

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
UNIVERSIDADE ESTADUAL DO RIO GRANDE DO SUL  
CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: ÊNFASE EM BIOLOGIA MARINHA E COSTEIRA**

**GUILHERME SOARES CHRISTO**

**ANÁLISE DE PARÂMETROS DO BALANÇO REDOX EM  
POPULAÇÕES DO MEXILHÃO *Perna perna* (LINNAEUS, 1758)  
(MOLLUSCA: BIVALVIA: MYTILIDAE) NO LITORAL NORTE DO  
RIO GRANDE DO SUL, BRASIL**

**IMBÉ/OSÓRIO**

**2014**

**GUILHERME SOARES CHRISTO**

**ANÁLISE DE PARÂMETROS DO BALANÇO REDOX EM  
POPULAÇÕES DO MEXILHÃO *Perna perna* (LINNAEUS, 1758)  
(MOLLUSCA: BIVALVIA: MYTILIDAE) NO LITORAL NORTE DO  
RIO GRANDE DO SUL, BRASIL**

Trabalho de conclusão de curso apresentado como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas com ênfase em Biologia Marinha e Costeira pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Orientador: Prof. Dr. Emerson André Casali

**IMBÉ/OSÓRIO**

**2014**

**GUILHERME SOARES CHRISTO**

**ANÁLISE DE PARÂMETROS DO BALANÇO REDOX EM  
POPULAÇÕES DO MEXILHÃO *Perna perna* (LINNAEUS, 1758)  
(MOLLUSCA: BIVALVIA: MYTILIDAE) NO LITORAL NORTE DO  
RIO GRANDE DO SUL, BRASIL**

Trabalho de conclusão de curso apresentado  
como requisito parcial para obtenção do título  
de Bacharel em Ciências Biológicas com  
ênfase em Biologia Marinha e Costeira pela  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Orientador: Prof. Dr. Emerson André Casali

Aprovado em:     /     /

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof. Dr. Fábio Klamt  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Márcia Trapp  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

**IMBÉ/OSÓRIO**

**2014**

## RESUMO

Atualmente, com a grande extração de recursos naturais, são crescentes as tentativas de preservação do nosso ambiente. Sendo assim, é de grande interesse a utilização de ferramentas de avaliação da qualidade ambiental. Os organismos bioindicadores fornecem informações a respeito do seu ambiente, sendo amplamente utilizados em estudos com esta finalidade, bem como programas de monitoramento ambiental. Este estudo foi realizado no Litoral Norte do Rio Grande do Sul, com mexilhões da espécie *Perna perna* em três pontos de coleta: nas plataformas de pesca de Cidreira (p1), Tramandaí (p2) e Atlântida (p3). Foram realizadas duas coletas, a fim de comparar os parâmetros oxidativos durante os períodos de verão e inverno. Foram determinadas as atividades das enzimas superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT), bem como quantidade de dano oxidativo a lipídeos (LPX) no tecido do manto dos indivíduos. Foi observada uma variação sazonal dos padrões oxidativos, com valores maiores de LPX e menores de atividade da SOD durante o período de verão. Ao analisar as diferenças dos parâmetros entre os sexos dos indivíduos, observamos uma predominância para valores mais elevados associados a mexilhões machos, com exceção da SOD, que apresentou atividade elevada predominantemente em fêmeas. Comparando-se os parâmetros observados em cada ponto, no mesmo período de coleta, foram obtidos valores claramente maiores para Cidreira no período do inverno, e no verão a atividade da SOD foi maior nos organismos de Tramandaí, enquanto que para a LPX não foi observada variação. A partir dos resultados obtidos pode concluir-se que existe uma diferença entre as pressões ambientais presentes em cada um dos pontos, bem como uma variação nas mesmas dependendo da estação do ano, possivelmente devido ao aumento da população durante o verão. Trabalhos envolvendo estes organismos são ainda escassos na região estudada, de forma que é importante dar continuidade às pesquisas nesta área, pois organismos bioindicadores como *P. perna* são de grande valia no monitoramento da qualidade ambiental.

**Palavras-chave:** Estresse oxidativo. Biomonitoramento, Biomarcadores. Bioindicadores.

## ABSTRACT

Nowadays, with the growing extraction of natural resources, attempts to preserve our environment are increasing. Therefore, the usage of tools to evaluate environmental quality is of great interest. Bioindicator organisms provide information regarding their environment, being commonly used in studies for that purpose, as well as in programs of environmental monitoring. This study was conducted in the northern shore of the Rio Grande do Sul state, Brazil, using mussels of the species *Perna perna* in three sampling sites: in the fishing platforms of the cities Cidreira (p1), Tramandai (p2) and Atlantida (p3). Two sample periods were done during the study, in order to compare the oxidative parameters during the summer and winter periods. The activity of the enzymes superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) were determined, as well as the amount of oxidative damage to lipids (LPX) in the mantle tissue of these individuals. A seasonal variation of the oxidative parameters was observed, with higher values of LPX and lower values of SOD activity during the summer. By analyzing the differences in parameters between the individual's genders, a predominance of higher values for male mussels is observed, except for the SOD, which showed higher activity predominantly in females. By comparing the values observed in each sampling station, during the same period, considerably higher values were obtained for the Cidreira platform during the winter, and in the summer SOD activity was higher in Tramandaí organisms, while for LPX no variation was evidenced. From the results obtained, one may conclude that there's a difference between the environmental pressures in each sampling station, as well as a variation in each of them depending on the season, possibly due to the population increase during the summer. Studies involving these organisms are still scarce in this particular region, so it's important to continue researching in this area, for bioindicator organisms, such as *P. perna* are of great value in monitoring environmental quality.

**Keywords:** Oxidative stress. Biomonitoring. Biomarkers. Bioindicators

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	6
1.1	OBJETIVOS.....	7
1.1.1	<b>Objetivo Geral</b> .....	7
1.1.2	<b>Objetivos Específicos</b> .....	7
1.2	JUSTIFICATIVA.....	7
<b>2</b>	<b>REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	9
2.1	ERO E O ESTRESSE OXIDATIVO.....	9
2.2	BIOMARCADORES.....	11
2.2.1	<b>Biomarcadores enzimáticos</b> .....	11
2.2.1.1	<i>Superóxido Dismutase (SOD)</i> .....	12
2.2.1.2	<i>Catalase (CAT)</i> .....	12
2.2.2	<b>Biomarcadores não enzimáticos</b> .....	12
2.3	O MEXILHÃO ( <i>Perna perna</i> ).....	13
<b>3</b>	<b>ÁREA DE ESTUDO</b> .....	15
<b>4</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	17
4.1	MATERIAL BIOLÓGICO.....	17
4.2	COLETA DE INDIVÍDUOS (ESPÉCIMES E AMOSTRAS).....	17
4.3	ANÁLISES BIOQUÍMICAS.....	18
4.3.1	<b>Preparo das amostras</b> .....	18
4.3.2	<b>Quantificação das proteínas</b> .....	18
4.3.3	<b>Quantificação da LPX</b> .....	19
4.3.4	<b>Atividade da SOD</b> .....	19
4.3.5	<b>Atividade da CAT</b> .....	19
4.4	ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS RESULTADOS.....	19
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	20
<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	24
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	25

## 1 INTRODUÇÃO

Cada vez mais, a poluição dos ambientes aquáticos, tanto marinhos como de água doce, vem aumentando. A utilização dos recursos naturais pelo homem se dá de forma completamente insustentável, e apesar das grandes conquistas que se obteve nas últimas décadas nos campos da ciência e tecnologia, o mesmo não se pode aplicar à sua relação com o meio-ambiente.

