

# BIOMARCADORES NA AVALIAÇÃO DA SAÚDE AMBIENTAL DOS ECOSISTEMAS AQUÁTICOS

*Marina Moreira Freire<sup>1</sup>, Vanessa Gomes Santos<sup>1</sup>, Ione Soares Ferreira Ginuino<sup>1</sup> & Ana Rosa Linde Arias<sup>1,\*</sup>*

<sup>1</sup> Laboratório de Ecotoxicologia, Centro de Estudos da Saúde do Trabalhador e Ecologia Humana, Escola Nacional de Saúde Pública Sérgio Arouca, Fundação Oswaldo Cruz. Rua Leopoldo Bulhões, 1480, Manguinhos. CEP: 21041-210. Rio de Janeiro, Brasil.

\*E-mail: arlinde@ensp.fiocruz.br

## RESUMO

Os ecossistemas aquáticos vêm sofrendo crescente processo de contaminação oriundo de atividades industriais, agrícolas e urbanas. A mensuração apenas destes contaminantes no ambiente não traz respostas sobre os efeitos adversos que estas substâncias vêm causando nos organismos vivos presentes nestes ambientes. Desta forma, no biomonitoramento dos corpos d'água devem ser incluídas ferramentas biológicas que tragam respostas sobre o estresse e os efeitos que estes poluentes vêm causando, possibilitando o estabelecimento de relações de causa-efeito. Estas respostas biológicas, chamadas de biomarcadores, vêm sendo utilizadas para avaliar a exposição e o efeito causados por diferentes contaminantes, tais como, metais, compostos orgânicos e agrotóxicos. Os biomarcadores constituem uma abordagem eficiente nos estudos de avaliação do risco e impacto ambiental, pois detectam de forma precoce os efeitos reais que estão ocorrendo aos seres vivos em situações de exposição a ambientes poluídos. O uso de biomarcadores é fundamental para que possam ser tomadas medidas mitigadoras e de proteção a estes ambientes.

**Palavras-chave:** biomarcadores, avaliação ambiental, poluição, ecossistemas aquáticos.

## ABSTRACT

### **BIOMARKERS TO ASSESS THE ENVIRONMENTAL HEALTH OF AQUATIC ECOSYSTEMS.**

Aquatic environments are increasingly threatened by contamination of industrial, agricultural and urban sources. Quantifying the pollutant agents in the environment does not provide information of their effects over organisms. Others biological tools should thus be used in monitoring water quality to allow for a better understanding of the stress and the effects pollutants cause in environments, enabling tracing cause-effect relationships. The biological responses, termed biomarkers, are used to assess the effects of exposure to various contaminants, such as metals, organic compounds, and pesticides. Biomarkers are efficiently applied in studies of risk assessment and environmental impact providing an early evaluation of the actual effects of pollutants on the biota. The use of biomarkers in environmental studies is important to implement adequate actions while protecting aquatic environments.

**Keywords:** biomarkers, environmental assessment, pollution, aquatic ecosystems.

## INTRODUÇÃO

A história da poluição ambiental aquática remonta ao início da história da civilização humana. Entretanto, a poluição aquática não recebeu muita atenção até que fosse atingido um limite a partir do qual foi possível perceber conseqüências adversas nestes ecossistemas e em seus organismos. A partir daí, surge um interesse global em relação às questões referentes à poluição aquática, embora ainda haja muitos países produzindo cargas enormes de poluição

com fortes tendências de aumento (Shahidul Islam & Tanaka 2004).

Com o crescimento exacerbado da industrialização e da urbanização ocorridos nas últimas décadas, estes ecossistemas passaram a sofrer grandes impactos decorrentes destes processos. Atividades industriais, agrícolas e domésticas são responsáveis pelo uso de mais de um terço da água doce acessível, além disso, estas atividades são grandes responsáveis pela contaminação destas águas por numerosos compostos sintéticos. Estas águas contaminadas atingem os rios,

lagos, nascentes e oceanos contendo uma infinidade de produtos químicos em diversas concentrações. Podemos somar a estas formas de contaminação das águas os derramamentos de óleo, gasolina etc., que representam outra importante fonte de poluição das águas (Fent 2004). Tal fonte de poluição é extremamente danosa aos ecossistemas aquáticos uma vez que muitos dos poluentes que atingem estes ecossistemas são extremamente tóxicos para os organismos vivos sendo uma séria ameaça à biodiversidade destes ambientes. Cabe ressaltar que muitos dos compostos lançados nos ambientes aquáticos podem sofrer biomagnificação nos distintos níveis tróficos através da cadeia alimentar, atingindo, desta forma, locais distantes de seu ponto inicial de descarga em áreas onde não há atividade humana significativa (Sarkar *et al.* 2006), como as Bifenilas Policloradas (PCBs) encontradas em ursos polares (Holsbeek Ludo *et al.* 1999).

