitat, que pot conduir, per exemple, a la feminització dels alevins d'algunes espècies sensibles de peixos, com és el cas del salmó (Almarcha i Riera, 2011).

En els estudis trobats en la literatura, les concentracions de fàrmacs detectades en efluents d'EDAR (Estació Depuradora d'Aigües Residuals) es troben dins d'un rang que comprèn des de ng/L fins a µg/L, mentre que en les aigües superficials, els fàrmacs rarament es troben a concentracions majors de 100 ng/L (Trudeau et al., 2005).

Cunningham et al. (2006) varen dur a terme una revisió de la literatura científica existent pel que fa als valors de LC_{50} per als principis actius de diversos fàrmacs en peixos, algues i invertebrats. Van arribar a la conclusió que els fàrmacs, en general, no presenten una elevada ecotoxicitat; en realitat, la gran majoria no produeixen efectes letals en els organismes aquàtics a concentracions <1 mg/L. Les dades indicaren que més del 90% dels compostos presentaven uns valors mínims de $LC_{50} >1$ mg/L, mentre que tan sols l'1% dels compostos tenien valors mínims de $<0,01$ mg/L.

1.2.2. Metalls pesants

La contaminació dels rius per part de metalls pesants pot produir-se tant de forma natural com de forma antropogènica (Bem et al., 2003; Wong et al., 2003; Adaikpoh et al., 2005; Akoto, Bruce i Darko, 2008). Dins de les fonts antropogèniques, les principals són la mineria, les restes d'efluents no tractats o parcialment tractats que contenen metalls tòxics i l'ús indiscriminat de fertilitzants i pesticides usats en camps agrícoles que contenen metalls pesants (Hatje et al., 1998; Ammann, Michalke i Shcramel, 2002; Nouri et al., 2006; Nouri et al., 2008).

Alguns metalls com el Cu, Fe, Mn, Ni i Zn són essencials com a micronutrients pels processos vitals de plantes i animals, però de molts altres com ara el Cd, Cr, Pb i Co no se'n coneixen activitats fisiològiques ara per ara (Kar et al., 2008; Suthar i Singh, 2008; Aktar et al., 2010).

A continuació es presenta una taula amb la toxicitat d'alguns metalls pesants sobre diferents espècies de peix:

Taula 1: Toxicitat per metalls pesats en diferents espècies: truita de rierol (*Salvelinus fontinalis*), llenguado limanda (*Limanda limanda*), "carpita cabezona" (*Pimephales promelas*), llisa vera (*Chelon labrosus*), tilàpia del Nil (*Oreochromis niloticus*) i truita arc de Sant Martí (*Oncorhynchus mykiss*). La duració d'exposició als metalls pesats va ser de 96 h. Font: Scott i Sloman (2004)

Metall pesat	LC ₅₀ (mg/L)
Cadmi	<500 - 2,2·10 ⁴
Coure	2,8·10 ³ - 1,4·10 ⁶
Mercuri (inorgànic)	1,68·10 ⁵
Mercuri (metil)	7,5·10 ⁴
Níquel	8,1·10 ⁶ - 1,18·10 ⁸
Plom	1·10 ⁶ - 3,36·10 ⁶
Zinc	6,6·10 ⁴ - 2,15·10 ⁷

Respecte a la taula 2 cal mencionar que el rang de LC₅₀ per a la majoria de metalls varia en gran mesura segons l'espècie de peix estudiada i fins i tot dins de la mateixa espècie. Això pot ser degut a que les concentracions a les quals un compost és letal depenen de molts factors, com són per exemple l'espècie i la qualitat de l'aigua (Scott i Sloman, 2004). En qualsevol cas, les concentracions de LC₅₀ en termes generals oscil·len entre <500 i 1,18·10⁸ mg/L de contaminant.

1.2.3. Pesticides

Els pesticides són substàncies químiques (com ara insecticides, fungicides, herbicides, rodenticides, nematocides, factors de creixement de plantes, etc.) que s'utilitzen arreu del món per tal d'augmentar el rendiment dels cultius i també per a eliminar les plagues d'insectes responsables de transmetre malalties als humans i als animals (Agrawal et al., 2010).

Tot i els avantatges que suposa la seva aplicació en l'agricultura, molts pesticides (sobretot els que actuen sobre els animals, com els insecticides, els nematocides i els rodenticides) no són específics de la seva plaga diana i per tant, suposen un perill per a la salut d'altres tipus de vida animal (Cook et al., 2008).

Els pesticides són un dels grups de contaminants que contribueixen més a la contaminació tòxica (Agrawal et al., 2010) i poden arribar a les aigües superficials a través del vessament de plantes tractades i a través del sòl (Aktar, Sengupta i Chowdhury, 2009) ja que són un dels contaminants que s'estenen més ràpidament (Aktar et al., 2010).

L'efecte que provoquen els pesticides sobre la plaga desitjada ve donat per un component actiu, un compost químic que normalment sol representar un percentatge molt petit del total de components d'un pesticida. La resta de substàncies generalment són inertes (no reactives) i tan sols s'utilitzen per portar la toxina (Cook et al., 2008).

A continuació, apareix descrita una taula amb la toxicitat relativa a l'ús de pesticides sobre espècies de peixos no diana:

Taula 2: Toxicitat en peixos per part d'insecticides comunament usats. La toxicitat en els peixos està basada en espècies de peixos gat i en "morraja azul" (*Lepomis macrochirus*). Font: Cook et al. (2008)

Insecticida	LC₅₀ (mg/L)
Hydrdamethinon (Amdro®)	0,1-1
Diazinon	0,1-1
Chlorpurifos (Durisban®)	<0,1
Malathion	<0,1
Acephate (Orthene®)	>100
Carbaryl (Sevin®)	1-10
Dimehoate (Cygon®)	1-10
Trichlorfon (Dylox®)	0,1-1
Dicofol (Kethane®)	0,1-1
Propargite (Omite®)	0,1-1

En el cas dels pesticides, les concentracions de LC₅₀ comprenen des de <0,1 fins a 1 mg/L, fet que, segons la classificació de toxicitat de pesticides descrita a la Taula 4, suposa un nivell alt de toxicitat.

Taula 3: Classificació del grau de toxicitat de pesticides sobre peixos segons els valors corresponents de LC₅₀ (Concentració Letal 50) (Helfrich, Weigmann i Stinson, 2009).

Toxicitat	LC ₅₀ (mg/L)
Mínima	>100
Poca	10-100
Moderada	1-10
Alta	0,1-1
Extrema	0,01-0,1
Super	<0,01

Tenint en compte que, segons l'Agència de Protecció del Medi Ambient, més del 50% de la contaminació de l'aigua dels rius es produeix a causa de la lixiviació i la barreja de productes químics provinents de pràctiques agrícoles (Cook et al., 2008), i que per aquest motiu la major part d'articles publicats es focalitzen en analitzar pesticides, aquests seran els contaminants escollits per a realitzar aquest treball.

A més a més, cal tenir en compte que la toxicitat produïda per aquests, en comparació amb els altres tipus de contaminants descrits, és molt més elevada, ja que només cal de mitjana una concentració de 0,1-1 mg/L per a matar la meitat dels animals testats. Mentre que en el cas dels fàrmacs i dels metalls pesants es requereix una concentració més gran per a fer-ho.

Per tant, l'ús dels pesticides és un dels factors que més contribueixen al debilitament dels peixos i d'altres espècies aquàtiques (Helfrich, Weigmann i Stinson, 2009).

Un dels passos per a intentar minimitzar aquesta contaminació passa per esbrinar quins mètodes existeixen per tal de determinar-la. Aquest treball es basarà en descriure els indicadors de contaminació per pesticides que apareixen més freqüentment en la literatura i comparar-los entre ells per trobar el/els més eficients. A més a més, també es compararà i es discutirà envers les tècniques analítiques emprades per a la determinació d'aquests indicadors.

2. Objectius

Els objectius d'aquest treball són els següents:

- Realitzar una recerca bibliogràfica sobre els principals mètodes de detecció de contaminació per pesticides en peixos.
- Caracteritzar els diferents mètodes de detecció de contaminació, comparar-los entre ells i escollir el més adient.
- Descriure les tècniques analítiques emprades per a l'anàlisi del mètode de detecció escollit.
- Valorar la seva preferència segons la bibliografia trobada.
- Conèixer quines són les principals tècniques analítiques per a la quantificació i anàlisi de la contaminació per pesticides.
- Fer una valoració per tal de decidir quina tècnica analítica és la més adient per a la quantificació de pesticides.

