



BIOMARCADORES COMO FERRAMENTA NA AVALIAÇÃO DA QUALIDADE AMBIENTAL EM ECOSISTEMAS AQUÁTICOS SUSCETÍVEIS À CONTAMINAÇÃO POR PESTICIDAS



BIOMARKERS AS A TOOL TO EVALUATE ENVIRONMENTAL QUALITY OF AQUATIC ECOSYSTEMS SUSCEPTIBLE TO PESTICIDE CONTAMINATION

SALVO, Lígia Maria 1*; SANTIAGO, Magda Regina²; SILVA DE ASSIS, Helena Cristina³

¹ Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (USP). Av. Prof. Lineu Prestes, 1524, sala 409. CEP: 05508-900, São Paulo-SP, Brasil. (fone: +55 11 3091722)

² Instituto Biológico, Laboratório de Toxicologia, Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Proteção Ambiental, Av. Conselheiro Rodrigues Alves, 1252 - Vila Mariana. CEP: 04014-002 São Paulo – SP, Brasil. (fone: +55 11 50871701)

³ Universidade Federal do Paraná, Departamento de Farmacologia, Rua Cel. Francisco H. dos Santos, 100 - Centro Politécnico - Jardim das Américas - Caixa Postal 19031 CEP: 81531-980 - Curitiba, PR, Brasil. (fone: +55 41 33611693)

* Corresponding author
e-mail: ligiams@usp.br

Received 16 January 2018; received in revised form 29 January 2018; accepted 30 January 2018

RESUMO

Os biomarcadores podem ser definidos como alterações biológicas em resposta a exposição dos organismos vivos aos poluentes ambientais, as quais podem ser mensuradas, indicando a presença e, em alguns casos, o grau de contaminação. Em países desenvolvidos, o uso e desenvolvimento de novos biomarcadores de contaminação ambiental em programas de biomonitoramento e gestão de recursos hídricos, têm sido amplamente utilizados. Estudos indicam que a má qualidade dos corpos d'água em decorrência da poluição por efluentes agrícolas tem aumentado consideravelmente. As atuais práticas de produção de alimentos resultam na utilização de uma indiscriminada mistura de classes de poluentes como organoclorados, organofosforados, carbamatos e piretróides, dentre outros, os quais podem causar sérios impactos no meio hídrico. Algumas dessas substâncias são de natureza bioacumulativa e tendem a se concentrar na medida em que avançam nos níveis tróficos. O presente trabalho visa discutir e comparar a utilização de múltiplos biomarcadores de contaminação ambiental (químicos, bioquímicos e celulares) em espécies de peixes de águas continentais expostos subletalmente a diversos contaminantes. Podemos destacar uma indução significativa na concentração total de CYP450 em carpas (*Cyprinus carpio*) expostas ao endossulfan e aumento dos níveis de atividade de EROD em bagres (*Ancistrus multispinis*) expostos a deltametrina.

Palavras-chave: Biomarcadores, pesticidas, recursos hídricos.

ABSTRACT

Biomarkers or biological markers are measurable biological responses of living organisms which can indicate the presence of environmental pollutants and, eventually, contamination levels. Usage and development of new environmental contamination biomarkers are increasingly widespread in biological monitoring and water resource management programs in developed countries. Recent studies indicate poor quality of water bodies as a result of pollution from agricultural effluents has increased considerably. Current practices in food production often result in the use of an indiscriminate mixture of classes of pollutants such as organochlorines, organophosphates, carbamates and pyrethroids, among others, which can produce serious impacts to the water environment. Some of these substances are bioaccumulative, that is, they tend to increase in concentration in upper trophic levels. Studies using multiple environmental contamination

biomarkers are increasingly relevant. The present work aims to discuss and compare the use of chemical, biochemical and cellular environmental contamination biomarkers in continental freshwater fish species exposed to sublethal concentrations of various contaminants. Among the results, we can highlight a significant increase in the total concentration of CYP450 in carps (*Cyprinus carpio*) sublethally exposed to the endosulfan, and increased levels of EROD activity in armored catfish (*Ancistrus multispinis*) exposed to sublethal concentrations of deltamethrin.