O esgoto proveniente de aglomerados urbanos não é somente rico em nutrientes. Existe toda uma gama de substâncias resultantes da atividade humana que são descartadas e muitas vezes terminam no oceano sem qualquer tratamento. Da mesma forma, atividades relacionadas à indústria e agricultura são responsáveis pela introdução de compostos químicos no ambiente marinho.

Porém, uma vez no oceano, tais compostos se tornam difusos e de difícil avaliação quando utilizada apenas a quantificação química através de análises de água. Por esse motivo, os biomarcadores consistem em ferramentas importantes para avaliação da qualidade ambiental, e sua utilização em conjunto com as análises químicas pode ser considerada uma ferramenta confiável para avaliar o impacto de contaminantes de origem antrópica (LAM; GRAY, 2003).

Um grupo de biomarcadores amplamente utilizados neste tipo de estudo são os do estresse oxidativo. Dentro deste grupo se encontram biomarcadores enzimáticos (e.g. superóxido dismutase, catalase e glutathione peroxidase) e não-enzimáticos (e.g. carbonilação e lipoperoxidação) (ALMEIDA *et al.*, 2005; ALMEIDA *et al.*, 2007; COGO *et al.*, 2009; JENA; VERLECAR; CHAINY, 2009).

O estresse oxidativo é uma condição que resulta do acúmulo de danos oxidativos, pelo excesso de produção de espécies reativas de oxigênio (ERO), compostos deletérios de redução parcial do oxigênio, capazes de reagir com diversos componentes celulares, ou diminuição das defesas antioxidantes (LEHNINGER, 1917). Este aumento na produção de ERO pode ter diversas causas, sendo normalmente advindos de estresses ambientais, como variação na temperatura, concentrações de oxigênio e salinidade da água, dissecação, predação e escassez de recurso alimentar e a presença de contaminantes na água (KENNEDY, 1976; WIDDOWS; DONKIN, 1992).

Visto que diversas das substâncias que induzem o estresse oxidativo, bem como os danos provenientes do mesmo, são passíveis de bioacumulação ou possíveis causadores de

danos aos demais organismos da cadeia alimentar, se faz importante o biomonitoramento destes ambientes através de organismos indicadores de qualidade, como é o caso de moluscos filtradores como o *Perna perna*.

## 1.1 OBJETIVOS

Abaixo são apresentados os objetivos geral e específicos para o presente estudo.

### 1.1.1 Objetivo Geral

Avaliar parâmetros oxidativos nos indivíduos de diferentes populações do mexilhão *Perna perna* no Litoral Norte do Rio Grande do Sul, Brasil.

### 1.1.2 Objetivos Específicos

Quantificar as atividades das enzimas catalase (CAT) e superóxido dismutase (SOD) no tecido do manto de mexilhões *Perna perna* coletados em Cidreira, Tramandaí e Atlântida, Rio Grande do Sul, Brasil.

Quantificar os danos oxidativos a lipídios (LPX) no tecido do manto de mexilhões *Perna perna* coletados em Cidreira, Tramandaí e Atlântida, Rio Grande do Sul, Brasil.

Verificar o efeito da variação sazonal sobre os parâmetros oxidativos supracitados nas populações de mexilhões estudadas.

Observar se existem diferenças nas atividades enzimáticas e nos danos às biomoléculas entre indivíduos machos e fêmeas.

## 1.2 JUSTIFICATIVA

Este estudo se justifica pela importância dos trabalhos realizados com organismos biomonitores, capazes de fornecer informações importantes acerca da qualidade ambiental, bem como alertar sobre alterações no ambiente, enfatizando a importância de monitoramentos



em longo prazo com as populações dos mesmos. Existe também uma escassez de estudos científicos sobre a fisiologia das populações de *P. perna* no litoral norte de modo que este estudo se torna relevante e contribui com a literatura sobre o tema.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

A transformação de energia em células heterotróficas necessita de fontes externas de carbono (e.g. glucose). Estas células podem ser divididas em dois grupos: as aeróbicas utilizam o oxigênio molecular como último aceptor dos elétrons obtidos na alimentação, ao passo que as anaeróbicas utilizam outras moléculas como aceptores destes elétrons (LEHNINGER, 1917).

As moléculas altamente energéticas são metabolizadas por uma série de reações de oxidação, produzindo CO<sub>2</sub> e água. Ao longo deste processo, os intermediários metabólicos doam elétrons para as coenzimas NAD<sup>+</sup> e FAD, reduzindo-as a formas mais energéticas: NADH e FADH<sub>2</sub>. Estas coenzimas, por sua vez, podem doar um par de elétrons para moléculas transportadoras, processo este denominado cadeia de transporte de elétrons. Esta cadeia, presente na membrana interna das mitocôndrias, consiste na rota final, pela qual os elétrons oriundos da oxidação de compostos orgânicos são doados para o oxigênio (CHAMPE; HARVEY, 1996).

Durante este transporte até o oxigênio molecular, bem como em algumas reações de hidroxilação e oxigenação, são produzidos compostos deletérios de redução parcial do oxigênio, capazes de reagir com diversos componentes celulares, danificando-os (LEHNINGER, 1917). Estes compostos são conhecidos como Espécies Reativas de Oxigênio (ERO).

### 2.1 ERO E O ESTRESSE OXIDATIVO

Os radicais livres de oxigênio e as ERO são produzidos constantemente pelo metabolismo celular nos organismos aeróbicos. Estudos demonstram que a presença destes compostos, quando em equilíbrio, é importante, pois muitos são utilizados pelos organismos para efeitos vantajosos (AMES; SHIGENAGA; HAGEN, 1993).

Dentre as ERO estão o íon superóxido (O<sub>2</sub> •<sup>-</sup>), o peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), o oxigênio livre (O<sub>1</sub>) e o radical hidroxila (•OH) (ALMEIDA *et al.*, 2007), porém outros são citados por Chandran *et al.* (2005).

A manutenção da homeostase redox é essencial para a saúde fisiológica dos organismos, mas, durante os processos metabólicos, de 2 a 3% do oxigênio consumido gera

ERO que, se não forem neutralizadas, causam dano oxidativo aos componentes celulares. A esta discrepância entre as taxas de produção e neutralização das ERO pelas defesas antioxidantes se dá o nome de estresse oxidativo (ALMEIDA *et al.*, 2005; VALAVANIDIS *et al.*, 2006).