Para o estabelecimento da condição homeostática destes ambientes naturais é necessário que seja realizado monitoramento destas áreas o que possibilitaria a tomada de ações corretivas (Monserrat *et al.* 2007). Entretanto, o monitoramento e a avaliação do risco dos ambientes impactados não podem ser baseados exclusivamente em análises químicas de amostras ambientais, pois estas análises não são apropriadas na indicação e predição dos efeitos deletérios causados por contaminantes na biota (Barsiene *et al.* 2006, Cajaraville *et al.* 2000). Desta forma, para avaliar os impactos dos poluentes na qualidade ambiental é pertinente que sejam mensurados os efeitos que estas substâncias causam nos organismos vivos destes ecossistemas (Wells *et al.* 2001). Neste contexto, um grupo apropriado de respostas biológicas - marcadores biológicos ou biomarcadores - pode ser útil para determinar o grau de impacto na saúde da biota, além de identificar os estressores ou poluentes responsáveis por estes efeitos (Fuentes-Rios *et al.* 2005). Os biomarcadores podem ser definidos como alterações bioquímicas, celulares, moleculares ou mudanças fisiológicas nas células, fluidos corpóreos, tecidos ou órgãos de um organismo que são indicativos da exposição ou efeito de um xenobiótico (Lam & Gray 2003). A necessidade de se detectar e avaliar o impacto das substâncias poluentes, especialmente em concentrações baixas, subletais, no monitoramento da qualidade ambiental, levou à avaliação e medição de uma gama de respostas biológicas em diversas espécies

(Goldfarb *et al.* 1998). Entre os numerosos biomarcadores ecotoxicológicos propostos nos últimos anos, aqueles baseados na resposta ao nível molecular e celular trazem respostas sobre os primeiros sinais de perturbação ambiental e vêm sendo comumente usados em programas de biomonitoramento (Nigro *et al.* 2006). O uso de biomarcadores medidos ao nível celular ou molecular tem sido proposto como uma ferramenta sensível de alerta para os efeitos biológicos medidos em avaliações da qualidade ambiental (Cajaraville *et al.* 2000). Como os aspectos comuns entre organismos diferentes se acentuam principalmente ao nível molecular, muitos biomarcadores moleculares possuem a vantagem de poderem ser aplicados a uma ampla variedade de organismos vivos (Lam & Gray 2003). Uma das características mais importantes dos biomarcadores molecular/celular é que sua avaliação antecipa mudanças nos altos níveis de organização biológica, isto é, população, comunidade ou ecossistema. Antes da morte ou de doença manifesta, organismos podem responder ao stress, através de alterações moleculares, celulares etc. (Monserrat *et al.* 2003). Desta forma, os biomarcadores podem ser usados de forma preditiva, permitindo que sejam tomadas ações de biorremediação antes que ocorram danos ambientais irreversíveis com conseqüências ecológicas severas (Cajaraville *et al.* 2000). Estes biomarcadores são de grande importância na avaliação da exposição e dos efeitos de diferentes contaminantes, tais como metais, xenobióticos orgânicos e compostos organometálicos, podendo ser medidos através de diferentes abordagens moleculares. (Ross *et al.* 2002). Podem, então, ser utilizados em estudos de campo que objetivam caracterizar áreas impactadas, onde uma complexa mistura de poluentes está normalmente presente (Monserrat *et al.* 2007). Outra característica importante dos biomarcadores é que estes podem detectar exposição aos ou os efeitos tóxicos dos compostos e seus metabólitos, que em alguns casos são rapidamente metabolizados e eliminados do organismo, como os Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPAs) e os organofosforados (OPs) (Sarkar *et al.* 2006).

Em estudos ecotoxicológicos é recomendada a utilização de uma bateria de biomarcadores, uma vez que apenas a avaliação de uma única resposta biológica pode não refletir de forma ampla os danos à saúde dos organismos vivos de determinado ambiente impactado (Zorita *et al.* 2008). Além disso, o uso

concomitante de vários biomarcadores é importante para minimizar interpretações errôneas nos casos de situações complexas de poluição (Minier *et al.* 2000, Flammarion *et al.* 2002, Pacheco & Santos 2002, Deviller 2005). Nestes estudos é importante que seja feita a escolha mais apropriada da espécie indicadora da qualidade do ambiente em estudo. Peixes e moluscos têm ambos sido empregados como organismos sentinelas em programas de biomonitoramento de rotina, tanto em nível nacional como internacional. Neste contexto, os moluscos costumam ser escolhidos como espécie bioindicadora, devido a sua ampla distribuição geográfica, a possibilidade de fácil aquisição no campo e através da aquicultura. Por outro lado, a utilização de peixes nestes estudos é de grande importância devido à posição-chave destes organismos na cadeia trófica e seu elevado valor comercial, dentre outras coisas (Viarengo *et al.* 2007).