Keywords: *Biomarkers, Pesticides, Water Resources.*

INTRODUÇÃO

Estudos indicam que a má qualidade dos corpos d'água em decorrência da poluição por efluentes agrícolas tem aumentado consideravelmente. As atuais práticas de produção de alimentos resultam na utilização de uma indiscriminada mistura de classes de poluentes como organoclorados, organofosforados, carbamatos e piretróides dentre outros, os quais podem causar sérios impactos no meio hídrico.

De acordo com a EPA (United States Environmental Protection Agency, 2017) pesticida é qualquer substância ou mistura de substâncias destinadas a prevenir, destruir, repelir ou mitigar qualquer tipo de "praga", ou seja, de quaisquer espécies indesejadas. São substâncias que podem matar diretamente um organismo ou controlá-lo de alguma maneira, apresentando em comum, a propriedade de bloquear seus processos metabólicos vitais para os quais são tóxicos. São classificados quanto a sua finalidade, ou seja, em qual praga será utilizado (herbicidas, inseticidas, fungicidas, acaricidas, bactericidas, rodenticidas, hematicidas e vermífugos), quanto à origem e de acordo com sua estrutura química organoclorados, organofosforados, carbamatos, piretróides, etc (BAIRD, 2002). O comportamento do agrotóxico no ambiente é muito complexo e vai depender desde as características físico-químicas, tanto do meio quanto do composto, do princípio ativo e do modo de aplicação. Sejam quais forem essas características e o modo de aplicação, o potencial de atingir vários compartimentos ambientais é enorme.

Os compostos sofrem processos físicos, químicos ou biológicos, os quais podem modificar as suas propriedades e influenciar no seu comportamento, inclusive com a formação de subprodutos com propriedades absolutamente distintas do produto inicial e

cujos danos à saúde ou ao meio ambiente também são diferenciados. Qualquer que seja o caminho do agrotóxico no meio ambiente, invariavelmente, o homem é seu potencial receptor (Ministério Do Meio Ambiente, 2015).

Segundo Choudhury *et al.* (2008), os pesticidas são um dos grupos de poluentes mais representativos no que diz respeito à contaminação ambiental, principalmente devido ao seu uso em escala crescente na agricultura mundial, inclusive em países em desenvolvimento.

No Brasil, o modelo de agricultura intensiva, fez com que os agrotóxicos tivessem um papel preponderante no desenvolvimento da mesma, tanto, que o país se encontra em posição de destaque sendo considerado o maior consumidor mundial de produtos agrotóxicos (Ministério do Meio Ambiente, 2015).

Apesar dessa posição, no Brasil não há um programa unificado ou sistematizado de controle de contaminação ambiental por estes produtos em nível nacional. São muitos os relatos de contaminação de alimentos e do meio ambiente, onde são detectados níveis elevados de pesticidas, ou de múltiplos ingredientes ativos numa mesma amostra além da presença de resíduos de agrotóxicos não autorizados no país, sinalizando a ocorrência de contrabando. Todos, sem autorização de uso para a cultura indicada de acordo com o Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos (PARA) divulgados pela ANVISA em 2012. Sendo assim, a utilização indiscriminada de agrotóxicos e a falta de informações precisas, geram lacunas onde não é possível estimar o grau de contaminação ambiental e muito menos seus efeitos sobre a saúde humana [Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa), 2014].

Após adentrar o meio ambiente aquático, os resíduos de pesticidas, dependendo de suas características físico-químicas, podem se ligar

ao material particulado em suspensão, se depositar no sedimento ou serem absorvidos por organismos aquáticos para serem detoxificados. Porém, quando isso acontece com poluentes orgânicos persistentes (POPs), por serem tóxicos, possuírem meia-vida longa e serem extremamente lipofílicos, esses compostos podem se bioacumular nos organismos e biomagnificar-se ao longo de toda cadeia trófica. Estão diretamente relacionados a disfunções hormonais, imunológicas, neurológicas e reprodutivas.