3. Metodologia

Per dur a terme aquest treball bibliogràfic es van consultar bases de dades bibliogràfiques com Scopus que permet buscar tant resums i citacions per a articles de revistes acadèmiques com fer recerques en bases de dades de patents; i cercadors com NCBI (National Centre for Biotechnology Information) i PubMed, que recullen articles científics referents a diferents branques científiques com la biomedicina, la biotecnologia, la bioquímica, la genètica i la genòmica.

El tema de partida per a caracteritzar el treball era molt ampli (conservació de la biodiversitat) i abraçava massa possibilitats, així que primer de tot calia acotar-lo. Una primera recerca inicial va incloure mots com "*biodiversity preservation*" i va permetre localitzar les principals causes de pèrdua de biodiversitat: la destrucció de l'hàbitat, les espècies invasores, la contaminació, la població, la sobreexplotació i el canvi climàtic (Sharma i Sharma, 2013). A partir d'aquí, es va pensar en quines de les causes la biotecnologia podia contribuir-hi, i es va decidir que la contaminació podria ser una d'elles.

Però la contaminació pot produir-se de moltes maneres i sobre moltes espècies. Llegint i revisant articles va aparèixer el concepte de detecció i monitorització de la contaminació i es va veure que la majoria d'articles es referien als peixos com a animals estudiats.

Per aquest motiu, va resultar interessant veure de quina manera es podia detectar la contaminació en els peixos i de quina forma la biotecnologia podia tenir-hi un paper. Per fer-ho, es van anar revisant articles que contenien mots com "*pollution*", "*fish*", "*water*" i van anar sorgint conceptes com "*biomarker*", "*behavior*" o "*metabolomics*". D'aquesta manera es va anar recopilant informació i comparant articles.

A mesura que s'anaven llegint articles, era evident que existien massa tipus de contaminants, per tant, calia discriminar i seleccionar-ne un sol tipus. Per fer-ho es van buscar paraules clau com "*water pollutants*" o "*fish pollution*" a les bases de dades anteriorment anomenades.

A més a més, també es va fer una recerca al cercador AgNIC (Agriculture Network Information Center) amb les paraules clau "*pesticide toxicity*" i de les diferents bases de dades proporcionades, es va seleccionar PAN Pesticides Database. Aquesta base de dades proporciona una gran varietat d'informació sobre pesticides, i entre altres serveis estableix una classificació sobre la toxicitat produïda sobre una gran varietat

d'espècies, així com els efectes que poden causar els pesticides i informació necessària sobre la química d'aquests.

Una vegada trobats i descrits els mètodes de detecció de contaminació en els peixos, es va procedir a comparar les tècniques analítiques per a la seva detecció. "*Analytical techniques*", "*pesticide*" i la combinació d'aquests, van ser els conceptes escollits per a buscar en les bases de dades i a partir de les lectures en sorgien d'altres: "*NMR on pesticide pollution*", "*LC-MS*", "*metabolomic technologies*", etc.

Mencionar també la col·laboració de l'Antoni Palau (limnòleg), del Ramon Batalla (hidròleg) i del Manuel Portero (metge) que em varen aconsellar en alguns aspectes del treball.

4. Estudi d'alternatives

4.1. Mètodes de detecció dels efectes de la toxicitat causada per pesticides sobre peixos

Els efectes de la contaminació produïda sobre els organismes aquàtics, i en especial sobre els peixos, es poden determinar a través de l'estudi de diversos indicadors. Aquests es poden classificar a gran trets entre: indicadors de variacions en el seu comportament i indicadors de variacions en la seva fisiologia (Scott i Sloman, 2004).

4.1.1. Indicadors de variacions en el comportament dels peixos

El comportament fa de pont entre els processos fisiològics i els ecològics (Scott i Sloman, 2014), ja que és el reflex dels canvis fisiològics que es produeixen en un organisme quan aquest és sotmès a variacions en l'ambient. Per aquest motiu, el comportament és un mecanisme ideal per a estudiar els efectes dels contaminants ambientals (Scott i Sloman, 2004).

Pel que fa a les variacions del creixement, de la reproducció o de la supervivència, poden esdevenir mesures poc fiables de l'efecte de molts contaminants indirectes de l'aigua (Scholtz et al., 2012). En canvi, altres canvis més subtils com per exemple un comportament reproductiu no apropiat, la resiliència a malalties o la captura de preses poden ser millors indicadors sobre l'impacte de la supervivència d'un organisme a més llarg termini (Scholtz et al., 2012).

- *Alteració de la conducta evasiva de la presa*

Quan els peixos presa són atacats per un depredador, alliberen una substància química "alarma" a través de les cèl·lules epidèrmiques de la pell (Scott i Sloman, 2004).

Després de detectar aquesta substància alarma per l'olfacte, altres individus o grups de peixos presa exhibeixen comportaments d'evitació del depredador (com ara disminuir les activitats de natació i d'alimentació o augmentar la formació i cohesió de grups de peixos) que minimitzen addicionalment la depredació (Smith, 1992; Chivers i Smith, 1998).

Els tòxics ambientals alteren la capacitat de les preses d'evitar el depredador (Scott i Sloman, 2004). La capacitat dels peixos d'evitar els seus depredadors s'ha vist reduïda com a resposta a l'exposició d'aquests a concentracions subletals de tòxics (Scott i Sloman, 2004). De fet, s'ha vist com alguns tòxics orgànics incrementen la

susceptibilitat a la depredació (Carlson et al., 1998; Hatfield i Anderson., 1972; Little et al., 1990) i fins i tot alguns són capaços d'alterar la capacitat de resposta dels peixos durant les últimes etapes de la caça, modificant la seva capacitat de fugir o modificant el comportament dels grups cohesionats formats per peixos (Scott i Sloman, 2004).

Segons l'estudi realitzat per Scholz et al. (2000) l'exposició d'individus juvenils de salmó reial (*Oncorhynchus tshawytscha*) a diazinon (pesticida organofosfat) durant dues hores a 1 i 10 µg/L va ser suficient per eliminar les respostes a substàncies d'alarma. També es va veure aquest efecte en grups de peixos de colors (*Carassius auratus*) exposats als herbicides atrazina i diuron a 5 µg/L durant 24 h (Saglio i Trijasse, 1998).

El fet que els peixos contaminats siguin més fàcils de capturar pels seus depredadors, incrementa les oportunitats de transmissió de la contaminació a través de la cadena tròfica (Scott i Sloman, 2004).

- *Alteració del comportament reproductiu*

L'exposició a tòxics pot interrompre potencialment la consecució de la conducta associada a tots els estadis reproductius (com la selecció del lloc de fresa, la defensa territorial del lloc de fresa, la construcció de nius i el festeig i la fresa) i pot disminuir l'èxit de la reproducció alterant la selecció de parella, l'èxit de la fertilització o la supervivència de les cries en un entorn natural (Scott i Sloman, 2004).

Diversos contaminants orgànics tenen una influència sobre el comportament reproductiu dels peixos. L'exposició d'adults de *Lepomis macrochirus* a 1 µg/L d'esfenvalerat (insecticida piteroid) i de cíclids tropicals a 0,6 µg/L d'endosulfan va retardar l'aparició de conductes reproductives. A més a més, l'esfenvalerat va disminuir també la supervivència de les cries de larves (Matthiessen i Logan, 1984; Tanner i Knuth, 1996).

En l'estudi realitzat per Scholz et al. (2000) es va demostrar que la capacitat del salmó reial per retornar al seu riu original va ser alterada després de 24 hores d'exposició a 10 µg/L de diazinon. Els salmons varen ser transportats a 2 km *downstream* del seu lloc de reproducció i posta natal, i tan sols el 40% dels salmons exposats al pesticida van ser capaços de retornar-hi. En canvi, gairebé el 100% dels peixos no exposats ho van aconseguir.

- *Alteració de la conducta social*

Els indicadors més simples i freqüentment mesurats pel que fa a l'alteració de les conductes socials dels peixos són els comportaments agonistes, com ara les amenaces, les mossegades o les persecucions (Scott i Sloman, 2004).