O aumento da produção de ERO nos organismos pode ser causado por diferentes fatores, que comumente se originam de mudanças no meio. Porém este incremento pode ser ocasionado por fontes endógenas. Diversas enzimas oxidativas consistem em fontes internas de ERO: a triptofano dioxigenase, a xantina oxidase e a citocromo P450 redutase geram  $O_2^{\bullet-}$ , ao passo que as enzimas guanil ciclase e glicose oxidase geram  $H_2O_2$  (VIGO-PELFREY, 1990).

Atualmente, a atividade humana e o desenvolvimento dos centros urbanos e industriais aumentaram criticamente os níveis de poluentes liberados no ambiente, principalmente em regiões estuarinas e costeiras (LIMA *et al.*, 2007). A exposição a compostos xenobióticos bioacumuláveis (e.g. metais pesados) pode causar um aumento da produção de ERO e uma redução das defesas antioxidantes (COGO *et al.*, 2009; VALAVANIDIS *et al.*, 2006), caracterizando um quadro de estresse oxidativo.

O acúmulo de metais de transição, como o ferro e o cobre, nos tecidos pode incrementar a produção de  $HO^{\bullet}$ . Através da Reação de Fenton, os metais reagem com o peróxido de hidrogênio, resultando na formação do radical hidroxil ( $Fe^{2+} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{3+} + HO^- + HO^{\bullet}$ ) (CHAMPE; HARVEY, 1996; HALLIWELL, 1992).

Variáveis ambientais podem ter papel importante no aumento da produção de ERO, de forma que o estresse oxidativo muitas vezes apresenta variação sazonal em determinadas populações, como observado no trabalho de Verlecar, Jena e Chainy (2008). Fatores como a variação na temperatura da água, mudanças na salinidade, oxigênio dissolvido e dissecação, em função das variações das marés, bem como a disponibilidade de alimentos são alguns exemplos de estressores ambientais comuns a populações de bivalves como *Perna perna* (ALMEIDA *et al.*, 2007).

As ERO possuem potencial tóxico, sendo capazes de oxidar proteínas, enzimas, DNA, lipídeos, receptores e íons (CONCEIÇÃO *et al.*, 2008; STOREY, 1996), causando dano à tecidos, inflamação, doenças degenerativas e envelhecimento (SOHAL; MOCKETT; ORR, 2002).

As duas espécies reativas mais estudadas são o ânion superóxido e o radical hidroxil. O ânion superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ) oxida vitaminas antioxidantes, catecolaminas e tióis, e é capaz de

reagir com enzimas como peroxidases e a catalase, desativando-as. O radical hidroxil é a ROS de maior capacidade oxidativa (ALMEIDA *et al.*, 2007), reagindo indiscriminadamente com componentes celulares como lipídeos de membrana, proteínas e o material genético.

## 2.2 BIOMARCADORES

O ambiente aquático consiste no destino final de uma gama de substâncias nocivas e poluentes. Os organismos que utilizam estes habitats, portanto, acumulam tais compostos, ou seus metabólitos, que podem causar efeitos sub-letais de difícil quantificação através apenas de análises químicas (SEMEDO *et al.*, 2012). Por este motivo, em programas de biomonitoramento nestes ambientes, se faz necessária a utilização de indicadores que alertem antecipadamente sobre os efeitos de tais substâncias, os biomarcadores (TORRES; NETO, 2007). Biomarcadores podem, então, ser caracterizados como fluídos corpóreos, células, tecidos, respostas fisiológicas, comportamentais ou energéticas que indicam a presença de contaminantes em um determinado meio, em termos bioquímicos ou celulares (LIVINGSTONE, 1993), porém a interpretação destas respostas em um contexto ambiental é complexa, devido às diferentes possíveis causas que devem ser levadas em consideração (SHEEHAN; POWER, 1999).

Hoje em dia, o uso integrado da quantificação química com as respostas dos biomarcadores é considerado uma ferramenta confiável para avaliar o impacto de contaminantes de origem antrópica (LAM; GRAY, 2003).

Sistemas biológicos desenvolveram defesas antioxidantes, ao longo da evolução, de forma a proteger seus componentes celulares dos danos oxidativos decorrentes das situações de estresse (CONCEIÇÃO *et al.*, 2008; VALAVANIDIS *et al.*, 2006). Tais defesas têm potencial de “limpeza” contra o estresse oxidativo, e são constituídas tanto por parâmetros enzimáticos como não enzimáticos, sendo ambos os tipos comumente utilizados como biomarcadores em estudos de monitoramento ambiental (DAVIES, 1995; VERLECAR; JENA; CHAINY, 2008).

### 2.2.1 Biomarcadores enzimáticos

Dois importantes biomarcadores enzimáticos, cuja atividade pode indicar o nível de estresse oxidativo nos organismos são descritos a seguir.

### 2.2.1.1 Superóxido Dismutase (SOD, EC 1.15.1.1)

A SOD constitui a primeira linha de defesa enzimática contra a produção intracelular de radicais livres, catalisando a dismutação do  $O_2^{\bullet-}$ . Está presente na matriz mitocondrial (Mn-SOD), no citosol (CuZn-SOD) e no meio extracelular. Embora o  $O_2^{\bullet-}$  não seja altamente danoso, pode extrair elétrons de diversos componentes celulares causando reações em cadeia de radicais livres. O produto resultante da reação catalisada pela SOD é o  $H_2O_2$  que deve ser retirado do meio o mais rápido possível (BANNISTER; CALABRESE, 1987).

### 2.2.1.2 Catalase (CAT, EC 1.11.1.6)

A catalase é uma hemoproteína que catalisa a degradação do  $H_2O_2$ . Na reação, uma das moléculas de peróxido de hidrogênio é oxidada a oxigênio molecular e a outra é reduzida a água. Está localizada, principalmente, no peroxissoma, entretanto, outras organelas, como as mitocôndrias, podem conter alguma atividade da CAT. A catálise do  $H_2O_2$  é importante, pois, na presença de  $Fe^{+2}$ , leva à formação de radical hidroxil ( $HO^{\bullet}$ ) (reação de Fenton), altamente reativo e danoso às biomoléculas (AEBI, 1984).

## 2.2.2 Biomarcadores não enzimáticos

Níveis de lipoperoxidação (LPX), levando à produção de compostos secundários (e.g. malondialdeído – MDA), são amplamente utilizados como indicadores de dano oxidativo aos compostos celulares (ALMEIDA *et al.*, 2005; VERLECAR; JENA; CHAINY, 2008). Essas reações são principalmente iniciadas através da reação dos compostos lipídicos com o radical hidroxil. Os produtos da LPX podem formar adutos de DNA, podendo gerar mutações e mudanças nos padrões da expressão gênica. As membranas, quando peroxidadas perdem a fluidez e a permeabilidade, tornando-se rígidas. Tais danos, quando acumulados, podem dar origem a condições patológicas em humanos (e.g. aterosclerose e anemia hemolítica) e outros organismos (STEINBERG, 1997).