Segundo Cella (2010), a determinação de vestígios de pesticidas requer tanto instrumentos analíticos de alta precisão como a preparação eficiente das amostras. A análise das águas naturais para pesticidas é reconhecida como complexa, uma vez que várias centenas de pesticidas com diferentes propriedades físicas e químicas são amplamente utilizados para fins agrícolas. A análise também é considerada difícil e propensa a erros devido às concentrações muito baixas desses compostos (Alder *et al.*, 2006). Mesmo nesses casos, onde as concentrações detectadas são ínfimas, dentro dos limites permitidos pela legislação vigente, como ficam os compostos com potencial de bioacumulação no que se refere à saúde dos organismos? Como avaliar o quanto desses compostos estão sendo absorvidos pelos organismos e quais efeitos deletérios estão causando nos mesmos e em suas populações?

As análises físico-químicas são imprescindíveis para detecção desses compostos, mas o ideal seria que as mesmas fossem acompanhadas de informações mais complexas no que se refere à homeostase ambiental e saúde dos organismos.

Os biomarcadores podem ser definidos como alterações biológicas em resposta a exposição dos organismos vivos aos poluentes ambientais, as quais podem ser mensuradas, indicando a presença e, em alguns casos, o grau de contaminação (Walker *et al.*, 1996). Evidenciado desde os níveis mais básicos de organização biológica, os biomarcadores permitem avaliar os efeitos dos xenobióticos no ecossistema e suas interações, e prognosticar se o mesmo será capaz de exercer ou não efeitos deletérios sobre uma comunidade (Huggett *et al.*, 1992). Apresentam relativa especificidade toxicológica, rapidez e baixo custo de análises (Stegeman *et al.*, 1993;

HAHN, 2001).

São vários os biomarcadores que podem ser utilizados para avaliar se os organismos pertencentes a um determinado ecossistema aquático estão sofrendo injúrias decorrentes da contaminação por xenobióticos (Figura1).

MATERIAIS E MÉTODOS

Em peixes, um grande número de biomarcadores relacionados à exposição a poluentes tem sido propostos para avaliar a qualidade ambiental como, por exemplo, biomarcadores fisiológicos, histopatológicos, celulares, bioquímicos, endócrinos, metabólicos, hematológicos, genotóxicos e iônicos dentre outros (Adams *et al.*, 1990; Van Der Oost *et al.*, 2003).

Seguem alguns desses métodos:

a. **Índices fisiológicos como o fator de condição (FC):**

As avaliações morfométricas macroscópicas foram feitas de acordo com Weibel *et al.* (1969). Foi calculada a relação entre o peso corporal do animal e o peso do fígado, expresso pelo índice somático hepático e o fator de condição de acordo com as seguintes fórmulas:

$FC = \text{fator de condição} (100 \times \text{peso do corpo} / \text{comprimento do corpo})$

$ISH = \text{índice somático hepático} (100 \times \text{peso do fígado} / \text{peso do corpo})$

b. **Etoxiresorufina O-deetilase (EROD):**

Essa reação é dependente de NADPH e a partir do substrato artificial etoxiresorufina (7ER) onde é formado o produto resorufina (Klotz *et al.*, 1984). A medida enzimática foi realizada em espectrofotômetro de fluorescência (excitação 530 nm e emissão 590 nm).

c. **Atividade Enzimática:**

Homogeneização: fragmentos do fígado dos peixes foram retirados e homogeneizados em tampão fosfato 0,1M; pH 8.0 utilizando Ultra-Turrax (IKA) sob refrigeração constante. Em seguida, o homogenato foi centrifugado a 10000 x g por 20 minutos a 4°C, o sobrenadante foi coletado e colocado em ampolas criogênicas as quais foram acondicionadas em nitrogênio líquido para posterior análises enzimáticas

(Salvo *et al.*, 2012, 2016).