Cabe ressaltar que o uso de biomarcadores no monitoramento ambiental exige um profundo conhecimento das funções biológicas dos organismos utilizados. Além disso, é necessário identificar todas as possíveis variações naturais que possam influenciar essas respostas, para padronizar o processo analítico (Ricciardi *et al.* 2006). Além da pertinência das respostas biológicas estudadas como potenciais biomarcadores de estresse ambiental, é de importância primordial avaliar a influência exercida pelas variações naturais causadas por fatores intrínsecos e extrínsecos, para diferenciar os efeitos da poluição da influência de outros fatores ambientais e das variações fisiológicas sazonais normais de um possível biomarcador (Guerlet *et al.* 2007).

Alguns biomarcadores vêm sendo usados com frequência em programas de avaliação do impacto em ecossistemas aquáticos, por possuírem metodologia bem fundamentada e de fácil desenvolvimento, gerarem repostas em curto espaço de tempo, possuírem baixo custo de análise e serem altamente sensíveis. Neste artigo daremos destaque a biomarcadores que vêm sendo utilizados, de forma rotineira e com sucesso, em programas de avaliação de ecossistemas aquáticos.

## MEMBRANA LISSOSSOMAL

A avaliação da estabilidade da membrana lisossomal vem sendo utilizada como um biomarcador

celular generalizado de estresse à poluição (Nicholson & Lam 2005). Lisossomas são organelas subcelulares circundadas por uma membrana semipermeável que contém muitas enzimas hidrolíticas envolvidas numa série de processos celulares, incluindo digestão, defesa e reprodução (Pipe 1993, Ferreira & Dolder 2003), além de serem as organelas responsáveis pela remoção de compostos tóxicos do citosol (Stefanoni & Abessa 2008). Muitas substâncias tóxicas se acumulam nos lisossomas (íons metálicos, hidrocarbonetos heterocíclicos e HPAs etc.), podendo causar perturbação e danos à membrana lisossomal. A integridade da membrana lisossomal e sua estabilidade costumam ser afetadas por substâncias estressoras sendo, a estabilidade destas membranas, considerada um indicador de “bem estar” celular (Moore *et al.* 2006). Embora a capacidade de seqüestrar contaminantes de locais intracelulares sensíveis seja um mecanismo protetor essencial, torna a membrana lisossomal particularmente suscetível à elevadas concentrações de compostos tóxicos. Com excesso de substâncias exógenas, a armazenagem intralisossomal pode aumentar a permeabilidade da membrana levando ao efluxo de enzimas hidrolíticas e aumento da atividade autolítica da célula (Viarengo 1989, Nicholson 2001). A fragilidade das membranas lisossomais é quantitativamente relacionada ao nível de estresse induzido por xenobióticos (Moore 1985). A estabilidade destas membranas pode ser avaliada através do método chamado de “tempo de retenção do vermelho neutro” (NRRT). De acordo com este método, o corante é seqüestrado para o compartimento lisossomal quando as células vivas são pré incubadas com vermelho neutro (NR). Através da visualização por microscópio poderá ser avaliado se o corante vazou para o citosol da célula, o que caracterizará dano nas membranas lisossomais. O tempo que o corante leva para atingir o citosol está relacionado com o grau de dano nas membranas (Lowe & Pipe 1994). Muitos estudos têm demonstrado que a avaliação da permeabilidade da membrana lisossomal é um biomarcador útil, robusto, generalizado e prático uma vez que os lisossomas são alvo de uma vasta gama de poluentes e estão presentes em todas as células nucleadas não sendo, desta forma, espécie-específicas. Além disso, os lisossomas são facilmente visualizados em células sangüíneas com auxílio de microscópio (Viarengo *et al.* 2007).

O valor deste método como biomarcador geral de poluição foi demonstrado em vários estudos (Rank *et al.* 2007) sendo considerado um ensaio de alta sensibilidade e robustez. Em conclusão, a avaliação da estabilidade da membrana lisossomal pode ser considerada um eficiente indicador inespecífico do estresse celular.

## METALOTIONEÍNAS

As metalotioneínas (MTs) são proteínas primordialmente citosólicas de baixo peso molecular, caracterizadas por possuírem altos níveis de cisteína e ausência de aminoácidos aromáticos e histidina. Apresentam estabilidade ao calor e possuem alta afinidade por íons metálicos do grupo IB e IIB da tabela periódica (Viarengo *et al.* 2007, Sarkar *et al.* 2006). Como função biológica, podemos destacar homeostase de importantes metais e a detoxicação de metais tanto essenciais quanto não essenciais (Monserrat *et al.* 2006, Viarengo *et al.* 2007). A presença dos grupos tióis (-SH) permite que estas proteínas se liguem ao excesso de metais essenciais e a metais poluentes, protegendo, desta forma, o organismo da toxicidade destes compostos inorgânicos restringindo a disponibilidade destes cátions a locais indesejáveis do organismo (Monserrat *et al.* 2006). A produção de metalotioneínas é induzida pelo aumento da entrada de metais na célula, o que torna estas metaloproteínas biomarcadores específicos de exposição à contaminação por metais (Nicholson & Lam 2005, Viarengo *et al.* 2007). São proteínas expressas normalmente nos tecidos de animais e já foram identificadas em muitos invertebrados, incluindo os peixes, e em aproximadamente 50 diferentes espécies de invertebrados aquáticos, principalmente moluscos e crustáceos (Sarkar *et al.* 2006). Por essa razão, as MTs se tornaram ferramentas extremamente úteis na avaliação da poluição aquática por metais. Em organismos aquáticos, as guelras, o rim e a glândula digestiva estão diretamente envolvidos na entrada, estocagem e excreção de metais e por isso possuem alta capacidade de sintetizar MTs (Bebiano *et al.* 1993). A quantificação da concentração de MTs nestes tecidos, pode ser realizada por diversas metodologias já bem fundamentadas, tais como: avaliação espectrofotométrica, ensaio de substituição metálica, análise eletroquímica e técnicas radioimunológicas (Viarengo