De acordo com Conceição *et al.* (2008), outros biomarcadores não-enzimáticos de comum utilização são a glutatona reduzida (GSH), glutatona total (GT), glutatona oxidada (GSSG) e a oxidação de proteínas (carbonilação). A produção de 8-oxo-7,8-dihidro-2'-

desoxiguanosina (8-oxodGua), utilizada para mensurar danos oxidativos ao DNA, é citada por Cadet *et al.* (2002).

### 2.3 O MEXILHÃO (*Perna perna*)

O mexilhão (*P. perna*) é um molusco bivalve, pertencente à família Mytilidae. Possui uma fase larval livre-natante que mais tarde se adere a substratos consolidados através de fios do bisso, dando origem ao indivíduo juvenil. Passa então a possuir hábitos bentônicos, apesar de poderem se desprender do substrato para colonizar outras áreas (LOPES; FONSECA, 2008).

Normalmente habitam costões rochosos, porém podem ocupar qualquer substrato consolidado, natural ou artificial, encontrando-se colônias em embarcações, pilastras de portos, bóias, cordas submersas, e até mesmo chegando a entupir tubulações de água salgada, causando prejuízos à indústria. Ocupam da zona entremarés até o infralitoral, preferencialmente expostos à ação das ondas. As maiores concentrações se encontram na fração inferior da zona entremarés, até um metro de profundidade, onde a densidade de indivíduos pode ser de até 20.000 por metro quadrado (LOPES; FONSECA, 2008).

Acredita-se que *P. perna* tenha se originado na África, onde os registros fósseis são abundantes, e tenha se propagado para localidades como o Brasil através das navegações que transportavam escravos do continente africano. Hoje em dia possui uma ampla área de distribuição, ocorrendo no Mar Mediterrâneo, na costa da África, da Namíbia até o Estreito de Gibraltar. Ocupa o sul da Índia, Sri Lanka, a costa atlântica da América do Sul, América do Norte e algumas ilhas caribenhas (FERNANDES *et al.* 2008).

No Brasil acreditava-se que a espécie era nativa, devido à sua introdução ter se dado há muito tempo. Hoje em dia sugere-se que o mexilhão seja considerado uma espécie exótica estabelecida, possuindo importante papel na estruturação das comunidades em costões rochosos (FERNANDES *et al.* 2008). No Brasil, abunda do Rio de Janeiro à Santa Catarina, onde são amplamente utilizados como recurso alimentar (MARQUES, 1998), mas existem populações menores em estados como Espírito Santo e Rio Grande do Sul (FERNANDES *et al.* 2008).

Quando foi introduzido no Brasil, acredita-se que sua presença reduziu as populações de *Pinctada imbricata* (Röding, 1798), espécie considerada nativa por ser muito abundante nos registros históricos. Atualmente observa-se o mesmo processo ocorrendo com a espécie

*P. perna*: o bivalve exótico *Isognomon bicolor* (C. B. Adams, 1845) passou a ocupar as águas brasileiras e seu aumento populacional causa uma depleção nas populações do mexilhão, que consiste num importante recurso alimentar para a população (FERNANDES *et al.* 2008; SOUZA, 2003).

Organismos bioindicadores são classificados por Torres e Neto (2007) como aqueles que fornecem informações a respeito do ambiente circundante quando este não provê suas exigências fisiológicas básicas. Dentre os principais organismos utilizados como biomonitores estão espécies de moluscos, peixes, anfíbios e mamíferos (COTELLE; FERARD, 1999).

Bivalves como *P. perna* são frequentemente utilizados como bioindicadores de ambientes alterados, através das análises bioquímicas de enzimas do estresse oxidativo (ALVES *et al.*, 2002; BAINY *et al.*, 2000), devido à sua ampla distribuição, hábito sedentário, tolerância a diversas variações ambientais e também por serem filtradores de lento metabolismo, o que permite a bioacumulação de uma ampla gama de compostos químicos em seus tecidos corpóreos (GOLDBERG, 1975; WIDDOWS; DONKIN, 1992).

### 3 ÁREA DE ESTUDO

Este estudo foi realizado no Litoral Norte do Rio Grande do Sul, em três pontos de coleta: p1 situa-se na plataforma de pesca de Cidreira, p2 na plataforma de pesca de Tramandaí e p3 que se localiza na plataforma de pesca de Atlântida, localizada no município de Xangri-lá (Figura 1).

A região costeira do Rio Grande do Sul pode ser dividida em três porções: os litorais norte, médio e sul. O Litoral Norte possui uma extensão de 618 quilômetros, abrangendo 21 municípios. É limitado ao norte pelo município de Torres e ao sul por Palmares do Sul, onde faz fronteira com o Litoral Médio (DE MATOS; GRUBER, 2009). Segundo a classificação Köppen-Geiger, a região possui clima do tipo *cfa* (tropical úmido ou temperado), caracterizado por temperaturas médias nos meses mais frios entre 18°C e -3°C e temperatura do mês mais quente superior a 22°C (PEEL; FINLAYSON; MCMAHON, 2007).

Dentre os municípios que abrigam os pontos de coleta do trabalho, Tramandaí é o que possui a maior população residente (41.585 habitantes), seguido por Cidreira (12.668 habitantes) e Atlântida, pertencente ao município de Xangri-lá (12.434 habitantes) (IBGE - INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA, 2010). Durante os meses de verão, especialmente Janeiro e Fevereiro, essa população aumenta consideravelmente, com o êxodo de grande parte da população das grandes cidades para a região litorânea, podendo aumentar em mais de 10 vezes para muitos municípios do Litoral Norte (DE MATOS; GRUBER, 2009), o que aumenta consequentemente as descargas de poluentes e resíduos no ambiente marinho.

O p2 situa-se a cerca de dois mil metros da desembocadura do Rio Tramandaí, que é o ponto onde as águas da Bacia Hidrográfica do Rio Tramandaí se acumulam antes de desaguar no mar. Esta bacia abrange 15 municípios, com uma população residente de 198.235 habitantes (FEPAM - FUNDAÇÃO ESTADUAL DE PROTEÇÃO AMBIENTAL, 2013), que juntos somam uma grande carga de poluentes e resíduos sólidos levados ao mar através da desembocadura.

Também próximas ao p2, estão duas monobóias da Transpetro, que armazenam petróleo e derivados. Um derramamento de aproximadamente 33.600 litros ocorreu em uma delas, situada à cerca de 6 km da costa, no ano de 2012 (IBAMA - INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS, 2012), mas quantidades traço de hidrocarbonetos podem ser liberadas frequentemente na



região, principalmente durante operações de carga e descarga. Já o p1 localiza-se próximo a um grande sangradouro, onde deságuam poluentes, novamente com incremento no período de verão (FERRI, 2012).