Conteúdo protéico: A determinação do conteúdo protéico foi realizada segundo o método de Bradford (1976) utilizando-se como padrão soro albumina bovina (SIGMA®).

Atividade da Catalase: a velocidade de decomposição da H₂O₂ pela enzima foi acompanhada pelo decréscimo da absorbância a 240 nm, em espectrofotômetro de acordo com AEBI, 1984. Os valores de atividade da CAT serão expressos em mmol.min⁻¹.mg proteína⁻¹.

Atividade da Superóxido Dismutase: as SOD (Cu, Zn-SOD+ Mn-SOD) foram medidas com base na capacidade dessas enzimas em inibir a redução do azul de nitrotetrazólio (NBT) pelo ânion superóxido (O²⁻) gerado a partir da auto-oxidação da hidroxilamina em pH alcalino (Crouch *et al.*, 1981).

Atividade da Glutathione S-transferase: foi medida em 340 nm em espectrofotômetro de acordo com o método de Keen *et al.* (1976), utilizando 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) e glutathione reduzida (GSH) como substrato. Os valores de atividade da GST foram expressos em mmol.min⁻¹.mg proteína⁻¹.

d. Micronúcleo:

O sangue periférico do peixe foi retirado por punção caudal com seringas previamente heparinizadas e lâminas de extensão foram confeccionadas. Para o teste de micronúcleo foram utilizadas as técnicas descritas por Heddle *et al.*, 1973, com algumas modificações (Salvo *et al.*, 2016) onde as lâminas foram coradas com iodeto de propídio. As imagens fluorescentes foram obtidas com o microscópio de fluorescência Nikon ECLIPSE E1000M (528 and 553 nm).

e. Histopatologia:

Os fígados e as brânquias foram retirados seccionados em pequenos fragmentos de 3mm, fixados em solução de McDowell por 12 horas, desidratados em álcool e incluídos em Paraplast (Sigma®). Os cortes foram feitos em micrótomo e as lâminas montadas em resina e coradas (PAS e HE). As imagens analisadas no microscópio de luz foram capturadas pela câmera digital AxioCam conectada à um microscópio Axiomat (Zeiss). A avaliação das alterações morfológicas foi feita de acordo com o método de Bernet *et al.* (1999).

Índices fisiológicos como o fator de condição (FC), podem informar o estado geral dos peixes, uma alteração nos índices do FC pode ser um indicativo de efeitos tóxicos nos organismos avaliados (Figueiredo-Fernandes, 2006). Estudos relatam que, em várias espécies de peixes, classes de poluentes como organoclorados, organofosforados, metais dentre outros, podem afetar significativamente o peso de órgãos vitais como fígado. Salvo *et al.*, 2008, verificaram que peixes da espécie *Cyprinus carpio* expostos subletalmente ao organoclorado endosulfan, o qual recentemente teve sua utilização proibida no Brasil, tiveram o peso de seus fígados reduzidos assim como o índice somático hepático, quando comparados ao grupo controle.

Como principal órgão responsável pela detoxificação, biotransformação e excreção de xenobióticos, o fígado tem sido amplamente estudado, assim como todos os processos de biotransformação.

O sistema de monooxigenases hepáticas, também conhecido como CYP450 é um dos biomarcadores bioquímicos induzidos por compostos orgânicos lipofílicos como os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs), as bifenilas policloradas (PCBs) e as dibenzo-p-dioxinas policloradas (PCDDs) entre outros.

