

Antônio JD Cogo<sup>1,2</sup>, Arthur F. Siqueira<sup>1,3</sup>, Alessandro C Ramos<sup>1,4</sup>, Zilma MA Cruz<sup>1,5</sup> & Ary G Silva<sup>1,6</sup>

## Utilização de enzimas do estresse oxidativo como biomarcadoras de impactos ambientais

Using oxidative stress enzymes as biomarkers in environmental impacts

**Resumo** O uso intensivo de compostos xenobióticos em atividades humanas é responsável pela contaminação de vários ambientes, provocando alterações em diferentes níveis ecológicos. O monitoramento das possíveis consequências do uso indiscriminado desses compostos é realizado por intermédio de biomarcadores ou bioindicadores, principalmente em ambientes aquáticos, nos quais o organismo apresenta contato direto com o contaminante, fato que propicia o diagnóstico do impacto para posterior reparo ou, até mesmo, recuperação do ambiente. Atualmente, um dos biomarcadores utilizados são as enzimas, uma vez que o aumento ou a inibição da atividade enzimática podem indicar algum tipo de resposta ao estresse ambiental, segundo ensaios realizados *in situ* ou *in vitro*. Diversos estudos citados na literatura utilizam a determinação da atividade enzimática, através de comparações com grupos controles ou por parâmetros encontrados antes e depois de iniciar uma atividade que poderia causar algum estresse para a área trabalhada. As enzimas do estresse oxidativo, representadas pela catalase, superóxido dismutase, glutathione redutase e peroxidase, são necessárias para a manutenção da vida por estarem associadas ao processo de detoxificação de compostos formados nos seres vivos, e são consideradas importantes ao permitirem a sobrevivência de organismos em ambientes impactados. A análise da atividade dessas enzimas permite maior controle do ambiente e funciona como sinal de alerta de contaminação, sendo, portanto, uma técnica importante para a vigilância ambiental e controle das atividades humanas sobre o ambiente.

**Palavras-chaves** Monitoramento ambiental, biomarcadores, impactos ambientais, estresse oxidativo, atividade enzimática.

**Abstract** The intensive use of xenobiotic composites in activities of humans held responsible for environmental contamination resulting in alterations in different ecological levels. To gain information about the possible consequences of the use of these harmful composites, biomarkers or bioindicators are used. In aquatic environments, where the organism is in direct contact with composites, the examination of harmful effects is of special interest. Enzymes became of special interest in their use as biomarkers, as an increase or inhibition of enzymatic activity may indicate a response to environmental stress. Several studies use the determination of the enzymatic activity to monitor the environment comparing data of control group with those of contaminated areas. Catalase and the superoxide dismutase are important enzymes as they participate in detoxication. The enzymes are known to have impact on the survival rate in animals living in contaminated areas. The analysis of the activity of those enzymes enable to gain information about the amount of pollution and are seen as alert signal of contamination. Therefore, the determination of those enzymes is seen as one important technique for the environmental monitoring and control of activities of human beings and their effects on the environment.

**Keywords** Environmental monitoring, biomarkers, environmental impacts, oxidative stress, enzymatic activity.

### Introdução

Nos últimos anos, o nível de compostos xenobióticos aumentou de forma alarmante nos ecossistemas aquáticos como resultado das atividades antropogênicas. Neste contexto, a biota aquática se tornou importante para a detecção do grau de impacto, uma vez que este meio está constantemente exposto a um grande número de substâncias tóxicas oriundas de diversas fontes de emissão. A descarga de lixos tóxicos provenientes de efluentes industriais, processos agrícolas, derrames acidentais de lixos

1 Centro Universitário Vila Velha - UVV. Rua Comissário José Dantas de Melo, 21, Boa Vista, Vila Velha, ES, Brasil. CEP 29101-770.

2 antoniojesusdc@hotmail.com

3 arthur\_fsiqueira@hotmail.com

4 alessandro.ramos@uvv.br

5 zilma.vix@terra.com

6 arygomes@uvv.br

químicos e os esgotos domésticos lançados em rios e mares contribuem para a contaminação do ambiente aquático com uma gama de agentes tóxicos representados por metais pesados, agrotóxicos e compostos orgânicos (Rashed, 2001; Chandran et al. 2005; Arias et al. 2007).