Figura 1 – Mapa da área de estudo, com os municípios onde se localizam os pontos de coleta em destaque



Fonte: Autor (2014)

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

Foram realizadas, ao longo do trabalho, duas coletas. A primeira se deu no dia 7 de Setembro de 2013, durante o inverno. Nesta primeira coleta foram amostrados apenas mexilhões nos pontos 1 e 2 (Cidreira e Tramandaí), sendo coletados 10 indivíduos na plataforma de Cidreira (4 fêmeas e 6 machos) e 9 na de Tramandaí (5 fêmeas e 4 machos). A segunda amostragem foi realizada no dia 13 de Março de 2014, durante o verão. Foram coletados 8 indivíduos em cada um dos pontos: Cidreira (6 fêmeas e 2 machos), Tramandaí (3 fêmeas e 5 machos) e Atlântida (5 fêmeas e 3 machos).

### 4.1 MATERIAL BIOLÓGICO

Para avaliar elementos do balanço REDOX em mexilhões *Perna perna* coletados em Cidreira, Tramandaí e Atlântida, foram determinadas as atividades da CAT, da SOD e os níveis de LPX em homogeneizado de manto dos animais.

### 4.2 COLETA DE INDIVÍDUOS (ESPÉCIMES E AMOSTRAS)

Os mexilhões da espécie *Perna perna* foram coletados em cada um dos pontos com o auxílio de uma faca para cortar os fios do bisso, que fixam os animais aos substratos consolidados. Após a coleta, os indivíduos foram transportados em recipientes (20 litros) com água marinha aerada até o Centro de Estudos Costeiros, Limnológicos e Marinhos (CECLIMAR). A aeração foi controlada por um sistema de bombas de ar integradas por mangueiras em temperatura ambiente, até o momento do sacrifício. Foram seguidos os protocolos de acordo com o Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), baseado no Guia Nacional para Cuidado e Uso de Animais de Laboratórios (Conselho Nacional de Pesquisa). Os indivíduos selecionados para os experimentos tinham de 5 a 8 cm de comprimento, o que é considerado por Narchi e Galvão-Bueno (1997) como o comprimento médio para a espécie. No laboratório, as valvas dos organismos foram abertas através do corte dos músculos adutores e os tecidos do manto foram coletados e armazenados em tubos plásticos identificados, mantidos em gelo seco. Após a coleta dos tecidos, as amostras foram congeladas (-20°C) e transportadas para análise imediata ou armazenadas (-

80°C) no Centro de Estudos em Estresse Oxidativo (Laboratório 32, Departamento de Bioquímica, ICBS, UFRGS).

### 4.3 ANÁLISES BIOQUÍMICAS

Os procedimentos para realização das análises bioquímicas estão descritos nos itens a seguir.

#### 4.3.1 Preparo das amostras

As amostras teciduais foram homogeneizadas com 1 mL de solução fosfato tamponada (pH 7,4) modificada de Jena, Verlecar e Chainy (2009), composta por PBS 50 mM, 0,9% NaCl, 1 mM EDTA e 0,01% PMSF diluído em DMSO.

A homogeneização foi realizada manualmente durante 5 minutos utilizando um Homogeneizador de Tecidos (Potter-Elvehjem) com pistilo de vidro. Em seguida, as amostras foram congeladas por uma hora à -80°C e, depois de novamente descongeladas, o homogeneizado foi centrifugado por 15 minutos (10.000g, 4°C). Após a centrifugação foi salvaguardado o material sobrenadante que foi utilizado para a realização das análises bioquímicas.

#### 4.3.2 Quantificação das proteínas

Os resultados obtidos nas demais análises foram normalizados pela quantidade de proteína presente nas amostras. A quantificação das proteínas foi realizada de acordo com o método de Lowry (1951) em microplaca utilizando o kit Bio-Rad DC Protein Assay (BIO-RAD LABORATORIES). Como padrão para a quantificação das proteínas das amostras foi utilizado albumina sérica bovina (BSA).

### 4.3.3 Quantificação da LPX

O dano oxidativo em lipídeos pode ser determinado pela formação de subprodutos da liporoxidação (malondialdeído-MDA), que são substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), formadas durante a peroxidação em sistemas de membranas e microssomos. O MDA reage com o TBA gerando um produto colorido róseo determinado em espectrofotômetro (532 nm) (DRAPER; HADLEY, 1990).

### 4.3.4 Atividade da SOD

A atividade da SOD foi estimada pela inibição da auto-oxidação da adrenalina medida espectrofotometricamente (480 nm) ao longo do tempo. A adrenalina é oxidada pelo  $O_2^{\bullet-}$  para formar um produto róseo, o adrenocromo (BANNISTER; CALABRESE, 1987).

### 4.3.5 Atividade da CAT

O método utilizado para avaliar a atividade da CAT nas amostras foi o consumo peróxido de hidrogênio ao longo do tempo medido espectrofotometricamente (240nm) (AEBI, 1984).

## 4.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS RESULTADOS

A análise estatística dos dados bioquímicos sem considerar os sexos dos indivíduos foi realizado através de ANOVA de uma via com *post hoc* de “Duncan’s multiple range test” e/ou “Tukey’s honestly significant difference”. Para comparações entre os resultados obtidos para machos e fêmeas nos mesmos pontos foi realizada análise por teste-T para amostras independentes.

O teste de Levene foi utilizado para calcular a significância para calcular a significância, sendo considerados resultados significativos, aqueles que resultaram em um valor  $P < 0,05$ , e estão expressos como média  $\pm$  erro padrão médio (EPM).

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Abaixo estão descritos os resultados obtidos (Tabela 1).

Tabela 1 – Resultados obtidos para atividade da CAT, SOD e quantificação da LPX em ambas as coletas em cada um dos pontos de coleta. Os resultados estão expressos na forma de média  $\pm$  EPM

			Cidreira (p1)	Trdaí (p2)	Atlântida (p3)
<b>CAT</b> (UCAT/mg prot)	<b>Coleta 1</b> (inverno)	Média total	3,80 $\pm$ 0,36	3,08 $\pm$ 0,16	-
		Média machos	4,52 $\pm$ 0,26	4,65 $\pm$ 1,16	-
		Média fêmeas	2,67 $\pm$ 0,07	2,94 $\pm$ 0,13	-
	<b>Coleta 2</b> (verão)	Média total	-	-	-
		Média machos	-	-	-
		Média fêmeas	-	-	-
<b>SOD</b> (USOD/mg prot)	<b>Coleta 1</b> (inverno)	Média total	112,29 $\pm$ 9,22	67,54 $\pm$ 6,94	-
		Média machos	101,09 $\pm$ 12,83	75,72 $\pm$ 3,64	-
		Média fêmeas	72,25 $\pm$ 13,74	116,23 $\pm$ 16,33	-
	<b>Coleta 2</b> (verão)	Média total	25,99 $\pm$ 2,03	35,86 $\pm$ 2,72	30,12 $\pm$ 1,85
		Média machos	24,85 $\pm$ 2,93	33,21 $\pm$ 1,67	34,73 $\pm$ 2,08
		Média fêmeas	26,45 $\pm$ 2,76	41,15 $\pm$ 7,2	27,13 $\pm$ 1,01
<b>LPX</b> (nmol/ml/ug prot)	<b>Coleta 1</b> (inverno)	Média total	0,41 $\pm$ 0,04	0,25 $\pm$ 0,03	-
		Média machos	0,4 $\pm$ 0,05	0,36 $\pm$ 0,08	-
		Média fêmeas	0,18 $\pm$ 0,01	0,21 $\pm$ 0,05	-
	<b>Coleta 2</b> (verão)	Média total	0,38 $\pm$ 0,03	0,5 $\pm$ 0,07	0,48 $\pm$ 0,03
		Média machos	0,42 $\pm$ 0,06	0,61 $\pm$ 0,08	0,47 $\pm$ 0,07
		Média fêmeas	0,36 $\pm$ 0,04	0,26 $\pm$ 0,01	0,5 $\pm$ 0,03