Esse sistema pertence à fase I de biotransformação, onde compostos lipofílicos hidrofóbicos são transformados em compostos mais hidrossolúveis por meio de reações oxidativas (desalquilação, hidroxilação, oxidação e desaminação) e de hidrólise. São responsáveis pela detoxificação dos organismos e exerce função essencial no metabolismo de xenobióticos. O CYP450 é constituído por uma família de genes denominados CYP e subdividido em várias outras subfamílias. Tratando especificamente de organismos aquáticos, a indução da subfamília denominada CYP1A1 é expressa cataliticamente pela atividade de algumas enzimas específicas (Buchelli e Fent, 1995), dentre elas a etoxiresorufina O- deetilase (EROD), (Goksøyr & Förlin, 1992; Stegeman, 1995). A EROD catalisa a reação de O-desalquilação, dependente de NADPH, na qual o substrato é a 7- etoxiresorufina (7ER). Por ser de fácil aplicação, a EROD está sendo utilizada em vários países como um dos parâmetros a serem avaliados no biomonitoramento de

RESULTADOS E DISCUSSÃO:

ecossistemas aquáticos. Dentre os resultados encontrados podemos destacar uma indução significativa na concentração do CYP450 total da fração microsomal hepática do grupo de carpas (*C. carpio*) expostas subletalmente ao organoclorado endossulfan (327.2 ± 52.6 pmol.mg prot⁻¹) quando comparadas ao grupo de carpas controle (180.4 ± 31.1 pmol.mg prot⁻¹) (SALVO *et al.*, 2012). Já, a espécie nativa *Ancistrus multispinis* quando expostas a concentrações subletais do piretróide deltametrina, tiveram seus níveis de atividade da EROD aumentadas (Silva de Assis *et al.*, 2009; Salvo *et al.*, 2012).

Outros importantes tipos de biomarcadores são as enzimas de conjugação de xenobióticos e os antioxidantes. Durante a fase I de biotransformação, podem ser gerados metabólitos intermediários eletrofílicos, tais como o radical ânion superóxido (O²⁻), o radical hidroxila (OH⁻) e o peróxido de hidrogênio (H₂O₂) que podem reagir com as biomoléculas desencadeando processos citotóxicos ou genotóxicos. Esses metabólitos são na maioria das vezes conjugados a moléculas endógenas de baixo peso molecular, para aumentar sua hidrossolubilidade e facilitar sua excreção. A célula está constantemente produzindo espécies reativas de oxigênio (ERO), porém, essa produção é mantida em níveis mínimos através dos mecanismos defensivos enzimáticos e não-enzimáticos, conhecidos como antioxidantes, que são capazes de anular o efeito desses radicais. Na maioria das vezes esses mecanismos agem impedindo a reação entre (H₂O₂) e (O²⁻), na formação do radical •OH. Dentre os agentes antioxidantes não enzimáticos encontram-se alguns pigmentos especializados como carotenóides, melaninas e algumas proteínas ligantes de metais. Quanto aos agentes enzimáticos podemos destacar os mais importantes como a superóxido dismutase (SOD), a glutatona peroxidase (GPx) e a catalase (CAT).

Quando a produção de ERO está aumentada e os sistemas de defesa estão diminuídos estabelece-se uma situação de estresse oxidativo (Timbrell, 1991). Tratando-se de exposição à HPAs, enzimas como as glutatona S-transferases (GST), as UDP-glicuronosiltransferases e as sulfotransferases também são de extrema importância (Varanasi, 1989). Essas enzimas catalisam as reações de conjugação de glutatona (GSH), de ácido

glicurônico e de sulfato, aos metabólitos da fase I para que estes possam ser, posteriormente, excretados pelo fígado, rim, brânquias e pulmões (Goksøyr & Förlin, 1992; Salvo, 2012, 2016).

A aplicação de biomarcadores de genotoxicidade em organismos sentinelas permite a avaliação de perigos mutagênicos e/ou a identificação das fontes e destino dos contaminantes.

O teste do micronúcleo (MN) em eritrócitos de peixes foi validado em laboratório com diferentes espécies após exposição a um grande número de agentes genotóxicos. Esse teste está sendo amplamente utilizado para avaliação da genotoxicidade de xenobióticos tanto em águas continentais como em ambiente marinho *in situ* utilizando animais nativos ou em sistemas fechados em diferentes períodos de exposição (Bolognesi e Hayashi, 2011; Salvo *et al.*, 2016).