L'exposició dels peixos a agents tòxics altera les seves relacions socials, en molts casos augmentant els comportaments antagonistes, i en d'altres disminuint-los. L'efecte que puguin tenir les substàncies tòxiques depèn de molts factors: de l'agent tòxic, de les condicions d'exposició, de l'espècie de peix i de si les estructures socials estan preestablertes o són de nova formació (Scott i Sloman, 2004).

L'exposició de grups de peixos a procloraz (fungicida imidazol) (Saglio, Olsén i Bretaud, 2001), carbofuran (insecticida carbamat) (Saglio, Trijasse i Azam, 1996) i esfenvalerat (Little et al., 1993) va augmentar la incidència global de comportaments antagonistes entre grups de peixos.

Symons (1973) va exposar grups de salmons atlàntics (*Salmo salar*) a fenitrotió (insecticida organofosforat) en corrents d'aigua artificials i va observar que el número de peixos colonitzant territoris es va reduir durant almenys 7 dies després de l'exposició, senyal inequívoca que l'estructura social preestablerta s'havia alterat.

- *Disminució de l'eficiència en l'obtenció d'aliment:*

Mathers, Brown i Johansen (1985) i Brown et al. (1987) varen observar que l'exposició de *Micropterus* a pentaclorofenol va disminuir l'eficiència dels atacs a l'hora de caçar preses de pecílids.

També s'ha observat una disminució en la freqüència i l'eficiència dels atacs sota l'acció de concentracions relativament altes de carbaril (no menors de LC₅₀), així com també s'ha vist amb concentracions molt més baixes d'altres pesticides com ara el clordà (5% de LC₅₀), el paratió (1,3% de LC₅₀) o el tributil fosforotritioat (0,7% de LC₅₀). A majors concentracions, els peixos van deixar d'alimentar-se (Little et al., 1990).

La intensitat de caça d'*Oncorhynchus kisutch* també es va veure reduïda per la presència en l'aigua d'organofosforats (Bull i McInerney, 1974).

Així doncs, els pesticides disminueixen la quantitat de preses i altres nutrients consumits pels peixos, però tot i això, és un paràmetre que no sempre és altament sensible (Kasumyan, 2001). Un exemple es troba en un estudi dut a terme sobre espècimens de salmó atlàntic (*Salmo salar*) exposats a solucions de fenitrotion

(insecticida) similars a les que es poden trobar actualment en els cossos d'aigua. En aquest cas el número de preses caçades pels salmons per unitat de temps no va variar (Kasumyan, 2001).

4.1.2. Indicadors de variacions en la fisiologia/bioquímica dels peixos

Les conductes etològiques que són necessàries per a la supervivència són complexes i són un producte de la integració de molts sistemes fisiològics: sensorial, hormonal, neurològic i metabòlic (Scott i Sloman, 2004).

Els biomarcadors o marcadors biològics són indicadors a nivell molecular, bioquímic o cel·lular, tant de poblacions salvatges provinents d'hàbitats contaminats com d'organismes experimentalment exposats a contaminants, que indiquen que aquests organismes han estat exposats a contaminants tòxics i la magnitud de la resposta de l'organisme al contaminant (Rojas-García et al., 2011). L'ús dels biomarcadors té un gran potencial per tal de complementar els mètodes ja existents i emprats per a determinar la presència i el potencial d'impacte de contaminants ambientals (Rojas-García et al., 2011).

L'estrès degut a la contaminació generalment desencadena una cascada de respostes biològiques, cada una de les quals, en teoria pot ser usada com a biomarcador (Ghisi, 2012).

Existeixen molts tipus de marcadors biològics de contaminació i moltes classificacions d'aquests proporcionades per diferents autors i autores (Adedeji, Okerentugba, i Okonko, 2012; Gavrilesco, 2010; Rajesh, Abhishek, i Rajesh, 2016) sense que hi hagi un consens clar entre ells, però quan es tracta de contaminació produïda per pesticides, sembla ser que aquells més rellevants i més àmpliament estudiats són els següents:

- *Inhibició de l'activitat de l'acetilcolinesterasa (AChE)*

L'acetilcolina (ACh) és un mediador de la neurotransmissió en sinapsis colinèrgiques que permet la transmissió de l'impuls nerviós a través de la sinapsi. La funció principal de l'enzim acetilcolinesterasa (AChE) és hidrolitzar l'ACh a colina i àcid acètic a les sinapsis colinèrgiques i a les unions neuromusculars (Jebali et al., 2013).

La inhibició de l'AChE està lligada directament amb el mecanisme d'acció tòxic dels insecticides organofosforats i carbamats (Jebali et al., 2013; Rojas-García et al., 2011). Aquests fosforilen l'AChE de forma irreversible, fet que impedeix que dugui a terme la

seva funció principal. D'aquesta manera l'acumulació d'ACh produeix una acció prolongada del nervi que evita finalment que es propagui l'impuls nerviós (Jebali et al., 2013).

La inhibició de l'AChE en peixos va acompanyada per l'augment en els nivells d'acetilcolina (Üner et al., 2006; Banaee, 2013), que poden ser perillosos ja que poden tenir un impacte en la seva capacitat d'alimentar-se, en l'activitat a l'hora de nedar, i en la identificació i la orientació espacial de les espècies (Banaee et al., 2008; Banaee et al., 2011).

Durant molt de temps s'ha considerat la inhibició de l'AChE com un biomarcador específic de l'exposició a insecticides organofosforats i a carbamats (Banaee, 2013; Rojas-García et al., 2011; Schettino et al., 2012), tot i que en els últims anys la inhibició de l'acetilcolinesterasa per diverses espècies químiques com els metalls pesants, els hidrocarburs aromàtics policíclics (PAH), els detergents i components de barreges complexes de contaminants ha aparegut cada vegada més en la literatura (Jebali et al., 2013). Per tant, sembla que podria deixar de ser un biomarcador exclusiu de contaminació per pesticides.

S'han publicat nombrosos estudis on s'analitza la inhibició de l'acetilcolinesterasa en diverses espècies d'organismes aquàtics (majoritàriament peixos) sotmesos a diferents condicions de contaminació. Algunes espècies de peixos són emprades comunament en bioassajos de toxicitat i en estudis mediambientals, com és el cas de *Cyprinus carpio* i *Solea solea*. En l'estudi realitzat per Jebali et al., (2013) dut a terme en 3 llacs de Tunísia, es va mesurar l'activitat de la AChE en el cervell i el múscul de *C. carpio* sotmeses a diferents condicions ambientals adverses i es va observar una disminució de l'activitat de l'AChE en els dos òrgans analitzats. Es va realitzar un estudi similar al riu Ebre, altament contaminat per pesticides organofosforats i carbamats i metalls pesats sobre la mateixa espècie de peix, *C. carpio* i es va observar una forta inhibició de l'enzim AChE en el múscul (Lavado et al., 2006). En l'estudi realitzat per Jebali et al., (2013) es va comprovar la inhibició de AChE en el cervell de *S. solea* (espècie comú per a estudis medioambientals) en localitzacions contaminades, tot i que se'n va veure poca variació a les brànquies, al fetge i al ronyó.

- *Inducció del citocrom P450*

Les monooxigenases del citocrom P450 (CYP) són una família d'enzims que juguen un paper clau en la biotransformació de contaminants com ara els pesticides, les dioxines o els PAH (Hidrocarburs Aromàtics Policíclics). Una de les subfamílies més comuns i

més altament conservada és la CYP1A. Els biomarcadors CYP1A s'utilitzen extensament com a biomarcador d'efecte tant per a organismes vertebrats com invertebrats per a la biomonitorització ambiental, especialment en els bivalves marins i en els peixos (Valavanidis i Vlachogianni, 2010; Di Giulio i Hinton, 2008).

Diversos estudis han demostrat la relació entre l'expressió de CYP1A després de l'exposició a bifenils policlorats (PCB) i a 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-p-dioxina (TCDD) (Cook, Zabel i Peterson, 1997; Teraoka et al., 2003). Hartl et al. (2007) van observar un augment de l'activitat del citocrom P450 en la rèvola (*Scophthalmus maximus L.*) després de l'exposició d'espècimens d'aquesta espècie a sediments contaminats, en comparació a aquells espècimens control. A més a més, els nivells es van mantenir alts des de llavors.