*et al.* 2007). Muitos estudos utilizam as MTs como indicadoras do estresse de organismos aquáticos a metais (Linde *et al.* 1999, Linde *et al.* 2001), demonstrando que de fato, o aumento nas concentrações desta proteína está associado a diminuição da sensibilidade dos organismos aos metais (Pavicic *et al.* 1994).

Cabe ressaltar que a expressão de MT pode ser influenciada por fatores naturais que afetam a especiação e biodisponibilidade dos metais, como a salinidade. Desta forma, esta avaliação deve ser levada em conta na quantificação e uso da MT como biomarcador específico da contaminação por metais. Além disso, muitos estudos recentes vêm sendo conduzidos com intuito de entender de forma mais ampla os papéis das MTs. Neste contexto, estudos focando a estrutura dos promotores dos genes de MT têm trazido informações mais específicas sobre a resposta dos organismos a metais. Evidência de indução metal-específica a diferentes isoformas de MT possivelmente aumentará a especificidade das MTs como biomarcadoras da exposição a metais (Monserrat *et al.* 2006, Viarengo *et al.* 2007).

## ACETILCOLINESTERASE (ACHE)

A acetilcolinesterase é a enzima responsável pela hidrólise do neurotransmissor acetilcolina presente nas fendas sinápticas durante a transmissão colinérgica. Esta enzima é inibida por dois grupos de pesticidas, os organofosforados (OPs) e os carbamatos, os quais se combinam covalentemente a resíduos de aminoácidos específicos para inativar a enzima (Jung *et al.* 2007). Estes compostos são amplamente utilizados, principalmente na agricultura, e atingem os ecossistemas aquáticos através de despejos agrícolas e urbanos (Viarengo *et al.* 2007). Desta forma, estes compostos chegam aos rios e ao mar causando a contaminação destes ecossistemas (Monserrat *et al.* 2006). Embora estes pesticidas sejam hidrolizados rapidamente no meio ambiente, o aumento no uso e despejo destes compostos e o conseqüente aumento de sua concentração no ambiente ocasiona efeitos tóxicos nos organismos destes ecossistemas. Diante disso, a avaliação da inibição da atividade da enzima AChE se mostra um biomarcador adequado no estudo dos efeitos da contaminação por pesticidas OP e carbamatos (Viarengo *et al.* 2007). A metodologia para determinação espectrofotométrica da atividade

enzimática é simples, bem fundamentada e de baixo custo, o que torna esta enzima um biomarcador extremamente útil em biomonitoramentos. Diversos trabalhos têm demonstrado a relação entre a atividade tecidual de AChE e os níveis destes compostos no meio ambiente. Como exemplo, podemos citar o estudo realizado por Linde-Arias *et al.* (2007) no qual são estudadas três regiões da bacia do rio Paraíba do Sul, Rio de Janeiro, utilizando, para tanto, uma bateria de biomarcadores, dentre eles a atividade de AChE. A análise desta enzima, em músculo de duas espécies de peixes, se mostrou eficaz na avaliação dos efeitos de compostos OP e carbamatos, além de caracterizar as áreas estudadas, fornecendo respostas sobre os diferentes graus de contaminação destas regiões. Porém, deve ser ressaltado que existe grande diversidade nas propriedades bioquímicas e na sensibilidade desta enzima a agentes anticolinesterásicos entre diversos peixes e espécies de invertebrados (Habig *et al.* 1988). Estudos *in vitro* demonstraram uma tendência de espécies de peixes possuírem maior sensibilidade a agentes anticolinesterásicos em comparação com a baixa sensibilidade de espécies de invertebrados a estes compostos (Monserrat *et al.* 2006) fato que deve ser levado em consideração na escolha da espécie indicadora em trabalhos de monitoramento da poluição de ecossistemas aquáticos por pesticidas anticolinesterásicos.