As substâncias tóxicas são capazes de interagir com os organismos vivos nos ambientes aquáticos, causando inúmeras alterações que podem gerar graves desequilíbrios ecológicos dependendo do grau de impacto e do tempo de exposição (Livingstone, 1993). Essas alterações são provocadas por influência direta dos compostos sobre determinadas estruturas celulares, como na membrana lisossomal, a qual pode ser degradada por ação de diversos metais pesados e provocar reações adversas no organismo (Regoli et al. 1998).

Estudos recentes demonstram grande interesse por biomarcadores enzimáticos como forma de monitoramento de ambientes aquáticos, fato que determinou um rápido desenvolvimento de técnicas capazes de possibilitar o monitoramento ambiental (Bainy et al. 1996; Ventura et al. 2002; Chandran et al. 2005; Nicholson & Lam, 2005; Gu et al. 2006; Bocchetti et al. 2008; Zanette et al. 2008). A utilização da atividade enzimática como biomarcadora deve-se ao fato dos compostos tóxicos, que apresentam uma meia-vida relativamente longa, possuírem alta afinidade por pares de elétrons encontrados nos aminoácidos que formam as enzimas, como o grupamento sulfidril (SH) (Bertin & Averbek, 2006; Ivanina et al. 2008).

Cada enzima apresenta uma estrutura tridimensional particular com um sítio ativo que se liga ao substrato específico, ditada pela ordem dos aminoácidos na sua cadeia, porém tal estrutura pode ser desenhada, ou desnaturada, quando os compostos tóxicos se ligam à estrutura, sendo convertida em uma cadeia polipeptídica flexível que perdeu a sua conformação original, que pode torná-la inativa (Lehninger et al. 1995). Como consequência, as alterações podem ser observadas por métodos bioquímicos. Entre os testes realizados, destacam-se as atividades de enzimas responsáveis pela detoxificação do organismo, principalmente do estresse oxidativo (Bainy et al. 1996; Bainy et al. 2000; Ventura et al. 2002; Alves et al. 2002; Chandran et al. 2005; Gu et al. 2006; Atli & Canli, 2007; Zanette et al. 2008).

---

### Utilização de Atividade Enzimática como Biomarcadores

Atualmente vários grupos de organismos aquáticos são estudados como possíveis bioindicadores para a avaliação de áreas contaminadas. Através de testes enzimáticos é possível definir alguma alteração causada no organismo como consequência de atividade antrópica. Entre os organismos

analisados pode-se destacar peixes como *Oreochromis niloticus* (Atli & Canli, 2007), *Brycon amazonicus* (Avilez et al. 2008), *Corydoras paleatus* (Monserrat et al. 2008), *Salmo trutta* (Bernet et al. 2001); poliquetas da espécie *Perinereis aibuhitensis* (Ng et al. 2008); crustáceos como o camarão *Litopenaeus vannamei* (Aispuro-Hernandez et al. 2008); microalgas (Levy et al. 2008); microorganismos como *Tetrahymena pyriformis* e *Vibrio fischeri* (Bonnet et al. 2008) e os moluscos, como as ostras *Perna perna* (Bainy et al. 2000; Alves et al. 2002) *Crassostrea rhizophorae*, (Alves et al. 2002), *Pinctada fucata* (Gu et al. 2006) e *Crassostrea virginica* (Ivanina et al. 2008), mexilhões como *Mytilus galloprovincialis* (Bocchetti et al. 2008) ou ainda, o gastrópode *Achatina fulica* (Chandran et al. 2005).

Os organismos utilizados como bioindicadores podem ser coletados nas áreas impactadas (*in situ*), como realizados nos trabalhos de Bainy et al. (2000), Bocchetti et al. (2008) e Levy et al. (2008), ou podem ser expostos a diferentes concentrações dos compostos químicos no próprio laboratório (*in vitro*), como citado nos estudos de Chandran et al. (2005); Gu et al. (2006); Atli & Canli (2007); Ivanina et al. (2008); Avilez et al. (2008) e Monserrat et al. (2008), sendo posteriormente processado e realizado a análise das respostas bioquímicas.