La mesura de l'activitat de l'enzim CYP1A es pot realitzar per tècniques fluoromètriques o espectrofotomètriques, i la quantitat d'enzim es pot quantificar per kits d'ELISA (Valavanidis i Vlachogianni, 2010).

- *Síntesi de metalotioneïnes*

Les metalotioneïnes són pèptids de baix pes molecular amb un alt contingut en l'aminoàcid cisteïna (que conté un grup tiol, -SH) que es troben principalment al citosol, als lisosomes i al nucli de les cèl·lules de molts invertebrats i d'espècies de peix (Rojas-García et al., 2011).

Estan considerades com a proteïnes d'estrès ja que protegeixen les cèl·lules contra una excessiva absorció de metalls (Bauman, Liu i Klaassen, 1993) gràcies al seu elevat contingut en grups -SH, que s'encarreguen de segrestar els ions metàl·lics.

Sembla ser que aquest és sobretot un biomarcador d'exposició a metalls Zn, Cu, Cd, Hg i Fe, però també ho és per a alguns pesticides (Rojas-García et al., 2011).

- *Enzims antioxidants*

Els sistemes biològics generen espècies endògenes reactives de l'oxigen (ROS) i altres oxidants durant el seu metabolisme (Rojas-García et al., 2011). Durant el procés de desintoxicació, es produeixen ROS (Üner et al., 2006) que poden atacar i danyar indiscriminadament macromolècules de l'interior de les cèl·lules (lípid, proteïnes i ADN), provocant greus desordres en els processos fisiològics cel·lulars (Sureda et al., 2006; Tejada et al., 2007).

Els enzims antioxidants que formen la primera línia de defensa contra ROS són la superòxid dismutasa (SOD), la catalasa (CAT), la glutatió peroxidasa (GPx), la glutatió reductasa (GR), la glutatió S-transferasa (GST), la xantina oxidasa (XOD), etc (Banaee, 2013). Tot i això, si aquest sistema antioxidant no és capaç d'eliminar o neutralitzar l'excés de ROS, es produeix un risc elevat de dany oxidatiu (Üner et al., 2006).

Banaee et al., (2012) van observar una disminució significativa dels nivells de capacitat antioxidant en hepatòcits de peixos exposats a dues concentracions de diazinon (insecticida organofosforat). Un efecte similar van observar Sepici-Dinçel et al. (2009) a l'exposar carpes a concentracions subletals de ciflutrina (insecticida).

Un cop descrits els diferents mètodes de detecció de contaminació per pesticides en peixos, cal dur a terme una comparativa entre ells per tal de veure quin o quins són els més adients per al seu objectiu.

4.1.3. Discussió d'alternatives

Cal tenir en compte que el comportament esdevé el reflex dels canvis produïts en la fisiologia dels peixos, per tant, comprendre quin sistema fisiològic són pertorbats durant l'exposició a un agent tòxic és clau per interpretar els canvis en la conducta (Scott i Sloman, 2004).

Així doncs, tots els indicadors són necessaris per a tenir una imatge general i completa dels efectes que causa un agent tòxic sobre un organisme, però tot i això, encara hi ha dificultats per a correlacionar els resultats dels estudis de comportament i fisiològics per separat, ja que els efectes difereixen en funció de les espècies de peixos, del tòxic i de les condicions d'exposició (Scott i Sloman, 2004).

A l'hora de valorar d'idoneïtat dels indicadors per separat, pel que fa als indicadors de comportament poden ser una bona mesura per a la comparació, permetent una avaluació simple d'impactes ambientals potencials (Scott i Sloman, 2004).

Molts investigadors com ara Atchison, Henry i Sandheinrich (1987) han proposat l'ús d'indicadors de conducta en peixos per al monitoratge de contaminació ambiental, però ells mateixos han reconegut que tot i que els seus estudis siguin molt prometedors, han estat poc conclouents per a jutjar-ne la seva sensibilitat o utilitat. A més a més, no existeixen tests de conducta estandarditzats i pocs han estat verificats en el terreny.

Per altra banda, com a substàncies químiques que són, els contaminants tenen el seu principal efecte sobre els nivells inferiors d'organització (a nivell bioquímic, cel·lular i fisiològic) i per tant, la mesura en els nivells inferiors d'organització pot actuar com una senyal d'alerta primerenca dels efectes en els nivells superiors (Hanson, Halling i Norin, 2013; Schettino et al., 2012), tal i com mostra la figura 1.

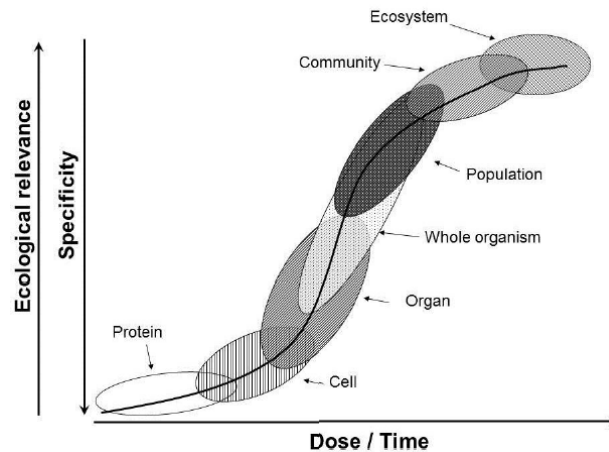


Figura 1: Representació dels biomarcadors a diferents nivells biològics segons la seva rellevància ecològica, la seva especificitat i segons el temps a partir del qual s'ha produït la contaminació. Font: Hanson, Hallin i Norin, 2013.

Els biomarcadors que són mesurats a alts nivells d'organització biològica (a nivell d'ecosistema, de comunitat, de població) solen tenir una especificitat més baixa que els mesurats a nivells inferiors (a nivell de proteïna, de cèl·lula) (Hanson, Hallin i Norin, 2013).

Els avantatges que presenten els biomarcadors han estat àmpliament mencionats en la literatura (Adedeji, Okerentugba i Okonko, 2012; Ghisi, 2012; Rojas-García et al., 2011; Romano, 1999; Valavanidis i Vlachogianni, 2010). Alguns dels avantatges inclouen el fet que siguin una senyal d'alerta primerenca d'efectes biològics adversos, que tinguin més efectivitat indicant toxicitat de mesclades complexes (Adedeji, Okerentugba i Okonko, 2012) i que siguin capaços de demostrar si un organisme ha estat exposat a un contaminant de forma significativa o no, ja que és possible determinar si la fisiologia de l'organisme és significativament diferent de la normal (Rojas-García et al., 2011). A més a més, les variacions fisiològiques i bioquímiques es poden analitzar mitjançant tècniques analítiques, molt més precises i fiables (Viant et al., 2005) que els sistemes tradicionals de detecció.

Tot i els avantatges, els biomarcadors també tenen els seus inconvenients. Tal i com descriuen Hanson, Halling i Norin (2013), no tots són bons biomarcadors i per tant cal tenir en compte alguns factors de confusió, com ara poden ser l'espècie, el sexe, la

fase de reproducció, la temperatura, el pH, la salinitat, etc. Per aquest motiu cal establir un estàndard per al monitoratge i tan sols usar espècies ben estudiades en ambients ben estudiats. També cal tenir en compte que l'anàlisi químic és econòmicament costós (Rojas-García et al., 2011).

En resum, els indicadors de comportament proporcionen informació sobre diferents nivells de la organització biològica, sent un resultat determinant dels aspectes moleculars, fisiològics i ecològics de la toxicologia (Scott i Sloman, 2004). Malgrat això, l'ús dels biomarcadors per a determinar la toxicitat en organismes aquàtics està esdevenint un camp cada vegada més estudiat, donada la transcendència del tema i la quantitat d'articles que apareixen a la bibliografia. Per aquest motiu, sembla ser que actualment el mètode més precís per a detectar una possible contaminació dels peixos per part de pesticides serien els biomarcadors. Sempre tenint en compte que la millor opció seria la combinació de tots els mètodes possibles de detecció de contaminació.

4.2. Tècniques analítiques per a l'anàlisi de biomarcadors

Pel que fa a les tècniques emprades per a l'anàlisi de biomarcadors de contaminació, la metabolòmica està resultant ser l'eina més extensament usada recentment, tenint en compte que el seu ús en ecotoxicologia (anomenada "metabolòmica mediambiental") tan sols fa 10 anys que va començar a sorgir (Samuelsson i Larsson, 2008).