Fonte: Autor (2014)

A análise da atividade da CAT foi realizada apenas nas amostras da primeira coleta. Como pode ser observado pelos valores obtidos, os indivíduos de Cidreira apresentaram, nesta primeira coleta, maior atividade de catalase ( $3,8 \pm 0,36$ ), quando comparado aos de Tramandaí ( $3,08 \pm 0,16$ ) ( $p < 0,022$ ). Pode se observar pela tabela também que os machos em ambos os pontos de coleta obtiveram valores significativamente maiores de atividade da catalase do que as fêmeas: em Cidreira, a média para os machos foi de  $4,52 \pm 0,26$ , e para as

fêmeas  $2,67 \pm 0,07$  ( $p < 0,036$ ). Em Tramandaí machos tiveram média de  $4,65 \pm 1,16$  e fêmeas  $2,94 \pm 0,13$  ( $p < 0,000$ ).

As análises da atividade da enzima SOD foram realizadas nos mexilhões de Tramandaí e Cidreira em ambas as coletas e os indivíduos de Atlântida apenas na segunda. Como pode se observar, na primeira coleta o ponto de maior atividade da SOD foi Cidreira ( $p < 0,036$ ), mesmo padrão observado para a enzima CAT. Porém as relações entre valores obtidos para machos e fêmeas variaram: em Cidreira os machos apresentaram maior atividade enzimática ( $p < 0,037$ ), enquanto que em Tramandaí foi o inverso, com as fêmeas apresentando maior atividade de SOD ( $p < 0,05$ ).

Ao comparar os 3 pontos amostrados na segunda coleta para este biomarcador, observa-se que Tramandaí possui o resultado mais expressivo, seguido por Atlântida ( $p < 0,047$ ). Quanto às comparações entre os sexos dos indivíduos, foi observada uma maior atividade nas fêmeas de Tramandaí, em comparação com os machos do mesmo ponto ( $p < 0,026$ ).

Quanto à sazonalidade, foram observadas diferenças entre a atividade da SOD em mexilhões de Cidreira ( $p < 0,035$ ) e Tramandaí ( $p < 0,045$ ), com o período de inverno correspondendo ao de maior atividade enzimática.

O dano oxidativo lipídico, assim como a SOD, foi analisado em ambas as coletas para Cidreira e Tramandaí, e apenas na segunda coleta para Atlântida. Para a primeira coleta o dano lipídico foi maior nos organismos amostrados em Cidreira ( $0,41 \pm 0,04$ ), do que nos de Tramandaí ( $0,25 \pm 0,03$ ) ( $p < 0,031$ ), assim como nos outros biomarcadores. Comparando os danos a lipídeos de *P. perna* machos e fêmeas, podemos observar que em ambos os pontos as fêmeas apresentaram valores menores do que os machos ( $p < 0,019$  para Cidreira e  $p < 0,05$  para Tramandaí).

Para a segunda coleta, houve diferença entre danos em machos e fêmeas para Tramandaí, onde os machos apresentaram valores elevados em comparação com as fêmeas ( $p < 0,000$ ). Quanto à variação sazonal em TBARS, foi observado um aumento dos valores médios no período do verão para Tramandaí ( $p < 0,028$ ).

Para todos os parâmetros observados nas coletas de inverno, Cidreira apresentou índices de estresse oxidativo mais elevados, quando comparados à Tramandaí. Tal resultado foi contra o que se esperava no início deste trabalho, pois como dito anteriormente, existe um potencial de pressão maior no município de Tramandaí, com maior número de habitantes do que Cidreira.

Sabe-se que a presença de poluentes xenobióticos, bem como metais pesados, aumentam a produção de ERO nos organismos e induzem o estresse oxidativo (VALAVANIDIS *et al.*, 2006; VIARENGO *et al.*, 1990). O sangradouro adjacente à plataforma de Cidreira teve suas águas analisadas por Ferri (2012), e foi observada, além de contaminação orgânica (possivelmente oriunda de esgoto doméstico da população), contaminação por chumbo, que pode colaborar com o aumento nos valores obtidos neste ponto. Porém um monitoramento mais extenso deve ser realizado a fim de verificar se esse padrão se confirma anualmente durante os períodos de Inverno.

No período do Verão observou-se uma mudança nestes padrões: enquanto que para LPX não houve variação entre os pontos, para a SOD, Tramandaí foi o ponto de maior atividade. É possível que o aumento da população pela presença de veranistas, que é mais substancial no município de Tramandaí, acarrete nesta mudança para maior nível de estresse no p2 quando comparado com os demais.

A fim de verificar a origem das discrepâncias entre os pontos amostrados, é interessante a realização de análises de qualidade da água nos pontos de coleta, bem como análise de metais nos tecidos dos organismos, dados estes que contribuirão para melhor compreensão da discussão levantada pelo estudo.

Para a atividade enzimática da SOD, a variação sazonal apresentou padrão inverso ao esperado no início do estudo: durante o inverno, onde a população, o consumo de água e a produção de esgoto são substancialmente menores nos municípios do Litoral Norte, a atividade foi superior à observada na coleta de verão, período considerado o de maior pressão nestes ambientes. Porém esta relação se inverteu nas análises de TBARS, onde os mexilhões apresentaram mais dano lipídico durante o período de verão, como esperado.

Como os resultados referentes à variação sazonal foram discrepantes, é inseguro inferir no momento a respeito dos padrões de variação das defesas, estresses e danos oxidativos ao longo do ano. Para tanto, como sugerido anteriormente, são necessárias mais coletas, a fim de consolidar os dados obtidos e averiguar se eles são de fato representativos e exibem um padrão ao longo dos anos.

Quanto à variação entre os níveis de estresse observado em cada um dos sexos, pode-se ver que os níveis dos biomarcadores de estresse oxidativo são comumente maiores em *P. perna* machos, com exceção da atividade da SOD, que foi maior em fêmeas com mais frequência.

Estudos analisando as diferenças entre parâmetros do balanço redox de organismos machos e fêmeas ainda são escassos, especialmente com organismos invertebrados. É frequente, principalmente em mamíferos, uma taxa de sobrevivência maior nas fêmeas, porém existem exceções. Ali e colaboradores (2006) analisaram parâmetros do estresse oxidativo em regiões do cérebro de camundongos C57BL6, para os quais os machos possuem longevidade superior a das fêmeas, e observaram que os parâmetros oxidativos analisados aumentavam com o envelhecimento dos animais, mas que esse aumento era mais substancial para as fêmeas. Além disso, foi observada uma maior atividade de SOD nos organismos do sexo mais longo, neste caso os machos.

