

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE ECOLOGIA E ZOOLOGIA**

Eduardo Tadashi Estevam Yoshida

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA

Mestrado

Florianópolis, Junho de 2012.

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
DEPARTAMENTO DE ECOLOGIA E ZOOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA**

Eduardo Tadashi Estevam Yoshida

**Avaliação da influência da ingestão de lixo plástico nos indicadores
de estresse oxidativo no sangue de tartarugas verdes (*Chelonia
mydas*)**

Dissertação submetida ao Programa de Pós Graduação em Ecologia da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Grau de Mestre em Ecologia.

Orientador: Prof. Dr. Danilo Wilhelm Filho

Florianópolis
2012.

Dedico esse trabalho ao meu eterno
amigão Jahan (*in memoriam*) que
me inspirou durante curtos doze
anos e cuja ausência me causa
imensa saudades.

AGRADECIMENTOS

A minha mãe que muito mais que me educar me permitiu aprender.

A Danielle T. Lopes que cuidou de forma impecável do meu bem mais valioso.

A meu bem mais valioso, minha filha Marina que conviveu com minha ausência durante esses anos.

A meu orientador, Danilo W. Filho que aceitou o desafio de me orientar e teve a paciência de fazer inveja a muitos monges.

A todos os professores do programa de pós-graduação em ecologia da UFSC.

Ao Dr. Max R. Werneck que me apresentou ao fascinante mundo da medicina de tartarugas marinhas.

Aos Drs. Mauro e Luigi pela grande colaboração com os exames radiográficos.

A Gilberto Sales, cujo exemplo não me deixou desistir da causa ambiental.

A todos meus colegas do Laboratório de Ecofisiologia Respiratória da UFSC.

A todos colegas de turma que sempre me ajudaram prontamente quando necessitei, principalmente a Andros T. Gianuca e a “turma do fundão”, Kátia C. Capel, Letícia F. Teive (Tita) e João G. Doria (Montanha).

A Marinha do Brasil pelo auxílio às expedições a REBio do Arvoredo.

Ao Centro de Triagem de Animais Silvestres (CETAS) de Florianópolis e a Polícia Militar Ambiental de Santa Catarina.

A ong R3 Animal e todos seus voluntários.

A meus grandes amigos Rafael de Oliveira e Saulo G. Paim (*in memoriam*) cujas ajudas foram essenciais para a realização desse trabalho.

A todas as tartarugas marinhas objetos desse estudo que foram privadas, mesmo que momentaneamente, da liberdade do mar.

“A natureza tem uma estrutura feminina: não sabe se defender, mas sabe se vingar como ninguém.”

Marina Silva

RESUMO

O presente estudo analisou biomarcadores de estresse oxidativo, como as enzimas catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD), glutationa peroxidase (GPx), glutationa redutase (GR) e glutationa S-transferase (GST), níveis de glutationa reduzida (GSH), de proteínas carboniladas (PC) e de lipoperoxidação (TBARS), presentes no sangue de tartarugas verdes (*Chelonia mydas*), vítimas de ingestão de lixo plástico, bem como o peso e volume dos resíduos ingeridos. A obstrução no trato gastrointestinal decorrente promove processos de isquemia-reperfusão associados ao estresse oxidativo sistêmico. Foram amostradas 27 tartarugas, coletadas na região da Ilha de Santa Catarina, Florianópolis, SC. Após a coleta sanguínea realizada durante exame clínico, quando se observou a presença/ausência de alguns sintomas. As tartarugas foram mantidas em tanques individuais e observadas diariamente para a constatação de lixo plástico em suas fezes: os indivíduos que realizaram três evacuações consecutivas livres de lixo plástico e não apresentaram nenhum sintoma formaram o grupo controle (n=7); os indivíduos que apresentaram as mesmas condições do grupo controle, porém em que foi constatado lixo plástico em suas fezes ao menos em uma das evacuações, foram considerados do grupo 2 (n=10); os indivíduos que apresentaram ao menos um dos sintomas avaliados durante o exame clínico e também lixo plástico em ao menos uma das evacuações, foram consideradas do grupo 3 (n=10). Foi verificada a presença de lixo plástico em 74% das tartarugas amostradas e um alto índice de ingestão de resíduos foi verificado em tartarugas sem sintomas (63%). Houve uma diferença significativa, em termos estatísticos, em relação à massa e o volume de resíduos ingeridos entre os grupos 2 e 3 ($p < 0,0007$ e $p < 0,002$, respectivamente). Nos animais do grupo 2, as médias de peso e volume de lixo plástico ingeridos foram 0,8 g e 3,0 ml, respectivamente, e somente a CAT apresentou uma queda significativa na atividade ($p = 0,02$), enquanto a GR apresentou um aumento significativo ($p = 0,04$), comparadas ao grupo controle. A média de lixo plástico ingeridos pelo grupo 3 foi de 11,0 g e 19,6 ml, respectivamente para massa e volume. Não houve variação significativa em nenhum indicador nos animais deste grupo quando comparados aos controles, apenas uma tendência de aumento na concentração de TBARS, e uma tendência de aumento da PC, de acordo com o grau de comprometimento fisiológico das tartarugas. O volume de resíduos ingeridos e as atividades das enzimas GPx ($R = -0,48$) e GR ($R = -0,69$) foram significativa e negativamente correlacionados entre si. Os