En toxicologia mediambiental, la metabolòmica pot usar-se per a caracteritzar i entendre les respostes metabòliques o bioquímiques d'un organisme exposat a un agent tòxic (Lin, Viant i Tjeerdema, 2006). Presenta avantatges respecte a les altres tècniques -òmiques (genòmica, transcriptòmica i proteòmica) en el fet que mesura el resultat final després de l'exposició a un agent tòxic d'un seguit d'esdeveniments, com l'alteració de gens, dels transcrits, de les proteïnes i per últim, dels metabòlits (Bouhifd et al., 2013). Aquesta informació és molt valuosa per a dur a terme una avaluació dels riscos que suposen els productes químics en el medi ambient (Lin, Viant i Tjeerdema, 2006).

Com descriuen Hanson, Halling i Norin (2013), la metabolòmica és l'estudi sistemàtic dels metabòlits. Una empremta digital dels metabòlits pot proporcionar informació pel que fa als processos cel·lulars específics que hi han tingut lloc. L'exposició a productes químics pot canviar aquests processos, i d'aquesta manera també ho fa l'empremta digital dels metabòlits. Mitjançant l'ús de mostres d'orina, sang i saliva, la metabolòmica es pot dur a terme sense sacrificar l'organisme. D'aquesta manera, es

pot avaluar un mateix individu al llarg del temps i es poden correlacionar així canvis en la fisiologia de l'organisme.

S'han publicat molts estudis pel que fa als efectes metabòlics de l'exposició dels peixos a solvents i pesticides (Samuelsson i Larsson, 2008). Les tecnologies més comunament utilitzades en la metabolòmica són la ressonància magnètica nuclear (RMN) i l'espectrometria de masses (MS) (Peng, Li i Peng, 2015), ja que les dues permeten detectar un gran número de metabòlits amb una alta especificitat i reproductibilitat (Lin, Viant i Tjeerdema, 2006).

Pel que fa a la MS, s'ha usat en un gran nombre d'investigacions però bàsicament en aquelles basades en l'anàlisi de plantes i microbis, pel fet que presenta una gran sensibilitat (Lindon et al., 2004).

En canvi, la RMN ha estat més àmpliament emprada en els estudis envers els efectes tòxics dels pesticides i altres xenobiòtics en peixos i invertebrats aquàtics (Lin, Viant i Tjeerdema, 2006), car és una tècnica ràpida, econòmica i és capaç d'analitzar multi-biomarcadors metabòlics (Viant, Pincetich i Tjeerdema, 2006).

Viant et al. (2005) varen demostrar alguns avantatges de la metabolòmica. Van usar ^1H RMN en extractes d'embrions de medaka (*Oryzias latipes*) exposats a tricloroetilè i va resultar ser 19 vegades més sensible que altres mètodes tradicionals, com per exemple, la presència d'anomalies en la morfologia, l'èxit a l'hora d'aconseguir sortir de l'ou o la mortalitat.

En un altre estudi realitzat per Viant, Pincetich i Tjeerdema (2006) es van analitzar els efectes de tres pesticides (dinoseb, diazinon i esfenvalerat) en ous i peixos alevins de salmó reial (*Oncorhynchus tshawytscha*) mitjançant RMN i HPLC-UV. Novament, la RMN va ser més sensible que els paràmetres toxicològics tradicionals.

Això demostra doncs, el potencial de la metabolòmica en l'avaluació de riscos mediambientals (Samuelsson i Larsson, 2008). La metabolòmica podria ser molt útil per tal de determinar mecanismes d'acció, establir relacions dosi-resposta i desenvolupar biomarcadors d'exposició i d'efecte (Samuelsson i Larsson, 2008).

No obstant però, cal tenir en compte que cap tècnica (MS o RMN) és capaç de detectar tots els metabòlits existents en el metaboloma (Lin, Viant i Tjeerdema, 2006).

4.3. Tècniques analítiques per a la quantificació de residus de pesticides

Una vegada es coneix que s'ha produït una contaminació per pesticides en peixos, pot ser interessant quantificar-ne la seva presència en l'espècimen, per exemple, per a poder conèixer el grau d'impacte en l'organisme. Per a fer-ho existeixen diferents tècniques analítiques. El seu ús en diferents estudis es compara a continuació.

Els residus de pesticides en els peixos requereixen tècniques analítiques que tinguin una alta sensibilitat i baixos límits de detecció (Lazartigues et al., 2011), per aquest motiu les tècniques emprades més freqüentment en mètodes tal d'analitzar multi-residus de pesticides són actualment la GC-MS amb ionització per electroimpacte (EI) i la combinació de LC amb espectròmetres de massa en tàndem (LC-MS/MS) (Alder et al., 2006).

Tot i que existeixen bastants estudis pel que fa a l'anàlisi de mostres de pesticides en mostres d'aigua contaminada (Essumang, Togoh i Chokky, 2009; De Almeida et al., 2000; Wille et al., 2012), són pocs els que es concentren a analitzar-ne la seva presència en teixits de peixos (Lazartigues et al., 2011).

S'han publicat molts exemples de l'ús de la LC-ESI-MS (Barceló, 2000). Entre els diferents grups i exemples estudiats es poden mencionar l'aplicació per a la determinació de traces d'organofosforats, carbamats, triazines, imidazolinones, etc (Barceló, 2000). El major atractiu de la LC-ESI-MS aplicat a l'anàlisi de pesticides són els baixos límits de detecció de la tècnica a l'hora de determinar pesticides a l'aigua quan es combina amb SPE (extracció en fase sòlida), proporcionant una informació estructural suficient que permet identificar analits desconeguts (Barceló, 2000). Pot ser usada per una gran varietat de pesticides (Petrovic et al., 2010) i és especialment útil per a pesticides polars i iònics. Tot i això, aquells més hidrofòbics, que no són ions en solució o no són suficientment polars, poden presentar problemes amb l'electrosprai (Barceló, 2000).

Les tècniques ESI (ionització per electrosprai) estan sent cada cop més emprades en la realització d'analítiques mediambientals gràcies al seu elevat potencial, ja que proporcionen sensibilitat i permeten la identificació de pesticides i metabòlits desconeguts, polars i iònics (Barceló, 2000).

Lazartigues et al. (2011) van emprar exitosament la LC-MS/MS per a la quantificació de 13 tipus de pesticides en el múscul de 3 espècies de peixos: la madrilleta vera (*Rutilus rutilus*), la perca (*Perca fluviatilis*) i la carpa (*Cyprinus carpio*), aconseguint

límits de quantificació menors a 1 ppb (exceptuant dos pesticides, on els límits van ser majors).

Per altra banda, en altres estudis s'ha usat la cromatografia de gasos (GC) acoblada a espectrometria de masses (MS) com a tècnica analítica, com en els realitzats per Chen et al. (2009) i Hong et al. (2004), en els quals es quantificava la presència de pesticides organoclorats i clorats en peixos, respectivament. En aquests casos els límits de detecció foren entre 0,5 - 20 ppb i entre 0,5 – 5 ppb respectivament. Essumang, Togoh i Chokky (2009) també van utilitzar la GC en els seus estudis.

Alder et al. (2006) varen dur a terme una comparació de les dues tècniques mencionades anteriorment per tal d'esbrinar quina de les dues era la més adient per a l'anàlisi de pesticides. Per fer-ho van realitzar un estudi dels 500 més rellevants. Les conclusions a les que van arribar van ser en primer lloc, que cap de les dues permetia detectar tots els pesticides. En segon lloc, que per a tots els contaminants excepte per els d'una classe, la detecció amb LC-MS mostrava una millor sensibilitat i de major abast; en canvi, la GC-MS va mostrar un major rendiment per a una única classe, els pesticides organoclorats.

Finalment, pel que fa a una tècnica analítica molt utilitzada també per a l'anàlisi de substàncies químiques en organismes aquàtics, la ressonància magnètica nuclear (RMN), (en combinació amb l'anàlisi de dades multivariant) sembla que és molt valuosa però pel que fa als efectes ambientals de fàrmacs i altres substàncies químiques (Samuelsson et al., 2006), i no tant per a pesticides.