Os biomarcadores celulares apesar de inespecíficos (Wester *et al.*, 2002), são de extrema importância para correlacionar as alterações bioquímicas e fisiológicas causadas por xenobióticos. As subseqüentes exposições dos organismos a estressores ambientais podem induzir a síntese de enzimas específicas, resultando na formação de altas concentrações de intermediários tóxicos as quais podem exceder os mecanismos protetores da célula, levando à toxicidade e conseqüente necrose tecidual (Huggett *et al.*, 1992).

A ocorrência de alterações celulares e teciduais em fígado e brânquias de peixes, decorrentes da exposição a estressores ambientais como PCBs, HPAs, organoclorados, organofosforados, metais pesados dentre outros, tem sido relatadas por vários autores (Bainy *et al.*, 1996; Salvo *et al.*, 2008).

CONCLUSÕES:

Estudos utilizando múltiplos biomarcadores de contaminação ambiental em diferentes espécies de peixes são cada vez mais relevantes, pois somente a partir desses estudos é que serão possíveis a padronização e adequação de metodologias que visem avaliar os efeitos causados por xenobióticos, inclusive os pesticidas, com maior especificidade e sensibilidade.

Muitas avaliações têm sido levadas a efeito geralmente para determinar as concentrações letais à exposição aguda dos organismos aos poluentes. Estes estudos resultam na maioria das vezes na morte dos organismos trazendo poucas informações a respeito do que está acontecendo no meio ambiente como um todo em níveis mais sutis de exposição. Apesar de menos aparentes, as situações de exposição crônica em níveis subletais de contaminantes, podem causar sérios danos aos ecossistemas, principalmente aos ecossistemas aquáticos.

Os biomarcadores de contaminação ambiental devem ser utilizados como instrumento de extrema importância na avaliação e biomonitoramento de ecossistemas aquáticos em áreas suscetíveis à contaminação por pesticidas, assim como, no gerenciamento e controle de áreas já impactadas.

O Brasil sendo o maior consumidor de agrotóxicos do mundo, necessita da elaboração e implementação de políticas públicas para preservação dos recursos hídricos, que sejam realmente efetivas e de acordo com os padrões internacionais de potabilidade e Saúde Pública.

ACKNOWLEDGMENTS:

FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) Processo: 99/12198-0

CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico).

REFERÊNCIAS

1. Adams, S.M., Shugart, L.R., Southworth, G.R., Hinton, D.E. Application of bioindicators in assessing the health of fish population experiencing contaminant stress; McCarthy, J.F.; Shugart, L.R. (Eds.). *Biomarkers of Environmental Contamination*. Lewis Publishers: Boca Raton, 1990, c19, 333-353.
2. Alder, L.; Greulich, K.; Kempe, G.; Vieth, B. Residue analysis of 500 high priority pesticides: better by GC-MS or LC-MS / MS ?, *Mass Spectrometry Review*, **2006**, 25(6), 838-865.
3. Bainy, A.C.D.; Saio, E., Carvalho, P. S. M.; Junqueira, V. B. C. Oxidative stress