Um bom exemplo da utilização de atividade enzimática como método de monitoramento pode ser observado no trabalho realizado por Bocchetti et al. (2008), no qual foram utilizados mexilhões da espécie *Mytilus galloprovincialis* para avaliar a acumulação de contaminantes e os efeitos tóxicos de remobilizados químicos, durante as operações de drenagem e deposição em área portuária. Esta atividade resultou na ressuspensão de poluentes encontrados no sedimento, fato que causou o aumento da atividade da catalase e glutathione-S-transferase, enzimas envolvidas no processo de detoxificação. Após o encerramento das atividades de drenagem e deposição, foram observados redução da atividade das enzimas aos índices iniciais, o que indica a mobilização dos contaminantes da coluna d'água por processo de decantação.

O estresse causado pelos compostos tóxicos deve-se a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS – *Reactive Oxygen Species*), tal como o íon superóxido ( $O_2^-$ ), peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), radical hidroxila (OH) e oxigênio livre ( $O_1$ ) (Chandran et al. 2005; Valavanidis et al. 2006; Atli & Canli, 2007; Avilez et al. 2008). Esses radicais podem ser formados pelo contato do organismo com as substâncias tóxicas, que são bioacumuladas, e geram como consequência, o estresse oxidativo. Um exemplo da bioacumulação pode ser observado no trabalho de Anandraj et al. (2002), no qual foi observado uma acumulação diretamente proporcional à quantidade de metais pesados presentes na coluna d'água. Os metais pesados, representados pelo mercúrio, cobre e zinco, foi acumulado em tecidos moles do bivalve *Perna perna*.

Os radicais livres produzidos pela presença de

compostos tóxicos no organismo reagem com lipídeos, proteínas ou ácidos nucleicos e resultam em diversas injúrias bioquímicas ou genéticas. A detoxificação das espécies reativas de oxigênio tornou-se um pré-requisito para a vida aeróbica, o que proporcionou o desenvolvimento de muitas defesas orgânicas a partir da evolução a fim de prevenir, interceptar e reparar os danos no organismo (Lehninger et al. 1995; Chandran et al. 2005; Gu et al. 2006; Atli & Canli, 2007; Monserrat et al. 2008; Avilez et al. 2008).

Em organismos expostos a metais pesados ocorre o aumento nas espécies reativas de oxigênio (ROS), como o peróxido de hidrogênio, radical superóxido, radical hidroxil, o que pode elevar a atividade das enzimas do estresse oxidativo, como a catalase, superóxido dismutase e glutathion-s-transferase, que utilizam esses compostos como seus substratos específicos (Atli & Canli, 2007). Essas enzimas são constantemente citadas na literatura como biomarcadoras de contaminação em diversos organismos.

---

## Utilização da Catalase

A enzima catalase (CAT, EC 1.11.1.6), um componente de defesa antioxidante primário, exerce duas funções importantes: a decomposição de peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) a água e oxigênio ( $H_2O + O_2$ ) e a oxidação de compostos hidrogenados, como metanol, etanol, ácido fórmico, fenóis, com o consumo de um mol de peróxido (Aebi, 1984).

Muitas reações de degradação dos aminoácidos e gorduras, ocasionadas pelo estresse oxidativo, produzem radicais livres e peróxidos de hidrogênio, espécies altamente reativas capazes de lesar a maquinaria celular. A maneira que a célula encontrou para se defender desses produtos foi a formação de peroxissomos, pequenas vesículas envoltas por membrana, onde ocorrem as reações devido a grande quantidade de catalase, como citado por Lehninger et al. (1995); Lam et al. (1995) e Atli & Canli (2007). A atividade da catalase é importante para o monitoramento, por ser uma enzima que apresenta elevada atividade quando o organismo se encontra em estresse oxidativo (Lam et al. 1995; Chandran et al. 2005; Avilez et al. 2008). Por esse motivo, é utilizada como biomarcadora em diversos estudos que analisam o impacto ambiental como descrito por Bainy et al. (1996); Ventura et al. (2002); Atli & Canli (2007); Zanette et al. (2008).