5. Conclusions

Pel que fa als mètodes de detecció de contaminació per pesticides en peixos, cal tenir en compte que a causa de la seva inevitable integració amb altres nivells de l'organització biològica, el comportament no pot ser considerat de forma aïllada, sinó com una eina predictiva i com un resultat d'altres processos biològics interns i externs (Scott i Sloman, 2004). És a dir, els indicadors de comportament i els biològics estan lligats i per aquest motiu la situació ideal i més beneficiosa per a la detecció de la contaminació seria la combinació d'aquests dos mètodes.

Tot i això, podem concloure que el millor mètode per a detectar una contaminació per pesticides en peixos és mitjançant l'ús de biomarcadors. És una eina que es troba en creixement i que suposa un avanç respecte als mètodes tradicionals de detecció, ja que és molt més específica i es tracta d'una senyal d'alerta primerenca. L'elevat número d'articles i revisions que mencionen la seva utilització així ho confirma. No obstant, per a aconseguir un ús efectiu i útil dels biomarcadors cal tenir en compte que estiguin estandarditzats i siguin correctament estudiats (Hanson, Halling i Norin, 2013).

Per altra banda, pel que fa a les tècniques analítiques emprades per a la detecció dels biomarcadors, sembla ser que tant la RMN com l'MS són dues bones opcions (Lin, Viant i Tjeerdema, 2006; Peng, Li i Peng, 2015), ja que ambdues han estat àmpliament usades en la literatura amb bons resultats. Tot i això, la MS sembla més aviat reservada als àmbits vegetals i microbiològics mentre que la RMN és l'elegida a l'hora d'analitzar metabòlits en peixos.

Finalment, quant a la quantificació de residus de pesticides en peixos, l'ús de les tècniques analítiques és diferent al cas anterior. En aquest cas, la utilització de l'MS predomina clarament i el que varia és la tècnica cromatogràfica usada prèviament a la MS. Segons les característiques del metabòlit en qüestió caldria utilitzar un tipus de cromatografia o una altra, però de forma general, la LC-MS mostra una millor sensibilitat i un major abast.

Tenir un major coneixement sobre com detectar la contaminació en organismes pot portar-nos a desenvolupar eines per tal de prevenir aquesta contaminació, o si més no, intentar reduir-la, per ajudar així tant a la conservació de la biodiversitat com a evitar que aquesta contaminació ens arribi als humans a través de la cadena tròfica.

Finalment, pel que fa a la realització d'aquest treball bibliogràfic, mencionar que ha estat un procés laboriós sobretot per la quantitat d'informació existent al voltant del

tema tractat. Així doncs, es va haver de llegir una gran quantitat d'articles i revisar-los acuradament per tal de seleccionar la informació necessària per a redactar el treball.

Tot i això, crec que l'elaboració d'aquest treball m'ha permès millorar pel que fa a l'ús de les bases de dades i cercadors i al tractament de la informació recopilada. L'experiència adquirida a l'hora d'elaborar-lo penso que ens pot servir tant per al nostre futur laboral, com per adonar-nos de la quantitat d'informació científica que existeix.

6. Bibliografia

- ADAIKPOH, E. O., NWAJEI, G. E., i OGALA, J. E., 2005. Heavy metals concentrations in coal and sediments from river Ekulu in Enugu, Coal City of Nigeria. *Journal of Applied Sciences and Environmental Management*, **9**(3), 5-8.
- ADEDEJI, O., OKERENTUGBA, P. i OKONKO, I., 2012. Use of Molecular, Biochemical and Cellular Biomarkers in Monitoring Environmental and Aquatic Pollution. *Nature and Science*, **10**(9), 83–104.
- AGRAWAL, A., PANDEY, R. S. i SHARMA, B., 2010. Water Pollution with Special Reference to Pesticide Contamination in India. *Journal of Water Resource and Protection*, **2**(5), 432–448.
- AKOTO, O., BRUCE, T. N. i DARKO, G., 2008. Heavy metals pollution profiles in streams serving the Owabi reservoir. *African Journal of Environmental Science and Technology*, **2**(11), 354-359.
- AKTAR, W., PARAMASIVAM, M., GANGULY, M., PURKAIT, S. i SENGUPTA, D., 2010. Assessment and occurrence of various heavy metals in surface water of Ganga river around Kolkata: a study for toxicity and ecological impact. *Environmental Monitoring and Assessment*, **160** (1-4), 207-213.
- AKTAR, W., SENGUPTA, D. i CHOWDHURY, A., 2009. Impact of pesticides use in agriculture: their benefits and hazards. *Interdisciplinary Toxicology*, **2**(1), 1–12.
- ALDER, L., GREULICH, K., KEMPE, G. i VIETH, B., 2006. Residue analysis of 500 high priority pesticides: better by GC-MS or LC-MS/MS? *Mass Spectrometry Reviews*, **25**, 838–865.
- ALMARCHA, D., 2011. Contaminants d'interès emergent: aspectes generals. *Contaminants emergents*. Col·lecció: Documents de Treball. Sèrie: Medi Ambient, 5, 10-24. Diputació de Barcelona.
- ALMARCHA, M. i RIERA, P., 2011. Significació i transcendència ambientals dels medicaments d'ús humà i veterinaris. *Contaminants emergents*. Col·lecció: Documents de Treball. Sèrie: Medi ambient, 5, 42-67. Diputació de Barcelona.
- AMMANN, A., MICHALKE, B. i SCHRAMEL, P., 2002. Speciation of heavy metals in environmental water by ion chromatography coupled to ICP-MS. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **372** (3), 448-452.
- ATCHISON, G. J., HENRY, M. G. i SANDHEINRICH, M. B., 1987. Effects of metals on fish behavior: a review. *Environmental Biology of Fishes*, **18**, 11–25.
- BANAEI, M., 2013. Physiological dysfunction in fish after insecticides exposure. *Insecticides - Development of Safer and More Effective Technologies*, 103–142.
- BANAEI, M., MIRVAGHEFI, A. R., AHMADI, K. i BANAEI, S., 2008. Determination of LC₅₀ and investigation of acute toxicity effects of diazinon on hematology and serology indices of common carp (*Cyprinus carpio*). *Journal of Marine Science and Technology Research*, **3**(2), 1-10.

- BANAE, M., SUREDA, A., MIRVAGHEFI, A. R. i AHMADI, K., 2011. Effects of diazinon on biochemical parameters of blood in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Pesticide Biochemistry and Physiology*, **99**, 1-6.
- BANAE, M., SUREDA, A., MIRVAGHEFI, A. R. i AHMADI, K., 2012. Biochemical and histological changes in the liver tissue of Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed to sub-lethal concentrations of diazinon. *Fish Physiology and Biochemistry*, **39**(3), 489-501.
- BARCELÓ, D., 2000. Sample handling and trace analysis of pollutants. *Techniques and Instrumentation in Analytical Chemistry*, **21**, 3-1138.
- BAUMAN, J. W., LIU, J. i KLAASSEN, C., 1993. Production of metallothioneins and heat shock proteins in response to metals. *Fundamental and Applied Toxicology*, **21**(1), 15-22.
- BEM, H., GALLORINI, M., RIZZIO, E. i KRZEMIN, S. M., 2003. Comparative studies on the concentrations of some elements in the urban airparticulate matter in Lodz City of Poland and in Milan, Italy. *Environment International*, **29**(4), 423- 428.
- BOUHIFD, M., HARTUNG, T., HOGBERG, H. T., KLEENSANG, A. i ZHAO, L., 2013. Review: Toxicometabolomics. *Journal of Applied Toxicology*, **33**(12), 1365-1383.
- BROWN, J. A., JOHANSEN, P. H., COLGAN, P. W. i MATHERS, R. A., 1987. Impairment of early feeding behavior of largemouth bass by pentachlorophenol exposure: a preliminary assessment, *Transactions of the American Fisheries Society*, **116**, 71–78.
- BULL, C. J. i MCINERNEY, J. E., 1974. Behavior of juvenile coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) exposed to sumithion, an organophosphate insecticide, *Journal of the Fisheries Research Board of Canada*, **31**, 1867–1872.
- CARLSON, R. W., BRADBURY, S. P., DRUMMOND, R. A. i HAMMERMEISTER, D. E., 1998. Neurological effects on startle response and escape from predation by medaka exposed to organic chemicals. *Aquatic Toxicology*, **43**, 51–68.
- CHEN, S., YU, X., HE, X., XIE, D., FAN, Y. i PENG, J., 2009. Simplified pesticide multiresidues analysis in fish by low-temperature cleanup and solid-phase extraction coupled with gas chromatography/mass spectrometry. *Food Chemistry*, **113**, 1297-1300.
- CHIVERS, D. P. i SMITH, R. J. F., 1998. Chemical alarm signaling in aquatic predator–prey systems: a review and prospectus. *Ecoscience*, **5**, 338–352.
- COOK, J. L., BAUMANN, P., JACKMAN, J. A. i STEVENSON, D., 2008. Pesticide characteristics that affect water quality.
- COOK, P. M., ZABEL, E. W. i PETERSON, R. E., 1997. The TCDD toxicity equivalence approach for characterizing risks for early life-stage mortality in trout. *A: Chemically Induced Alterations in Functional Development and Reproduction of Fishes*, Racino, Wisconsin: SETAC Press. p. 9–27.