## MICRONÚCLEOS

Micronúcleos (MN) são formados por fragmentos de cromossomos acêntricos (efeito clastogênico) ou por cromossomos inteiros que não completaram a migração anafásica da divisão celular (efeito aneugênico) (Pantaleão *et al.* 2006) deixando de ser incorporados ao núcleo das células filhas durante a mitose. Estes pequenos fragmentos de cromatina, separados do núcleo principal, permanecerão durante toda a vida da célula e indicam quebra cromossômica ou disfunções do fuso mitótico, que podem ser ocasionadas por compostos tóxicos (Bolognesi *et al.* 2006). Muitos dos compostos químicos lançados em ambientes aquáticos são genotóxicos, podendo causar mutagênese e até mesmo carcinogênese (Ohe *et al.* 2004). A avaliação destes efeitos genotóxicos na biota aquática através da análise de aberrações cromossômicas é difícil pois organismos como os

peixes geralmente possuem os cromossomos pequenos e em grande número (Al-Sabti & Metcalfe 1995). Por outro lado, o teste de micronúcleo, que avalia a frequência de formação destes pequenos fragmentos de cromatina, é uma técnica citogenética bem conhecida e facilmente aplicável para avaliar danos cromossômicos em diferentes organismos causados por estressores ambientais (Bolognesi *et al.* 2006). A metodologia utilizada para avaliar os micronúcleos é fácil e requer apenas o uso de um microscópio. Este teste consiste na contagem de células que contenham um ou mais micronúcleos citoplasmáticos (Viarengo *et al.* 2007) e em peixe pode ser analisado em diferentes tipos de células, como por exemplo, eritrócitos periféricos, células das guelras, rins, fígado e até de barbatana. Os eritrócitos periféricos têm sido mais comumente utilizados, pois evitam a complexidade associada aos procedimentos de preparação celular e sacrifício do animal. Além disso, a elevada taxa mitótica dos tecidos hematopoiéticos revela uma resposta rápida à exposição genotóxica, revelando os danos cromossômicos causados por esta exposição (Bolognesi *et al.* 2006). O teste de micronúcleo tem sido amplamente utilizado em programas de biomonitoramento sendo uma valiosa ferramenta para avaliar exposições de organismos aquáticos a substâncias genotóxicas, uma vez que genotoxinas podem induzir mudanças no DNA que passam para gerações seguintes, sendo, o teste de micronúcleo, desta forma, um importante sinalizador precoce de danos com conseqüências irreversíveis.

## CITOCROMO P 450 (EROD)

O sistema monooxigenase de função mista (MFO) tem papel central no metabolismo oxidativo e na detoxicação de uma gama de substâncias de ocorrência natural e xenobióticas (Bonacci *et al.* 2007). O Citocromo P 450 é uma família de enzimas componente deste sistema que apresenta muitas isoformas, com diferentes funções no metabolismo de compostos endógenos e xenobióticos (Goksøyr & Förlin 1992). Muitas subfamílias do citocromo P-450 são conhecidas por terem seu metabolismo oxidativo ativado por distintos substratos e dentre elas podemos destacar a subfamília CYP1A e em especial a enzima etoxiresorufina-*O*-desetilase (EROD) devido ao seu papel na biotransformação de compostos orgânicos,

incluindo HPAs, PCBs e dioxinas. Estes compostos químicos estão entre os mais perigosos liberados nos ambientes marinhos (Safe & Phil 1990), podendo impactar de forma severa a biodiversidade aquática. A enzima EROD, presente tanto em organismos vertebrados quanto em invertebrados, tem o papel de transformar estes xenobióticos lipofílicos em compostos mais hidrofílicos favorecendo a excreção destas substâncias. Entretanto, muitos metabólitos, formados durante este processo de detoxicação, são altamente reativos podendo ser genotóxicos e causar danos ao DNA que em última instância podem levar a carcinogênese. Após a exposição da biota aquática a estes xenobióticos os níveis de EROD tornam-se aumentados e esta é a base do uso desta enzima como biomarcador dos efeitos da contaminação de ambientes aquáticos por poluentes orgânicos (Cajaraville *et al.* 2000). Este biomarcador é talvez um dos mais bem estudados e é considerado extremamente eficaz para detectar os efeitos de compostos orgânicos principalmente em peixes (Pacheco *et al.* 2005). Entretanto, embora em muitos estudos seja encontrada boa correlação entre a atividade de EROD e os níveis de compostos orgânicos no ambiente, não se pode esperar uma relação dose – resposta linear entre a atividade da enzima e a concentração destes xenobióticos, uma vez que no meio ambiente muitas vezes estão presentes distintos indutores e inibidores desta enzima. Além disso, outros fatores como temperatura, sazonalidade e hormônios sexuais podem alterar a resposta de EROD, devendo desta forma, serem levados em consideração na interpretação dos resultados oriundos da avaliação desta enzima (Cajaraville *et al.* 2000).