- in gill, erythrocytes, liver and kidney of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) from a polluted site. *Aquatic Toxicology*, **1996**, 34, 151-162.
4. Baird, Colin; Química Ambiental. Produtos Orgânicos Tóxicos. 2ª Ed. Bookman: Porto Alegre, 2002. 622p.
5. Bernet, D.; Schimidt, H.; Meier, W.; Burkhardt-Holm, P.; Wahli, T. Histopathology in fish: proposal for a protocol to assess aquatic pollution. *Journal of Fish Diseases*, **1999**, 22, 25-34.
6. Bolognesi, C., Hayashi, M. Micronucleus assay in aquatic animals. *Mutagenesis*. **2011**, 26, 205-213.
7. Bradford, M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochemistry*. **1976**, 72, p. 248-254.
8. Bucheli, T.B.; Fent, K. Induction of cytochrome P450 as a biomarker for environmental contamination in aquatic ecosystems. *Crit. Rev. Environmental Science Technology*. **1995**, 25, 201-268.
9. Cella, A.L.; Moura-Andrade, G.C.R.; Freguglia, R. M. O. ; Tornisiello, V. L.. Evaluation of organochlorine pesticide residues and fipronil in Corumbataí river basin, Piracicaba. *Journal of Pharmacy*, **2012**, 2(5), 61-66.
10. Choudhory, A.; Prochan, S.; Soho, M.; Sanjal, N. Impact of pesticide on soil microbiology parameters and possible bioremediation strategies. *Indian Journal of Microbiology*. **2008**, 48, 114-127.
11. Crouch, R.K., Gandy, S.C., Kimsey, G. The inhibition of islet superoxide dismutase by diabetogenic drugs. *Diabetes* **1981**, 30, 235-241.
12. Embrapa. Brazilian Agricultural Research Corporation. Authorship: Gomes, M. A. F.; Barizon, R. R. M. Panorama da Contaminação Ambiental por Agrotóxicos e nitrato de origem Agrícola no Brasil: Cenário 1992/2011. Document 98, 2014, 35p.
13. EPA - United States Environmental Protection Agency (2017). Pesticides. Disponível em: <<https://www.epa.gov/pesticides>> Acesso em 11/06/2017
14. Fent, K. *Ökotoxikologie Umweltchemie, Toxicologie und*

- Ökologie*. Georg Thieme Verlag: Stuttgart, 1998.
15. Figueiredo-Fernandes, A., Ferreira-Cardoso, J.V., Garcia-Santos, S., Monteiro, S.M., Carrola, J., Matos, P., Fontainhas-Fernandes, A. Histopathological changes in liver and gill epithelium of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, exposed to waterborne copper. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, **2007**, 27(3), 103-109.
 16. Gokøyr, A., Förlin, L. The cytochrome P-450 system in fish, aquatic toxicology and environmental monitoring. *Aquatic Toxicology*. **1992**, 22, 287-312.
 17. Hahn, M. E. Biomarkers and bioassays for detecting dioxin-like compounds in the marine environment. *Science Total Environmental*. **2001**, 289, 49-69.
 18. Heddle, J.A. A rapid in vivo test for chromosomal damage. *Mutation Research*. **1973**, 18, 187-190.
 19. Huggett, R.J.; Kimerie, R.A.; Mehrie Jr., P.M.; Bergman, H.L. *Biomarkers: Biochemical, Physiological and Histological Markers of Anthropogenic Stress*. Lewis Publishers: Boca Raton, 1992.
 20. Keen, J.H., Habig, W.H., Jacoby, W.B. Mechanism for several activities of the glutathione-S-transferase. *Journal Biology and Chemistry*. **1976**, 251, 6183-6188.
 21. Klotz, A. V.; Stegman, J. J.; Walsh, C. An alternative 7-ethoxyresorufin O-deethylase activity assay: a continuous visible spectrophotometric method for a measurement of cytochrome P-450 monooxygenase activity. *Anal. Biochemistry*. **1984**, 140, 138-145.
 22. Ministério do Meio Ambiente (2015). Segurança Química. Agrotóxicos. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/seguranca-quimica/agrotoxicos>> Acesso em 09/06/2017.
 23. Salvo, L.M., Bainy, A.C., Silva, J.R.M.C., Klemz, C., Ventura, E., Silva de Assis, H.C. Assessment of the sublethal toxicity of the organochlorine pesticide endosulfan in juvenile common carp (*Cyprinus carpio*). *Journal of Environmental Science and Health, Part A*, **2012**, 47, 1652–1658.
 24. Salvo, L.M., Malucelli, B.E., Bacila, M., Sanchez, D.O., Nicaretta, L.C., Klemz, C., Silva de Assis, H.C. Effects of endosulfan sublethal concentrations: on carp (*Cyprinus carpio*, Linnaeus, 1758): morphometric histologic, ultrastructural analyses and cholinesterase activity evaluation. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, **2008**, 45, 87-94
 25. Salvo, L.M., Severino, D., Assis, H.C.S., Silva, J.M.C., Photochemical degradation increases polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) toxicity to the grouper *Epinephelus marginatus* as assessed by multiple biomarkers. *Chemosphere*, **2016**, 144, 540-547.
 26. Silva de Assis, H. C., Nicareta, L.C., Salvo, L.M., Klemz, C., Truppel, J., Santos, R. Biochemical biomarkers of exposure to deltamethrin in freshwater fish, *Ancistrus multispinis*. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, **2009**, 52, 1401-1407.
 27. Stegeman, J. J. Diversity and regulation of cytochrome P450 in aquatic species. Arinç, E.; Hodgson, E.; Schenkman, J. B., (Eds.). *Molecular aspects of oxidative drug metabolizing enzymes: Their significance in environmental toxicology, chemical carcinogenesis and health*; Springer-Verlag: New York, 1995, 135-158.
 28. Stegeman, J.J. Cytochrome P450 Forms in Fish. Schenkman, J.B.; Greim, H. (Eds.) *Handbook of Experimental Pharmacology*; Springer-Verlag: Berlin, 1993, 105, 279- 291.
 29. Timbrell, J.A. *Principle of biochemical toxicology*; Taylor & Francis: London, 1991, p. 219.
 30. Van Der Oost R., Beyer J., Vermeulen, N.P.E. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, **2003**, 13, 57-149.
 31. Varanasi, U. (1989). *Metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons in the aquatic environment*, 1st. ed., CRC Press: Boca Raton, 1989.