- CUNNINGHAM, V. L., BUZBY, M., HUTCHINSON, T., MASTROCCO, F., PARKE, N. i RODEN, N., 2006. Effects of human pharmaceuticals on aquatic life: next steps. *Environmental Science & Technology*, **40**(11), 3456-3462.
- DE ALMEIDA AZEVEDO, D., LACORTE, S., VINHAS, T., VIANA, P., i BARCELÓ, D., 2000. Monitoring of priority pesticides and other organic pollutants in river water from Portugal by gas chromatography-mass spectrometry and liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, **879**(1), 13–26.
- DI GIULIO, R. T. i HINTON, D. E., 2008. *The Toxicology of Fishes*. Boca Ratón: Taylor & Francis Group.
- ESSUMANG, D. K., TOGOH, G. K. i CHOKKY, L., 2009. Pesticide residues in the water and Fish (lagoon tilapia) samples from lagoons in Ghana. *Bulletin of the Chemical Society of Ethiopia*, **23**(1), 19–27.
- GAVRILESCU, M., 2010. Environmental Biotechnology : Achievements, Opportunities and Challenges. *Dynamic Biochemistry, Process Biotechnology and Molecular Biology*, **4**, 1–36.
- GHISI, N., 2012. Relationship between biomarkers and pesticide exposure in fishes: A review. A: *Pesticides - Advances in Chemical and Botanical Pesticides*, InTech.
- GLASSMEYER, S. T., FURLONG, E. T., KOLPIN, D. W., CAHILL, J. D., ZAUGG, S. D., WERNER, S. L., MEYER, M. T. i KRYAK, D. D., 2005. Transport of chemical and microbial contaminants from known wastewater discharge: potential for use as indicators of human fecal contamination. *Environmental Science and Technology*, **36**(14), 5157–69.
- HANSON, N., HALLING, M., i NORIN, H., 2013. Biomarkers for Environmental Monitoring: Suggestions for Norwegian monitoring programmes. *Norwegian Environment Agency*, **71**.
- HARTL, M. G. J., KILEMADE, M., SHEEHAN, D., MOTHERSILL, C., O'HALLORAN, J., O'BRIEN, N. M. i VAN PELT, F. N. A. M., 2007. Hepatic biomarkers of sediment-associated pollution in juvenile turbot, *Scophthalmus maximus L.* *Marine Environmental Research*, **64**(2), 191–208.
- HATFIELD, C. T. i ANDERSON, J. M., 1972. Effects of two insecticides on the vulnerability of Atlantic salmon (*Salmo salar*) parr to brook trout (*Salvelinus fontinalis*) predation. *Journal of the Fisheries Research Board of Canada*, **29**, 27–29.
- HATJE, V., BIDONE, E. D. i MADDOCK, J. L., 1998. Estimation of the natural and anthropogenic components of heavy metal fluxes in fresh water Sinos river, Rio Grande do Sul state, South Brazil. *Environmental Technology*, **19** (5), 483-487.
- HELFRICH, L. A., WEIGMANN, D. L. i STINSON, E. R., 2009. Pesticides and aquatic animals: a guide to reducing impacts on aquatic systems. College of Agriculture and Life Sciences, Virginia Polytechnic Institute and State University.
- HONG, J., KIM, Hye-Young, KIM, Do-Gyun, SEO, J. i KIM, Kang-Jin, 2004. Rapid determination of chlorinated pesticides in fish by freezing-lipid filtration, solid-

- phase extraction and gas chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, **1038**, 27-35.
- HOOKE, S. E., GALLAGHER, E. P. i BATLEY, G. E., 2016. The role of biomarkers in the assessment of aquatic ecosystem health, **28**(10), 1304–1314.
- JEBALI, J., KHEDHER, S. BEN, SABBAGH, M., KAMEL, N., BANNI, M., i BOUSSETTA, H., 2013. Cholinesterase activity as biomarker of neurotoxicity: utility in the assessment of aquatic environment contamination. *Revista de Gestão Costeira Integrada*, **13**(4), 525–537.
- KAR, D., SUR, P., MANDAL, S. K., SAHA, T. i KOLE, R. K., 2008. Assessment of heavy metal pollution in surface water. *International Journal of Environmental Science and Technology*, **5**(1), 119-124.
- KASUMYAN, A. O., 2001. Effects of chemical pollutants on foraging behavior and sensitivity of fish to food stimuli. *Journal of Ichthyology*, **41**(1), 76–87.
- LAVADO, R., UREÑA, R., MARTIN-SKILTON, R., TORREBLANCA, A., DEL RAMO, J., RALDÚA, D. i PORTE, C., 2006. The combined use of chemical and biochemical markers to assess water quality along the Ebro River. *Environmental Pollution*, **139**(2), 330-339.
- LAZARTIGUES, A., WIEST, L., BAUDOT, R., THOMAS, M., FEIDT, C. i CREN-OLIVÉ, C., 2011. Multiresidue method to quantify pesticides in fish muscle by QuEChERS-based extraction and LC-MS/MS. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **400**(7), 2185–2193.
- LEE, C. L., LI, X. D., ZHANG, G., LI, J., DING, A. J. i WANG, T., 2007. Heavy metals and Pb isotopic composition of aerosols in urban and suburban areas of Hong Kong and Guangzhou, South China evidence of the long-range transport of air contaminants. *Environmental Pollution*, **41**(2), 432-447.
- LIN, C. Y., VIANT, M. R. i TJEERDEMA, R. S., 2006. Metabolomics: Methodologies and applications in the environmental sciences. *Journal of Pesticide Science*, **31**(3), 245–251.
- LINDON, J. C., HOLMES, E., BOLLARD, M. E., STANLEY, E. G. i NICHOLSON, J. K., 2004. Metabonomics technologies and their applications in physiological monitoring, drug safety assessment and disease diagnosis. *Biomarkers*, **9**(1), 1–31.
- LITTLE, E. E., ARCHESKI, R. D., FLEROV, B. A. i KOZLOVSKAYA, V. I., 1990. Behavioral indicators of sublethal toxicity in rainbow trout. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, **19**(3), 380–385.
- LITTLE, E. E., DWYER, F. J., FAIRCHILD, J. F., DELONAY, A. J. i ZAJICEK, J. L., 1993. Survival of bluegill and their behavioral responses during continuous and pulsed exposures to esfenvalerate, a pyrethroid insecticide. *Environmental Toxicology and Chemistry*, **12**, 871–878.
- LOHANI, M. B., SINGH, S., RUPAINWAR, D. C., DHAR, D. N., 2008. Seasonal variations of heavy metal contamination in river Gomti of Lucknow city region. *Environmental Monitoring and Assessment*, **147** (1-3), 253-263.