Estudos recentes realizados com o gastrópode *Achatina fulica*, demonstrou uma enorme redução na atividade da catalase após a exposição do indivíduo ao cádmio e ao zinco, o que indicou efeito prejudicial dos metais pesados nas enzimas isoladas da glândula digestiva e do rim do organismo (Chandran et al. 2005). Outros trabalhos realizados com

ostras *Crassostrea rhyzophorae* e mexilhões *Perna perna*, expostos ao Furadam, pesticida muito utilizado no combate de pestes agrícolas, demonstraram um aumento na atividade da enzima catalase nas brânquias de ambos os organismos, porém significativo apenas para a *Crassostrea rhyzophorae*, quando comparado ao grupo controle (Alves et al. 2002). O trabalho de Zanette et al. (2008), compara a atividade da catalase de brânquias e glândula digestiva de *C. rhyzophorae* com aquelas obtidas de *C. gigas* ao longo de quatro sítios marinhos, distantes do rio Bücheler, Santa Catarina, Brasil, que recebe todo o aporte de lixo doméstico. Os resultados demonstraram maior atividade enzimática em ambos os órgãos da *C. rhyzophorae*, que foram mais intensas quanto mais próximas do local de emissão, enquanto a *C. gigas* apresentou um incremento somente na atividade da enzima branquial. Estas variáveis permitiram concluir que o primeiro indivíduo é mais sensível e melhor bioindicador ambiental

A catalase é ainda utilizada como marcadora em indivíduos evolutivamente superiores como os peixes (Bainy et al. 1996) da espécie *Oreochromis niloticus*, no monitoramento de áreas poluídas, e o resultado é a inibição da atividade da catalase, o que confirma elevado grau de contaminação da região. Atli & Canli (2007), também utilizaram *O. niloticus* para exposição a concentrações de cádmio e chumbo, e o resultado foi o aumento da atividade da catalase. Ventura et al. (2002) utilizaram a espécie *Orthopristis ruber* no monitoramento de poluentes em águas costeiras nas Baías de Guanabara, Sepetiba e Ilha Grande no Rio de Janeiro e obtiveram como resultado, um gradiente de atividade catalásica, o que demonstrou o elevado grau de poluição na seguinte seqüência: Baía de Guanabara, Ilha Grande e, por fim, Sepetiba. Outro trabalho que também utilizou a catalase como marcadora foi o de Dautremepuits et al. (2004), que avaliou a interferência do cobre e de fungicidas, a base de cobre, sobre o fígado e rim em peixes da espécie *Cyprinus carpio* L.. O resultado observado foi o aumento na atividade enzimática no quarto dia de experimento, e no oitavo dia, a atividade enzimática foi semelhante ao teste controle. Entretanto, ao ser estudado o efeito de fenol sobre a atividade da catalase, como descrito por Avilez et al. (2008), ficou estabelecido que esse agente impactante não exerce efeitos significativos sobre a atividade enzimática em matrinxã (*Brycon amazonicus*).

---

## Utilização da Superóxido Dismutase

A superóxido dismutase (SOD, 1.15.1.1) é uma das principais enzimas utilizadas no combate ao dano oxidativo das espécies reativas de oxigênio (Chandran et al. 2005; Gu et al. 2006; Avilez et al. 2008). Os estudos desenvolvidos por McCord

& Fridovich (1969), estabeleceram parte da distribuição e função da enzima em proteger o citocromo c ao reduzir o radical superóxido, diminuindo a presença dos radicais livres. Por outro lado, os eucariotos apresentam duas formas da enzima, uma contendo manganês, encontrada na mitocôndria e outra com zinco e cobre, localizada no citoplasma (Berg et al. 2004).

O substrato da superóxido dismutase é o radical superóxido gerado normalmente nos organismos aeróbicos, durante o processo de oxidação. Por esse motivo, o primeiro impasse para a realização de um teste dessa enzima é a disponibilização do radical livre, que deverá ser gerado no processo de estudo (Flohé & Ötting, 1984).

O mecanismo de reação se inicia com a redução da enzima pelo superóxido, resultando na formação de oxigênio. A enzima reduzida reage novamente com outro íon superóxido formando como produto, o peróxido de hidrogênio, que na seqüência, sofre dismutação pela catalase ou outra peroxidase, originando água e oxigênio molecular (Berg et al. 2004).