## CONCLUSÃO

O aporte crescente, em corpos d'águas, de substâncias tóxicas, como os metais e compostos orgânicos, traz à tona a necessidade de que os efeitos destes compostos na biota sejam avaliados com intuito de analisar os danos causados e evitar que estas conseqüências atinjam níveis mais alto de organização ecológica. Junto a isso, somente com a avaliação do impacto que estes xenobióticos causam nos ecossistemas aquáticos podem ser realizadas medidas corretivas e tomada de ações que limitem o uso destes compostos. Neste contexto, o uso de biomarcadores

é uma ferramenta bastante útil para esta finalidade. Como os biomarcadores têm especificidades distintas e em ambientes aquáticos normalmente podem ser encontrados diversos contaminantes, em programas de biomonitoramento, o uso de uma bateria de biomarcadores tem se mostrado mais eficaz que a avaliação de apenas um indicador de poluição. Para um bom resultado de monitoramento é importante que sejam pré-determinados quais biomarcadores serão utilizados e também qual espécie será indicadora dos danos, levando em consideração as particularidades da área em estudo além das características inerentes de cada biomarcador e da espécie sentinela. Deve-se também considerar os fatores extrínsecos e intrínsecos do processo que possam causar alterações na avaliação, para que não sejam tiradas conclusões errôneas. Em conclusão, o uso de biomarcadores em avaliações do impacto da contaminação de ambientes aquáticos é fortemente recomendado para que se possa produzir dados confiáveis que possibilitarão a implementação de medidas adequadas para a proteção e/ou recuperação dos ecossistemas aquáticos.

## REFERÊNCIAS

- AL-SABTI, K. & METCALFE, C.D. 1995. Fish micronuclei for assessing genotoxicity in water. *Mutation Research*, 343: 121-135.
- BARSIENE, J.; LEHTONEN, K.K.; KOEHLER, A.; BROEG, K.; VUORINEN, P.J.; LANG, T.; PEMPKOWIAK, J.; SYVOKIENE, J.; DEDONYTE, V.; RYBAKOVAS, A.; REPECKA, R.; VUONTISJÄRVI, H. & KOPECKA J. 2006. Biomarker responses in flounder (*Platichthys flesus*) and mussel (*Mytilus edulis*) in the Klaipeda-Būtinge area (Baltic Sea). *Marine Pollution Bulletin*, 53: 422-436.
- BOLOGNESI, C.; PERRONE, E.; ROGGIERI, P.; PAMPANIN, D.M. & SCIUTTO, A. 2006. Assessment of micronuclei induction in peripheral erythrocytes of fish exposed to xenobiotics under controlled conditions. *Aquatic Toxicology*, 78 Suppl 1: S93-98.
- BEBIANNI, M.J.; NOTT, J.A. & LANGSTON, W.J. 1993. Cadmium metabolism in the clam *Ruditapes decussata*: the role of metallothioneins. *Aquatic Toxicology*, 27: 315-334.
- BONACCI, S.; IACocca, A.; FOSSI, S.; LANCINI, L.; CARUSO, T.; CORSI, I. & FOCARDI, S. 2007. Biomonitoring aquatic environmental quality in a marine protected area: a biomarker approach. *Ambio*, 36(4): 308-315.
- DEVILLER, G.; PALLUEL, O.; ALIAUME, C.; ASANTHI,