- MATHERS, R. A., BROWN, J. A. i JOHANSEN, P. H., 1985. The growth and feeding behaviour responses of largemouth bass (*Micropterus salmoides*) exposed to PCP. *Aquatic Toxicology*, **6**, 157–164.
- MATTHIESSEN, P. i LOGAN, J. W. M., 1984. Low concentration effects of endosulfan insecticide on reproductive behaviour in the tropical cichlid fish *Sarotherodon mossambicus*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, **33**, 575–583.
- NOURI, J., MAHVI, A. H., BABAEI, A. i AHMADPOUR, E., 2006. Regional pattern distribution of groundwater fluoride in the Shush aquifer of Khuzestan County Iran Fluoride. *Fluoride*, **39** (4), 321-325.
- NOURI, J., MAHVI, A. H., JAHED, G. R. i BABAEI, A. A., 2008. Regional distribution pattern of groundwater heavy metals resulting from agricultural activities. *Environmental Geography*, **55** (6), 1337-1343.
- PENG, Bo, LI, H., i PENG, Xuan-Xian, 2015. Functional metabolomics: from biomarker discovery to metabolome reprogramming. *Protein and Cell*, **6**(9), 628–637.
- PETROVIC, M., FARRÉ, M., DE ALDA, M. L., PEREZ, S., POSTIGO, C., KÖCK, M., RADJENOVIC, J., GROS, M. i BARCELÓ, D., 2010. Recent trends in the liquid chromatography-mass spectrometry analysis of organic contaminants in environmental samples. *Journal of Chromatography A*, **1217**(25), 4004–4017.
- PIMENTEL, D., 2009. Environmental and economic costs of the application of pesticides primarily in the United States. A: *Integrated Pest Management: Innovation-Development Process*, **1**, 89-111.
- RAJESH, K. K., ABHISHEK, K. J. i RAJESH, S. Y., 2016. Biomarkers: an essential gizmo in pesticide toxicity. *Biomarkers Journal*, **2**(1), 1–5.
- ROJAS-GARCÍA, A., MEDINA-DÍAZ, I., ROBLEDO-MARENCO, M., BARRÓN-VIVANCO, B. i PÉREZ-HERRERA, N., 2011. Pesticide Biomarkers. A: *Pesticides in the Modern World – Pests Control and Pesticides Exposure and Toxicity Assessment*, 161–190.
- ROMANO, L., 1999. Bioindicadores de contaminación acuática en peces. *Aquatic*, **7**.
- SAGLIO, P., OLSÉN, K. H. i BRETAUD, S., et al., 2001. Behavioral and olfactory responses to prochloraz, bentazone, and nicosulfuroncontaminated flows in goldfish. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, **41**(2), 192–200.
- SAGLIO, P. i TRIJASSE, S., 1998. Behavioral responses to atrazine and diuron in goldfish. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, **35**(3), 484–491.
- SAGLIO, P., TRIJASSE, S. i AZAM, D., 1996. Behavioral effects of waterborne carbofuran in goldfish. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, **31**(2), 232–238.
- SAMUELSSON, L. M., FÖRLIN, L., KARLSSON, G., ADOLFSSON-ERICI, M. i LARSSON, D.G., 2006. Using NMR metabolomics to identify responses of an

- environmental estrogen in blood plasma of fish. *Aquatic Toxicology*, **78**(4), 341-349.
- SAMUELSSON, L. M., i LARSSON, D. G. J., 2008. Contributions from metabolomics to fish research. *Molecular BioSystems*, **4**(10), 974.
- SCHETTINO, T., CARICATO, R., CALISI, A., GIORDANO, M. E., i LIONETTO, M. G., 2012. Biomarker approach in marine monitoring and assessment : new insights and perspectives. *Open Environmental Science*, **6**, 20–27.
- SCHOLZ, N. L., TRUELOVE, N. K., FRENCH, B. L., BEREJIKIAN, B. A., QUINN, T. P., CASILLAS, E. i COLLIER, T. K., 2000. Diazinon disrupts antipredator and homing behaviors in chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, **57**(9), 1911–1918.
- SCHOLZ, N. L., et al., 2012. Recurrent die-offs of adult Coho salmon returning to spawn in Puget Sound lowland urban streams. *Plos One*, **6**(12), e28013.
- SCOTT, G. R., i SLOMAN, K. A., 2004. The effects of environmental pollutants on complex fish behaviour: Integrating behavioural and physiological indicators of toxicity. *Aquatic Toxicology*, **68**(4), 369–392.
- SEPICI-DINÇEL, A., BENLI, A. Ç. K., SELVI, M., SARIKAYA, R., SAHIN, D., ÖZKUL, I. A., i ERKOÇ, F., 2009. Sublethal cyfluthrin toxicity to carp (*Cyprinus carpio* L.) fingerlings: Biochemical, hematological, histopathological alterations. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **72**(5), 1433-1439.
- SHARMA, Dushyant Kumar i SHARMA, Tripti, (2013). Biotechnological approaches for biodiversity conservation. *Indian Journal of Scientific Research*, **4**(1), 183–186.
- SMITH, R. J. F., 1992. Alarm signals in fishes. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, **2**(1), 33–63.
- SUREDA, A., BOX, A., ENSENAT, M., ALOU, E., TAULER, P., DEUDERO, S. i PONS, A., 2006. Enzymatic antioxidant response of a labrid fish (*Coris julis*) liver to environmental caulerpyne. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, **144**(2), 191-196.
- SUTHAR, S. i SINGH, S., 2008. Vermicomposting of domestic waste by using two epigeic earthworms (*Perionyx excavatus* and *Perionyx sansibaricus*). *International Journal of Environmental Science and Technology*, **5** (1), 99-106.
- SYMONS, P. E. K., 1973. Behavior of young Atlantic salmon (*Salmo salar*) exposed to or force-fed fenitrothion, an organophosphate insecticide. *Journal of the Fisheries Research Board of Canada*, **30**(5), 651–655.
- TANNER, D. K. i KNUTH, M. L., 1996. Effects of esfenvalerate on the reproductive success of the bluegill sunfish, *Lepomis macrochirus* in littoral enclosures. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, **31**(2), 244–251.
- TEJADA, S., SUREDA, A., ROCA, C., GAMUNDÍ, A. i ESTEBAN, S., 2007. Antioxidant response and oxidative damage in brain cortex after high dose of pilocarpine. *Brain Research Bulletin*, **71**(4), 372-375.
- TERAOKA, H., DONG, W., TSUJIMOTO, Y., IWASA, H., ENDOH, D., UENO, N., STEGEMAN, J. J., PETERSON, R. E. i HIRAGA, T., 2003. Induction of cytochrome P450 1A is required for circulation failure and edema by 2,3,7,8–

- tetrachlorodibenzo-p-dioxin in zebrafish. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **304**(2), 223-228.
- TERNES, T. A., 1998. Occurrence of drugs in German sewage treatment plants and rivers. *Water Research*, **32**(11), 3245–3260.
- TRUDEAU, V. L., METCALFE, C. D., MIMEAULT, C. i MOON, T. W., 2005. Pharmaceuticals in the environment: Drugged fish? *Biochemistry and Molecular Biology of Fishes*, **6**, 475–493.
- ÜNER, N., ORUÇ, E. Ö., SEVGILER, Y., SAHIN, N., DURMAZ, H. i USTA, D., 2006. Effects of diazinon on acetylcholinesterase activity and lipid peroxidation in the brain of *Oreochromis niloticus*. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, **21**(3), 241-245.
- VALAVANIDIS, A. i VLACHOGIANNI, T., 2010. Integrated biomarkers in aquatic organisms as a tool for biomonitoring environmental pollution and improved ecological risk assessment. *Science Advances on Environmental, Toxicology & Ecotoxicology Issues*, 1–12.
- VIANT, M. R., PINCETICH, C. A., i TJEERDEMA, R. S., 2006. Metabolic effects of dinoseb, diazinon and esfenvalerate in eyed eggs and alevins of Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) determined by ¹H NMR metabolomics. *Aquatic Toxicology*, **77**(4), 359–371.
- VIANT, M. R., BUNDY, J. G., PINCETICH, C. A., DE ROPP, J. S. i TJEERDEMA, R. S., 2005. NMR-derived developmental metabolic trajectories: an approach for visualizing the toxic actions of trichloroethylene during embryogenesis. *Metabolomics* **1**(2), 149–158.
- WILLE, K., DE BRABANDER, H. F., VANHAECKE, L. i DE WULF, E., 2012. Coupled chromatographic and mass-spectrometric techniques for the analysis of emerging pollutants in the aquatic environment. *Trends in Analytical Chemistry*, **35**, 87-108.
- WONG, C. S. C., LI, X. D., ZHANG, G., QI, S. H. i PENG, X. Z., 2003. Atmospheric deposition of heavy metals in the Pearl River Delta, China. *Atmospheric Environment*, **37**(6), 767- 776.
- WU, M., ATCHLEY D., GREER L., JANSSEN S., ROSENBERG D. i SASS J., 2010. Dosed without prescription: preventing pharmaceutical contamination of our nation's drinking water. *Environmental Science & Technology*, **45**(2), 366-367.