A superóxido dismutase demonstrou ser excelente marcadora do estresse oxidativo. Em gastrópodes (*Achantina fulica*) expostos ao cádmio e zinco, a atividade enzimática determinada no rim e na glândula digestiva apresentou inibição mais significativa para o zinco (Chandran et al. 2005). Em brânquias de moluscos bivalves (*Pinctada fucata*), expostas a baixas concentrações de cobre, o resultado foi o aumento da atividade enzimática ao contrário do obtido em altas concentrações, que resultou em inibição enzimática. Quando os parâmetros cinéticos foram acompanhados na glândula digestiva do mesmo indivíduo, a atividade da superóxido dismutase aumentou após 24 horas do início do ensaio e manteve-se elevada até 72 horas, quando comparadas ao controle (Gu et al. 2006). Todavia, as brânquias de mexilhões *Bathymodiolus azoricus* expostos ao cádmio, mercúrio e cobre apresentaram inibição na atividade da superóxido dismutase como observados por Company et al. (2004). Em peixes *Brycon amazonicus* expostos ao fenol, não foram denotado diferença na atividade da enzimática (Avilez et al. 2008). Por outro lado, Letendre et al. (2008), utilizaram a superóxido dismutase como medidor do estresse oxidativo causado pelo ciclo de maré na espécie *Mytilus edulis*, os quais foram divididos em grupos e submetidos a regiões marinhas profundas e superficiais. O resultado foi o aumento na atividade enzimática naqueles grupos alocados em ambiente mais profundo.

---

## Utilização das Glutonas

O glutatona é um tripeptídeo que possui radical sulfidrila na sua estrutura e se apresenta na forma reduzida de tiol

(GSH) e na oxidada (GSSG), na qual dois tripeptídeos são ligados por uma ponte dissulfeto. A enzima responsável pela redução de GSSG a GSH é a glutatona redutase (GR, E.C. 1.6.4.2), uma flavoproteína que utiliza NADPH como fonte de elétrons e prótons para a reação de redução (Berg et al. 2004). A enzima responsável pela oxidação é a glutatona peroxidase (GPx, E.C. 1.11.1.9), que exerce papel importante na detoxificação de substâncias geradas pelos xenobióticos, como peróxido de hidrogênio ou peróxidos orgânicos, cofatores para formação de GSSG (Tekman et al. 2008). Uma característica dessa enzima é a presença de um átomo de selênio (Se) ligado ao seu centro reativo, em forma de seleneto (enzima-Se<sup>-</sup>), que reduz o substrato peróxido a um álcool, que por sua vez oxida o ácido selenênico (enzima-SeOH). Essa reação permite a interação da enzima com a glutatona reduzida formando seleno-sulfeto (enzima-Se-S-Glutatona). A interação desse complexo com a segunda molécula de glutatona reduzida forma a GSSG, glutatona oxidada, o que regenera a forma ativa da enzima (Berg et al. (2004).

A glutatona peroxidase é largamente utilizada como biomarcadora, o que demonstra a obtenção de resultados expressivos em diversas situações de estresse, seja por compostos orgânicos ou inorgânicos. A atividade enzimática é amplamente inibida por ação de compostos intoxicantes, como observado no trabalho desenvolvido Chandran et al. (2005) que expuseram gastrópodes ao cádmio e ao zinco, assim como Gu et al. (2006) que obtiveram resultados semelhantes com bivalves expostos ao cobre, e ainda Avilez et al. (2008) quando submetem peixes a compostos fenólicos.

No trabalho desenvolvido por Company et al. (2004), a glutatona peroxidase apresentou inibição expressiva quando mexilhões da espécie *Bathymodiolus azoricus* foram submetidos a concentrações de cádmio, cobre e mercúrio. Entretanto, a atividade enzimática se elevou em brânquias de truta marrom (*Salmo trutta*) expostas ao cádmio, cobre e zinco, assim como o aumento da expressão gênica envolvido na produção da enzima (Hansen et al. 2006).