- H.; SANCHEZ, W.; FRANCO, N.; BLANCHETON J.P. & CASELLAS, C. 2005. Impact assessment of various rearing systems on fish health using multibiomarker response and metal accumulation. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 61: 89-97.
- CAJARAVILLE, M.P.; BEBIANNO, M.J.; BLASCO, J.; PORTE, C.; SARASQUETE, C. & VIARENGO, A. 2000. The use of biomarkers to assess the impact of pollution in coastal environments of the Iberian Peninsula: a practical approach. *The Science of the Total Environment*, 247(2-3): 295-311.
- FENT, K. 2004. Ecotoxicological effects at contaminated sites. *Toxicology*, 205: 223-240.
- FERREIRA, A. & DOLDER, H. 2003. Cytochemical study of spermiogenesis and mature spermatozoa in the lizard *Tropidurus itambere* (Reptilia, Squamata). *Acta Histochemica*, 105: 339-352.
- FLAMMARION, P.; DEVAUX, A.; NEHLS, S.; MIGEON, B.; NOURY, P. & GARRIC, J. 2002. Multibiomarker responses in fish from the Moselle River (France). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 51: 145-153.
- FUENTES-RIOS, D.; ORREGO, R.; RUDOLPH, A.; MENDOZA, G.; GAVILÁN, J.F.; & BARRA, R. 2005. EROD activity and biliary fluorescence in *Schroederichthys chilensis* (Guichenot 1848): biomarkers of PAH exposure in coastal environments of the South Pacific Ocean. *Chemosphere*, 61(2): 192-199.
- GOKSØYR, A. & FÖRLIN, L. 1992. The cytochrome P450 system in fish, aquatic toxicology and environmental monitoring. *Aquatic Toxicology*, 22: 287-312.
- GOLDFARB, P.; LIVINGSTONE, D. & BIRMELIN, C. 1998. Biomonitoring in the aquatic environment: use of molecular biomarkers. *Biochemical Society Transactions*, 26(4): 690-694.
- GUERLET, E.; LEDY, K.; MEYER, A. & GIAMBÉRINI, L. 2007. Towards a validation of a cellular biomarker suite in native and transplanted zebra mussels: a 2-year integrative field study of seasonal and pollution-induced variations. *Aquatic Toxicology*, 81(4): 377-388.
- HABIG, C.; DIGIULIO, R.T.; ABOU-DONIA, M.B. 1988. Comparative properties of channel catfish (*Ictalurus punctatus*) and blue crab (*Callinectes sapidus*) acetylcholinesterases. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 91C: 293-300.
- HOLSBECK LUDO, J.; CLAUDE, R.; DEBACKER, V.; ALI, I.B.; ROOSE PATRICK, N.; GOBERT, J.P.S.; BOUQUEGNEAU, J.M. & BOSSICART, M. 1999. Heavy metals, organochlorines and polycyclic aromatic hydrocarbons in sperm whales stranded in the southern North Sea during the 1994/1995 winter. *Marine Pollution Bulletin*, 38(4): 304-313.
- JUNG, J.H.; ADDISON, R.F. & SHIM, W.J. 2007. Characterization of cholinesterases in marbled sole, *Limanda yokohamae*, and their inhibition in vitro by the fungicide iprobenfos. *Marine Environmental Research*, 63(5): 471-478.
- LAM, P.K.S. & GRAY, J.S. 2003. The use of biomarkers in environmental monitoring programmes. *Marine Pollution Bulletin*, 46(2): 182-186.
- LINDE-ARIAS, A.R.; BUSS, D.F.; ALBURQUERQUE, C.; INÁCIO, A.F.; FREIRE, M.M.; EGLER, M.; MUGNAI, R. & BAPTISTA, D.F. 2007. Utilização de bioindicadores na avaliação de impacto e no monitoramento da contaminação de rios e córregos por agrotóxicos. *Ciência e Saúde Coletiva*, 12(1): 61-72.
- LINDE, A.R.; SÁNCHEZ-GALAN, S.; KLEIN, D.; GARCÍA-VÁZQUEZ, E. & SUMMER, K.H. 1999. Metallothionein and heavy metals in brown trout (*Salmo trutta*) and european eel (*Anguilla anguilla*): a comparative study. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 44: 168-173.
- LINDE, A.R., SÁNCHEZ-GALÁN, S., VALLÉS-MOTA, J.P. & GARCÍA-VÁZQUEZ, E. 2001. Metallothionein as bioindicator of freshwater pollution: european eel and brown trout. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 49(1): 60-73.
- LOWE, D.M. & PIPE, R.K. 1994. Contaminant induced lysosomal membrane damage in marine mussel digestive cells: an in vitro study. *Aquatic Toxicology*, 30: 357-365.
- MINIER, C.; LEVY, F.; RABEL, D.; BOCQUENE, G.; GODEFROY, D.; BURGEOT, T. & LÉBOULENGER, F. 2000. Flounder health status in the Seine Bay. A multibiomarker study. *Marine Environmental Research*, 50: 373-377.
- MONSERRAT, J.M.; MARTÍNEZ, P.E.; GERACITANO, L.A.; AMADO, L.L.; MARTINS, C.M.; PINHO, G.L.; CHAVES, I.S.; FERREIRA-CRAVO, M.; VENTURA-LIMA, J. & BIANCHINI, A. 2007. Pollution biomarkers in estuarine animals: critical review and new perspectives. *Comparative Biochemistry and Physiology part C: Toxicology and Pharmacology*, 146(1-2): 221-34.
- MONSERRAT, J.M.; GERACITANO, L.A. & BIANCHINI, A. 2003. Current and future perspectives using biomarkers to assess pollution in aquatic ecosystems. *Comments on Toxicology*, 9: 255-269.
- MOORE, M.N. 1985. Cellular responses to pollutants. *Marine Pollution Bulletin*, 16: 134-139.
- MOORE, M.N.; ALLEN, J.I.; MCVEIGH, A. & SHAW, J. 2006. Lysosomal and autophagic reactions as predictive indicators of environmental impact in aquatic animals. *Autophagy*, 2(3): 217-220.
- NICHOLSON, S. 2001. Ecocytological and toxicological responses to copper in *Perna viridis* (L.) (Bivalvia: Mytilidae) haemocyte lysosomal membranes. *Chemosphere*, 45: 399-407.