Alguns experimentos realizados com ratos relatam níveis reduzidos de estresse oxidativo em indivíduos fêmeas, devido principalmente a uma maior eficiência das enzimas mitocondriais ao remover ERO nesses indivíduos, (BORRÁS, C. *et al.*, 2003; GUEVARA, R. *et al.*, 2009).

Para melhor compreender as diferenças observadas, pode ser de grande interesse analisar diferentes tecidos em *P. perna* machos e fêmeas, especialmente os ricos em mitocôndrias e os mais suscetíveis ao dano oxidativo, a fim de compreender a origem desta discrepância.



## 6 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos no presente estudos são promissores e levantam diversas questões interessantes. Observou-se variação sazonal entre os parâmetros oxidativos analisados em cada ponto, bem como variação entre os pontos no mesmo período, porém, a fim de entender como essa relação se dá, e a origem destas discrepâncias, torna-se necessária a continuação dos monitoramentos, bem como aprofundamento dos estudos.

A coleta de dados ambientais nos pontos durante o período da coleta, como temperatura da água, pH e salinidade, bem como a análise dos principais metais nos tecidos dos organismos coletados se fazem necessárias com a finalidade de discernir entre a origem do estresse oxidativo nas populações-alvo.

A continuidade no monitoramento é de grande importância para demonstrar a representatividade dos resultados obtidos nas duas coletas contempladas no presente trabalho. A proposta para coletas futuras é aumentar o número de pontos, abrangendo populações do município de Torres, bem como mexilhões incrustados nas monobóias próximas ao litoral de Tramandaí, que podem surtir resultados interessantes quanto aos níveis de estresse oxidativo. Além disso, propõe-se a utilização de um número maior de biomarcadores, como a enzima glutathione peroxidase (GPx) e carbonilação (dano oxidativo à proteínas) a fim de verificar os danos oxidativos e sua extensão nas populações amostradas de forma mais acurada.

Além disso, no caso de eventos pontuais, como vazamentos de petróleo ou mudanças atípicas na temperatura da água na costa, as respostas dos organismos estudados são importantes, no sentido de que colaboram com a avaliação da extensão do dano ambiental causado.

## REFERÊNCIAS

- AEBI, H. Catalase *in Vitro*. **Methods in Enzymology**. v. 105, p. 121-126, 1984.
- ALI, S. S. *et al.* Gender differences in free radical homeostasis during aging: shorter-lived female C57BL6 mice have increased oxidative stress. **Aging Cell**. v. 5, p. 565-574, 2006.
- ALMEIDA, E. A. *et al.* Oxidative stress in digestive gland and gill of the brown mussel (*Perna perna*) exposed to air and re-submersed. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**. v. 318, p. 21-30, 2005.
- ALMEIDA, E. A. *et al.* Oxidative stress in *Perna perna* and other bivalves as indicators of environmental stress in the Brazilian marine environment: Antioxidants, lipid peroxidation and DNA damage. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part A**. v. 146, p. 588-600, 2007.
- ALVES, S. R. C. *et al.* Effects of furadan in the brown mussel *Perna perna* and in the mangrove oyster *Crassostrea rhizophorae*. **Marine Environmental Research**. v. 54, p. 241-245, 2002.
- AMES, B. N.; SHIGENAGA, M. K.; HAGEN, T. M. Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. v.90, p. 7915–7922, 1993.
- BAINY, A. C. D. *et al.* Biochemical responses in farmed mussel *Perna perna* transplanted to contaminated sites on Santa Catarina Island, SC, Brazil. **Marine Environmental Research**. v. 50, p. 411-416, 2000
- BANNISTER, J. V.; CALABRESE, L. Assays for superoxide dismutase. **Methods of Biochemical**. v. 32, p. 279-312, 1987.
- BIO-RAD LABORATORIES. DC Protein Assay Instruction Manual. Disponível em: <[http://wolfson.huji.ac.il/purification/PDF/Protein\\_Quantification/BIORAD\\_DC\\_Instr\\_Protein\\_Assay.pdf](http://wolfson.huji.ac.il/purification/PDF/Protein_Quantification/BIORAD_DC_Instr_Protein_Assay.pdf)>. Acesso em: 7 nov. 2013

BORRÁS, C. *et al.* Mitochondria from females exhibit higher antioxidant gene expression and lower oxidative damage than males. **Free Radical Biology and Medicine**. v. 34, p. 546-552, 2003. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0891584902013564>>. Acesso em: 7 abr. 2014.

CADET, J. Oxidative damage to DNA: formation and measurement. In: PASQUIER, C. (Ed.). **Proceedings of the 11th Conference of SFRRRI**. Bolonha, Itália: Monduzzi Editore, 2002. p. 129–135.

CHAMPE, P. C.; HARVEY, R. A. **Bioquímica ilustrada**. 2.ed. Porto Alegre: Artes Médicas Sul (ARTMED), 1996, 446 p.

CHANDRAN, R. *et al.* Effect of cadmium and zinc on antioxidant enzyme activity in the gastropod *Achatina fulica*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C**. v. 140, p. 422-426, 2005.

COGO, A. J. D. *et al.* Utilização de enzimas do estresse oxidativo como biomarcadoras de impactos ambientais. **Natureza on line**. v. 7, p. 37-42, 2009. Disponível em: <<http://www.naturezaonline.com.br/>>. Acesso em: 9 mai. 2013

CONCEIÇÃO, M. B. da *et al.* Biomarcadores de Poluição. In: RESGALLA JR, C.; WEBER, L. I.; CONCEIÇÃO, M. B. da (Eds.) **O Mexilhão *Perna perna* (L.)**. Rio de Janeiro: Interciência, 2008. p. 184-206

COTELLE, S.; FERARD, J. F. Comet assay in genetic ecotoxicology: a review. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 34, p.246-255, 1999.

DAVIES, K. J. A. Oxidative stress, the paradox of aerobic life. In: RICE-EVANS, C.; HALLIWELL, B.; LAND, G. G. (Eds.). **Free Radical and Oxidative Stress: Environment, Drugs and Food Additives**. Londres: Portland Press, 1995. p. 1–31.

DE MATOS, E. A. C.; GRUBER, N. L. S. Os efeitos da atividade turística no litoral norte do Rio Grande do Sul. **Para Onde?!** 2009. Disponível em: <<http://seer.ufrgs.br/index.php/paraonde/article/view/22102/12861>>. Acesso em: 10 nov. 2013.

DRAPER, H. H.; HADLEY, M. 1990. Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. **Methods in Enzymology**. v. 186, p. 421–431, 1990.

FERNANDES, F. C. *et al.* Distribuição Mundial e o Impacto de sua Introdução no Brasil. In: RESGALLA JR, C.; WEBER, L. I.; CONCEIÇÃO, M. B. da (Eds.) **O Mexilhão *Perna perna* (L.)**. Rio de Janeiro: Interciência, 2008. p. 25-30.