A Glutatona-S-transferase (GST, E.C. 2.5.1.18), por sua vez, pertence a uma família multifuncional de proteínas envolvidas no processo de detoxificação celular e correção dos efeitos deletérios de compostos xenobióticos como drogas, herbicidas, compostos químicos carcinogênicos e poluentes ambientais. A enzima catalisa a conjugação da glutatona reduzida (GSH) com compostos endógenos ou exógenos de poluentes, a fim de torná-los menos tóxicos, mais solúveis em água e mais fáceis de serem degradados e excretados. A glutatona-S-transferase pode atuar como peroxidases, isomerases ou ainda tiol transferase (Carletti et al. 2008; Huber & Almeida, 2008).

A enzima é utilizada em programas de monitoramento de compostos químicos poluentes, principalmente metais

pesados, pelo fato de apresentar inibição da atividade. Segundo Regoli et al. (1998), essa inibição está envolvida com a desestabilização da membrana lisossômica provocada pela exposição aos metais pesados ou ao estresse de radicais livres, o que pode causar a ruptura da membrana e liberar diversos radicais e íons ácidos, que prejudica o funcionamento normal da enzima.

A atividade enzimática em glândulas digestivas do molusco *Adamussium colbecki* apresentou inibição quando os indivíduos foram expostos ao cobre e ao mercúrio, com efeitos mais severos em organismos sob a influência do mercúrio (Regoli et al. 1998). Entretanto, a atividade da enzima na glândula digestiva do mexilhão *Perna perna* se elevou em sítios de poluição industrial em Santa Catarina, Brasil (Bainy et al. 2000), assim como no cérebro de peixes da espécie *Corydoras paleatus* que também sofreu elevação quando expostos à dieta de ácido lipóico, apesar de músculos, fígado e brânquias terem se mantido semelhante ao grupo controle (Monserrat et al. 2008). Resultados opostos foram observados brânquias de *Perna perna* e *Crassostrea rhizophorae* expostos ao pesticida Furadan (Alves et al. 2002), cujas atividades enzimáticas não foram significativas. Em brânquias de *Crassostrea gigas* expostas a descargas de poluentes domésticos também não foram observadas quaisquer alterações significativas na atividade da enzima (Zanette et al. 2008).

## Considerações finais

Os diversos estudos citados na literatura confirmam a importância das enzimas, principalmente do estresse oxidativo, no monitoramento da qualidade ambiental. A análise da atividade dessas enzimas, isoladas dos bioindicadores, permite maior controle do ambiente e funciona como sinal de alerta de contaminação, além de permitir ratificar a atividade antrópica. O método, muito utilizado em programas de monitoramento, permite maior vigilância sobre quaisquer ações danosas ao equilíbrio do meio, com a possibilidade, inclusive, de nortear ações preventivas contra impactos ambientais. Contudo, o mecanismo bioquímico de defesa encontrado nos seres vivos, como forma de combater a ação de compostos tóxicos prejudiciais à saúde, dependem tanto da capacidade funcional da cada tecido como da resposta das enzimas aos diferentes contaminantes. Portanto, o aprimoramento de estudos de novas técnicas com a finalidade de promover o monitoramento ambiental é necessário a fim de minimizar das ações danosas sobre as diversas formas de vida.

## Agradecimentos

Ao Centro Universitário Vila Velha (UVV) pelo apoio à pesquisa e concessão de materiais para a realização do estudo, à FUNADESP pela bolsa de pesquisa e à FAPES pelo apoio financeiro.