resultados verificados no presente trabalho sugerem que a quantidade de resíduos ingerida pelos animais do grupo 2, onde houve um índice de sobrevivência de 100%, aparentemente a isquemia-reperfusão não foi suficiente para causar um estresse oxidativo acentuado. No grupo 3, a atividade da catalase parece ter sido suficiente detoxificar o aparente excesso de H₂O₂. Por outro lado, a alta mortalidade do grupo 3 (100%) parece estar relacionada, entre outros aspectos, com a debilidade do sistema de defesa antioxidante, decorrente do estresse oxidativo associado ao processo de isquemia-reperfusão do trato gastrointestinal. O desenvolvimento de um sistema de biomarcadores para avaliar o estado de saúde de tartarugas marinhas, pode prover importante ferramenta para a conservação dessas espécies.

Palavras-chave: Tartaruga verde, lixo plástico, isquemia-reperfusão, estresse oxidativo

ABSTRACT

The aim of this study was to analyze oxidative stress biomarkers such as the enzymes catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx), glutathione reductase (GR) e glutathione S-transferase (GST), levels of reduced glutathione (GSH), protein carbonyls (PC), lipoperoxidation (TBARS), in the blood of green turtles (*Chelonia mydas*) victims of plastic debris ingestion, as well as measuring weight and volume of such material. The consequent gastrointestinal obstruction promote an ischemia-reperfusion process associated with systemic oxidative stress, A total of 27 turtles were collected in the region of the Island of Santa Catarina, SC. After blood collection performed during clinical examination, which showed the presence/absence of some symptoms, the turtles were kept in individual tanks and were observed daily for confirmation of plastic debris in their feces: animals that underwent three consecutive evacuations free of plastic debris and that showed no symptoms formed the control group (n=7); those that exhibited similar conditions as in the control group but presented plastic debris in their feces at least in one of the evacuations, were considered group 2 (n=10); and individuals that showed at least one symptom evaluated during clinical examination and also plastic debris in at least one of the evacuations were considered in group 3 (n=10). The presence of plastic debris was detected in 74% of the turtles sampled and a high intake of residues in turtles without symptoms (63%) was also observed. The mean weight and volume of plastic debris ingested by this group were 0.8 g and 3.0 ml, respectively. There was a significant difference regarding mass and volume of waste taken between group 2 and 3 ($p<0.0007$ and $p<0.002$, respectively). The volume of waste ingested and the enzyme activities of GPx ($R=-0.48$) and GR ($R=-0.69$) were negatively correlated. In group 2, only CAT activity showed a significant decrease ($p=0.02$), while GR activity showed a significant increase ($p=0.04$), compared to controls. No statistical variation was detected for the biomarkers studied in animals from group 3 compared to controls, only a tendency of increase in TBARS and PC levels. The means of plastic debris ingested by group 3 were 11.02 g and 19.65 ml, respectively. The results found in this study suggest that the amount of waste ingested by animals in group 2, which presented a survival rate of 100%, was not enough to cause an ischemia-reperfusion of the intestine sufficient to promote a pronounced oxidative stress. The catalase activity was apparently sufficient to detoxify the excess of H_2O_2 . On the other hand, the high mortality of group 3 (100%)

seemed to be related to the failure of antioxidant defense system, because the deleterious consequences from the oxidative stress associated with the ischemia-reperfusion injury of the gastrointestinal tract. The development of biomarkers of oxidative stress to assess the health status of marine turtles may provide an important tool in the conservation of these species.