32. Walker, C.H., Hopkin, S.P., Sibly, R.M., Peakall, D.B. *Principles of Ecotoxicology*. Taylor & Francis: Bristol, 1996.
33. Weibel, E.R., Staubli, W., Gnagi, H.R., Hess, F. A. Correlated morphometric and biochemical studies on the liver cell. I. Morphometric model, stereological methods, and normal morphometric data for rat liver. *Journal Cell Biology*, **1969**, 42, 68-91.
34. Wester, P. W., Van Der Ven, L. T. M., Vethaak, A. D., Grinwis, G. C. M., Vos, J.G. Aquatic toxicology: opportunities for enhancement through histopathology. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, **2002**, 11, 289-295.

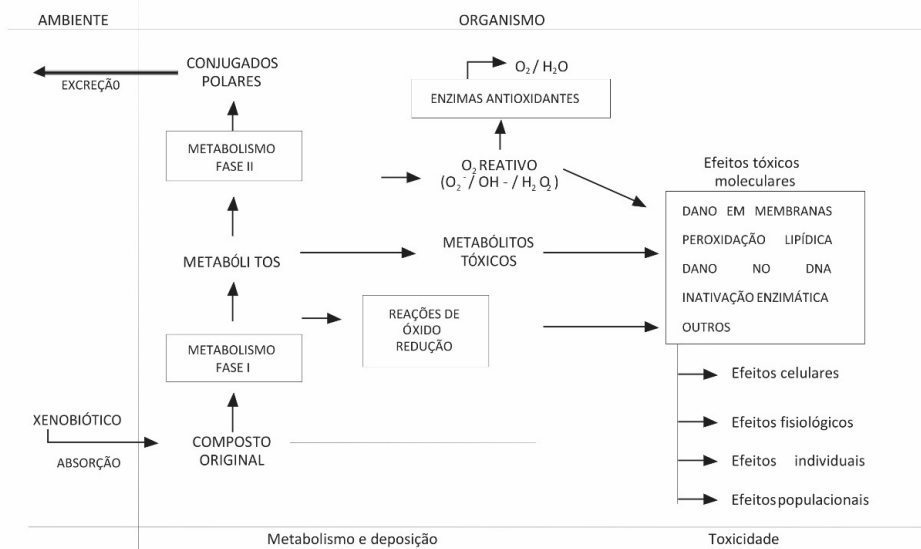


Figura 1: Representação das vias de detoxificação e biotransformação, (Adaptado de Fent, 1998)