## Referências

- Aebi H (1984) Catalase in Vitro. **Methods in Enzymology** 105:121-126.
- Alves SRC, Severino PC, Ibbotson DP, Silva AZ, Lopes FRAS, Sáenz LA & Bainy ACD (2002) Effects of furadan in the brown mussel *Perna perna* and in the mangrove oyster *Crassostrea rhizophorae*. **Marine Environmental Research** 54:241-245.
- Anandraj A, Marshall DJ, Gregory MA & McClurg TP (2002) Metal accumulation, filtration and O<sub>2</sub> uptake rates in the mussel *Perna perna* (Mollusca: Bivalvia) exposed to Hg<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup> and Zn<sup>2+</sup>. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C** 132:355-363.
- Arias ARL, Buss DF, Albuquerque C, Inácio AF, Freire MM, Egler M, Mugnai R & Baptista DF (2007) Utilização de bioindicadores na avaliação de impacto e no monitoramento da contaminação de rios e córregos por agrotóxicos. **Ciência e saúde coletiva** 12:61-72.
- Aspuro-Hernandez E, Garcia-Orozco KD, Muhlia-Almazan LTS, Robles-Sanches RM, Hernandez J, Gonzales-Aguilar G, Yepiz-Plascenci G & Sotelo-Mundo RR (2008) Shrimp thioredoxin is a potent antioxidant protein. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C** 148:94-99.
- Atli G & Canli M (2007) Enzymatic responses to metal exposures in a freshwater fish *Oreochromis niloticus*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C** 145:282-287.
- Avilez IM, Hori TSF, Almeida LC, Hackbarth A, Bastos Neto JC, Bastos VLFC & Moraes G (2008) Effects of phenol in antioxidant metabolism in matrinxã, *Brycon amazonicus* (Teleostei; Characidae). **Comparative Biochemistry and physiology Part C** 148:136-142.
- Bainy ACD, Almeida EA, Müller IC, Ventura EC & Medeiros ID (2000) Biochemical responses in farmed mussel *Perna perna* transplanted to contaminated sites on Santa Catarina Island, SC, Brazil. **Marine Environmental Research** 50:411-416.
- Bainy ACD, Saito E, Carvalho PSM & Junqueira VBC (1996) Oxidative stress in Gill, erythrocytes, liver and kidney of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) from a polluted site. **Aquatic Toxicology** 34:151-162.
- Berg JM, Tymoczko JL & Stryer L (2004) **Bioquímica**. 5.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.
- Bernet D, Schmidt H, Wahli T & Burkhardt-Holm P (2001) Effluent from a sewage treatment works causes changes in serum chemistry of brown trout (*Salmo trutta* L.). **Ecotoxicology and Environmental Safety** 48:140-147.
- Bertin G & Averbeck D (2006) Cadmium: cellular effects, modifications of biomolecules, modulation of DNA repair and genotoxic consequences (a review). **Biochimie** 88:1549-1559.