- NICHOLSON, S. & LAM, P.K. 2005. Pollution monitoring in Southeast Asia using biomarkers in the mytilid mussel *Perna viridis* (Mytilidae: Bivalvia). *Environment International*, 31(1): 121-132.
- NIGRO, M.; FALLENI, A.; BARGA, I.D.; SCARCELLI, V.; LUCCHESI, P.; REGOLI, F. & FRENZILLI, G. 2006. Cellular biomarkers for monitoring estuarine environments: transplanted versus native mussels. *Aquatic Toxicology*, 77(4): 339-347.
- OHE, T.; WATANABE, T. & WAKABAYASHI, K. 2004. Mutagens in surface waters: a review. *Mutation Research*, 567(2-3): 109-149.
- PACHECO, M. & SANTOS, M.A. 2002. Biotransformation, genotoxic, and histopathological effects of environmental contaminants in European eel (*Anguilla anguilla* L.). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 53: 331-347.
- PACHECO, M.; SANTOS, M.A.; TELES, M.; OLIVEIRA, M.; REBELO, J.E.; & POMBO, L. 2005. Biotransformation and genotoxic biomarkers in mullet species (*Liza sp.*) from a contaminated coastal lagoon (Ria de Aveiro, Portugal). *Environmental Monitoring and Assessment*, 107(1-3): 133-153.
- PIPE, R.K. 1993. The generation of reactive oxygen metabolites by the haemocytes of the mussel *Mytilus edulis*. *Developmental and Comparative Immunology*, 16: 111-122.
- PANTALEÃO SDE, M.; ALCÂNTARA, A.V.; ALVES JDO, P. & SPANÓ, M.A. 2006. The piscine micronucleus test to assess the impact of pollution on the Japarutuba river in Brazil. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 47(3): 219-224.
- PAVICIC, J.; SKREBLIN, M.; KREBAR, I.; TUSEK-ZIDARIC, M. & STEGNAR, P. 1994. Embryo-larval tolerance of *Mytilus galloprovincialis*, exposed to elevated seawater metal concentrations: I. Toxic effects of Cd, Zn and Hg in relation to the metallothionein level. *Comparative Biochemistry and Physiology part C: Toxicology and Pharmacology*, 107: 249-257.
- RANK, J.; LEHTONEN, K.K.; STRAND, J. & LAURSEN, M. 2007. DNA damage, acetylcholinesterase activity and lysosomal stability in native and transplanted mussels (*Mytilus edulis*) in areas close to coastal chemical dumping sites in Denmark. *Aquatic Toxicology*, 84(1): 50-61.
- RICCIARDI, F.; BINELLI, A. & PROVINI, A. 2006. Use of two biomarkers (CYP450 and acetylcholinesterase) in zebra mussel for the biomonitoring of Lake Maggiore (northern Italy). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 63(3): 406-412.
- ROSS, K.; COOPER, N.; BIDWELL, J.R. & ELDER, J. 2002. Genetic diversity and metal tolerance of two marine species: a comparison between populations from contaminated and reference sites. *Marine Pollution Bulletin*, 44: 671-679.
- SAFE, S. & PHIL, D. 1990. Polychlorinated biphenils (PCBs), dibenzo-p-dioxins (PCDDs), dibenzofurans (PCDFs), and related compounds: environmental and mechanistic consideration which support the development of toxic equivalency factors (TEFs). *Critical Reviews in Toxicology*, 21: 51-88.
- SARKAR, A.; RAY, D.; SHRIVASTAVA, A.N. & SARKER, S. 2006. Molecular Biomarkers: their significance and application in marine pollution monitoring. *Ecotoxicology*, 15(4): 333-340.
- SHAHIDUL ISLAM, M. & TANAKA, M. 2004. Impacts of pollution on coastal and marine ecosystems including coastal and marine fisheries and approach for management: a review and synthesis. *Marine Pollution Bulletin*, 48: 624-649.
- STEFANONI, M.F. & ABESSA, D.M.S. 2008. Lysosomal Membrane Stability of the brown mussel *Perna perna* (Linnaeus) (Mollusca, Bivalvia) exposed to the anionic surfactant Linear Alkylbenzene Sulphonate (LAS). *Pan-American Journal of Aquatic Sciences*, 3(1): 6-9.
- VIARENGO, A. 1989. Heavy metals in marine invertebrates: mechanisms of regulation and toxicity at the cellular level. *Critical Reviews in Aquatic Sciences*, 1: 295-317.
- VIARENGO, A.; LOWE, D.; BOLOGNESI, C.; FABBRI, E. & KOEHLER, A. 2007. The use of biomarkers in biomonitoring: a 2-tier approach assessing the level of pollutant-induced stress syndrome in sentinel organisms. *Comparative Biochemistry and Physiology part C: Toxicology and Pharmacology*, 146(3): 281-300.
- WELLS, P.G.; DEPLEDGE, M.H.; BUTLER, J.N.; MANOCK, J.J. & KNAP, A.H. 2001. Rapid toxicity assessment and biomonitoring of marine contaminants - exploiting the potential of rapid biomarker assays and microscale toxicity tests. *Marine Pollution Bulletin*, 42(10): 799-804.
- ZORITA, I.; ORTIZ-ZARRAGOITIA, M.; APRAIZ, I.; CANCIO, I.; ORBEA, A.; SOTO, M.; MARIGÓMEZ, I. & CAJARAVILLE, M.P. 2008. Assessment of biological effects of environmental pollution along the NW Mediterranean Sea using red mullets as sentinel organisms. *Environmental Pollution*, 153(1): 157-168.

*Submetido em 10/03/2008.*

*Aceito em 25/06/2008.*