FERRI, P.L.F. **Análises da qualidade da água proveniente de sangradouros localizados no município de Cidreira – Litoral Norte do Rio Grande do Sul, Brasil**. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Ciências Biológicas: ênfase em Gestão Ambiental Marinha e Costeira) – Instituto de Biociências. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Universidade Estadual do Rio Grande do Sul, Imbé/ Osório. 58 f. 2012.

FUNDAÇÃO ESTADUAL DE PROTEÇÃO AMBIENTAL (FEPAM-RS). **Bacia Hidrográfica Do Rio Tramandaí**. 2013. Disponível em: <[http://www.fepam.rs.gov.br/qualidade/bacia\\_tramandai.asp](http://www.fepam.rs.gov.br/qualidade/bacia_tramandai.asp)> Acesso em: 4 out. 2013.

GOLDBERG, E. D. 1975. The mussel watch: a first step in global marine monitoring. **Marine Pollution Bulletin**. v. 6, p. 111-132.

GUEVARA, R. *et al.* Sex-dependent differences in aged rat brain mitochondrial function and oxidative stress. **Free Radical Biology and Medicine**. v. 46, p. 169-175, 2009. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0891584908005820>>. Acesso em: 29 abr. 2014.

HALLIWELL, B. Reactive oxygen species and the central nervous system. **Journal of Neurochemistry**. v. 59, p. 1609–1623, 1992.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). **Censo Demográfico 2010**. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/censo2010/default.shtm>>. Acesso em: 12 set. 2013.

INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS (IBAMA). **Laudo Técnico Ambiental N° 01/2012/MB-IBAMA-FEPAM**. 2012. Disponível em: <[http://www.ibama.gov.br/phocadownload/noticias\\_ambientais/laudo-tecnico-monoboia-de-tramandai.pdf](http://www.ibama.gov.br/phocadownload/noticias_ambientais/laudo-tecnico-monoboia-de-tramandai.pdf)>. Acesso em: 4 out. 2013

JENA, K. B.; VERLECAR, X. N.; CHAINY, G. B. N. Application of oxidative stress indices in natural populations of *Perna viridis* as biomarker of environmental pollution. **Marine Pollution Bulletin**. v. 58, p. 107-113, 2009.

KENNEDY, V. S. Desiccation, higher temperatures and upper intertidal limits of three species of sea mussels (Mollusca: Bivalvia) in New Zealand. **Marine Biology**. v. 35, p. 127-137, 1976.

LAM, P. K. S.; GRAY, J. S. The use of biomarkers in environmental monitoring programs. **Marine Pollution Bulletin**. v. 46, p. 182-186, 2003.

LEHNINGER, A. L. **Bioquímica**: Catabolismo e a produção da energia das ligações de fosfato. Tradução da 2ª edição americana. São Paulo: Edgard Blücher, 1917. vol. 2, 433 p.

LIMA, I. *et al.* Biochemical responses of the marine mussel *Mytilus galloprovincialis* to petrochemical environmental contamination along the north-western coast of Portugal. **Chemosphere**. v. 66, p. 1230-1242, 2007.

LIVINGSTONE, D. R. Biotechnology and pollution monitoring: use of molecular biomarker in the aquatic environment. **Journal Of Chemical Technology & Biotechnology**. v. 57, p. 195-211, 1993.

LOPES, S. G. B. C; FONSECA, M. L. da. O Mexilhão *Perna perna* (Linnaeus, 1758) – Taxonomia, Morfologia e Anatomia Funcional. In: RESGALLA JR, C.; WEBER, L. I.; CONCEIÇÃO, M. B. da (Eds.) **O Mexilhão *Perna perna* (L.)**. Rio de Janeiro: Interciência, 2008. p. 1-23.

LOWRY, O. H. *et al.* Protein measurement with the Folin Phenol Reagent. **Journal of Biological Chemistry**. v.193, p. 265-275, 1951.

MARQUES, H. L. A. **Criação Comercial de Mexilhões**. 1 ed. São Paulo: Editora Nobel, 1998. 111 p.

NARCHI, W.; GALVÃO-BUENO, M. S. Anatomia funcional de *Perna perna* (Linné) (BIVALVIA, MYTILIDAE). **Revista Brasileira de Zoologia**. v.14, p. 135-168, 1997.

PEEL, M. C., FINLAYSON, B. L., MCMAHON, T. A. Updated world map of the Köppen-Geiger climate classification. **Hydrology and earth system sciences**. v. 11, p. 1633-1644, 2007.

SEMEDO, M. *et al.* Metal accumulation and oxidative stress biomarkers in octopus (*Octopus vulgaris*) from Northwest Atlantic. **Science of the Total Environment**. v. 433, p. 230-237, 2012.

SHEEHAN, D.; POWER, A. Effects of seasonality on xenobiotic and antioxidant defence mechanism of bivalve molluscs. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part C: Toxicology and Pharmacology**. v. 123, p. 193-199, 1999.

SOHAL, R. S.; MOCKETT, R. J.; ORR, W. C. Mechanisms of aging: an appraisal of the oxidative stress hypothesis. **Free Radical Biology & Medicine**. v. 33, p. 575–586, 2002.

SOUZA, R. C. C. L. **Distribuição atual e pretérita do mexilhão *Perna perna* no litoral brasileiro**: Um caso de bioinvasão. 59 p. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal Fluminense, Niterói. 2003.

STEINBERG, D. Low density lipoprotein oxidation and its pathological significance. **Journal of Biological Chemistry**. v. 272, p. 20963–20966, 1997.

STOREY, K. B. Oxidative stress: animal adaptations in nature. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. v. 29, p. 1715–1733, 1996.

TORRES, M. A.; NETO, P. C. Determinação do índice redox de Glutathione, um biomarcador de contaminação marinha em algas, utilizando HPLC acoplado a um detector eletroquímico flow-through. **Revista Analytica**. v.30, p. 96-104, 2007.

VALAVANIDIS, A. *et al.* Molecular biomarkers of oxidative stress in aquatic organisms in relation to toxic environmental pollutants. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. v.64, p. 178-189, 2006.

VERLECAR, X. N.; JENA, K. B.; CHAINY, G. B. N. Seasonal variation of oxidative biomarkers in gills and digestive gland of green-lipped mussel *Perna viridis* from Arabian Sea. **Estuarine, Coastal and Shelf Science**. v.76, p. 745-752, 2008.

VIARENGO, A. *et al.* Heavy metal effects on lipid peroxidation in the tissues of *Mytilus galloprovincialis*. **Comparative Biochemistry and Physiology**. v. 97, p. 37-42, 1990.

VIGO-PELFREY, C. (Ed.). **Membrane Lipid Oxidation**. Boca Raton: CRC Press, v. 1, 1990.

WIDDOWS, J.; DONKIN, P. 1992. Mussels and environmental contaminants: Bioaccumulation and physiological aspects. In: GOSLING, E. (Ed.). **The Mussel *Mytilus*: Ecology, Physiology, Genetics and Culture**. Amsterdã: Elsevier Science, 1992. p. 383–424.