- Bocchetti R, Fattorini D, Pisanelli B, Macchia S, Oliviero L, Pilato F, Pellegrini D & Regoli F (2008) Contaminant accumulation and biomarker responses in caged mussels, *Mytilus galloprovincialis*, to evaluate bioavailability and toxicological effects of remobilized chemicals during dredging and disposal operations in harbour areas. **Aquatic Toxicology** 89:257-266.
- Bonnet JL, Bonnemoy F, Dusser M & Bohatier J (2008) Toxicity assessment of the herbicides sulcotrione and mesotrione toward two reference environmental microorganisms: *Tetrahymena pyriformis* and *Vibrio fischeri*. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology** 55:576-583.
- Carletti E, Sulpizio M, Bocciarelli T, Boccio PD, Federici L & Di Ilio C (2008) Glutathione transferases from *Anguilla anguilla* liver: Identification, cloning and functional characterization. **Aquatic Toxicology** 90:48-57.
- Chandran R, Sivakumar AA, Mohandass S & Aruchami M (2005) Effect of cadmium and zinc on antioxidant enzyme activity in the gastropod, *Achatina fulica*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C** 140:422-426.
- Company R, Serafim A, Bebianno MJ, Cosson R, Shillito B & Fiala-Médioni A (2004) Effect of cadmium, copper and Mercury on antioxidant enzyme activities and lipid peroxidation in the gills of the hydrothermal vent mussel *Bathymodiolus azoricus*. **Marine Environmental Research** 58:377-381.
- Dautremepuits C, Paris-Palacios S, Betoulle S & Vernet G (2004) Modulation in hepatic and head kidney parameters of carp (*Cyprinus carpio* L.) induced by copper and chitosan. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C** 137:325-333.
- Flohé L & Ötting F (1884) Superoxide Dismutase Assays. **Methods in Enzymology** 105:93-94.
- Gu J, Li Y, Xie L & Zhang R (2006) Metal accumulation and enzyme activities in gills and digestive gland of pearl oyster (*Pinctada fucata*) exposed to copper. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C**.
- Hansen BH, Romma S, Garmo A, Olsvik PA & Andersen RA (2006) Antioxidative stress proteins and their gene expression in brown trout (*Salmo trutta*) from three rivers with different heavy metal levels. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C** 143:263-274.
- Huber PC & Almeida WP (2008) Glutathione e enzimas relacionadas: papel biológico e importância em processos patológicos. **Química Nova** 31:1170-1179.
- Ivanina AV, Habinck E & Sokolova IM (2008) Differential sensitivity to cadmium of key mitochondrial enzymes in the eastern oyster, *Crassostrea virginica* Gmelin (Bivalvia: Ostreidae). **Comparative Biochemistry and Physiology Part C** 148:72-79.
- Lam WG, Wong MK, Chen N & Sin YM (1995) Effect of combined copper, zinc, chromium and selenium by orthogonal array design on alkaline phosphatase activity in liver of the red sea bream, *Chrysophrys major*. **Aquaculture** 131:219-230.
- Lehninger AL, Nelson DL & Cox MM (1995) **Princípios de Bioquímica**. 2.ed. São Paulo: Savier.
- Letendre J, Chouquet B, Rocher B, Manduzio H, Leboulenger F & Durand F (2008) Differential pattern of Cu/Zn superoxide dismutase isoforms in relation to tidal spatio-temporal changes in the blue mussel *Mytilus edulis*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C** 148:211-216.
- Levy JL, Angel BM, Stauber JL, Poon WL, Simpson SL, Cheng SH & Jolley DF (2008) Uptake and internalization of copper by three marine microalgae: Comparison of copper-sensitive and copper-tolerant species. **Aquatic Toxicology** 89:82-93.
- Livingstone DR (1993) Biotechnology and pollution monitoring: use of molecular biomarkers in the aquatic environment. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology** 57:195-211.
- McCord JM & Fridovich I (1969) Superoxide Dismutase: an enzymic function for erythrocyte hemocuprein. **Journal of Biological Chemistry** 244:6049-6055.
- Monserrat JM, Lima JV, Ferreira JLR, Acosta D, Garcia ML, Ramos PB, Moraes TB, Santos LC & Amado LL (2008) Modulation of antioxidant and detoxification responses mediated by lipoic acid in the fish *Corydoras paleatus* (Callychthyidae). **Comparative Biochemistry and Physiology Part C** 148:287-292.
- Ng TY-T, Rainbow PS, Amiard-Triquet C, Amiard J-C & Wang W-X (2008) Decoupling of cadmium biokinetics and metallothionein turnover in a marine polychaete after metal exposure. **Aquatic Toxicology** 89:47-54.
- Nicholson S & Lam PKS (2005) Pollution monitoring in Southeast Asia using biomarker in the mytilid mussel *Perna viridis* (Mytilidae: Bivalvia). **Environment International** 31:121-132.
- Rashed NM (2001) Monitoring of environmental heavy metals in fish from Nasser Lake. **Environment International** 27:27-33.
- Regoli F, Nigro M & Orlando E (1998) Lysosomal and antioxidant responses to metals in the Antarctic scallop *Adamussium colbecki*. **Aquatic Toxicology** 40:375-392.
- Tekman B, Ozdemir H, Senturk M & Ciftci M (2008) Purification and characterization of glutathione reductase from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) liver and inhibition effects of metal ions on enzyme activity. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C** 148:117-121.
- Valavanidis A, Vlahogianni T, Dassenakis M & Scoullou M (2006) Molecular biomarkers of oxidative stress in aquatic organisms in relation to toxic environmental pollutants. **Ecotoxicology and Environmental Safety** 64:178-189.
- Ventura EC, Gaelzer LR, Zanette J, Marques MRF & Bainy ACD (2002) Biochemical indicators of contaminant exposure in spotted pigfish (*Orthopristis ruber*) caught at three bays of Rio de Janeiro coast. **Marine Environmental Research** 54:775-779.
- Zanette J, Nunes FF, Medeiros ID, Siebert MN, Mattos JJ, Luchmann KH, Melo CMR & Bainy ACD (2008) Comparison of the antioxidant defense system in *Crassostrea rhizophorae* and *Crassostrea gigas* exposed to domestic sewage discharges. **Marine Environmental Research** 66:196-198.