Keywords: Green sea turtle, plastic debris, ischemia-reperfusion, oxidative stress.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	13
LISTA DE TABELAS.....	14
INTRODUÇÃO	15
MATERIAIS E MÉTODOS	22
Área de estudo.....	22
Desenho amostral.....	22
Quantificação dos resíduos antrópicos.....	23
Catalase (CAT).....	24
Superóxido dismutase (SOD).....	25
Glutadiona peroxidase (GPx).....	25
Glutadiona redutase (GR).....	26
Glutadiona S-transferase (GST).....	26
Glutadiona reduzida (GSH).....	26
Proteína carbonilada (PC).....	26
Exames radiográficos.....	27
Exames necroscópicos.....	27
ANÁLISES ESTATÍSTICA	28
RESULTADOS	30
DISCUSSÃO	36
CONCLUSÕES	44
REFERÊNCIAS	46

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Geração de EROs mediada pelo mecanismo xantina oxidase. Modificado de Granger et al. (1986). 20
- Figura 2.** Mapa da ilha de Santa Catarina 23
- Figura 3.** Radiografia dorso-ventral simples, intestino obstruído por fecalomas..... 28
- Figura 4.** Radiografia dorso-ventral 2 horas após administração de contraste via oral e imediatamente após enema em um indivíduo do grupo1. 29
- Figura 5.** Gráficos das atividades das enzimas antioxidantes: SOD (U SOD.ml^{-1}); CAT ($\text{mmol.min}^{-1}.\text{ml}^{-1}$); GPx ($\mu\text{mol. min}^{-1}.\text{ml}^{-1}$); GR ($\mu\text{mol. min}^{-1}.\text{ml}^{-1}$); GST ($\mu\text{mol. min}^{-1}.\text{ml}^{-1}$) e da GSH ($\mu\text{mol.ml}^{-1}$) presentes no sangue de tartarugas verde, *Chelonia mydas*..... 33
- Figura 6.** Gráficos das substâncias que reagem com o ácido tiobarbitúrico ($\mu\text{mol TBARS.ml}^{-1}$) e das proteínas carboniladas (PC, $\text{mg proteínas.ml}^{-1}$) no sangue de tartarugas verde, *Chelonia mydas*.. ... 34
- Figura 7.** (A) Fecalomas retirado após necrópsia de um indivíduo do grupo 3. (B) Resíduos antrópicos do mesmo indivíduo da fig. 4A. 34
- Figura 8.** (A) Estômago repleto, (seta) artéria gástrica dorsal congesta (B) Lesão hemorrágica em fundo de estômago 35
- Figura 9.** Segmento do intestino grosso necrosado devido obstrução por ingestão de resíduos antrópicos, de um indivíduo do grupo 3..... 35

LISTA DE TABELAS

Tabela I. Indicadores de estresse oxidativo no sangue de tartarugas verdes 31

Tabela II. Dados do monitoramento dos animais até a realização de 3 evacuações consecutivas livres de resíduos antrópicos..... 32

INTRODUÇÃO

As tartarugas marinhas foram comuns no período Cretáceo, há 130 milhões de anos, e seus registros fósseis datam de mais de 200 milhões de anos. Todos os gêneros e espécies atuais se originaram durante o período do recente Eoceno ao Pleistoceno, entre 60 e 10 milhões de anos atrás. Juntamente com as serpentes marinhas e as iguanas, as tartarugas marinhas são os únicos répteis adaptados ao ambiente marinho que ainda sobrevivem. Exceto algumas serpentes marinhas vivíparas, suas distribuições são principalmente tropical e subtropical, e dependem da terra somente durante o período de reprodução (Márquez, 1990).

As tartarugas marinhas são répteis da ordem Testudines e subordem Cryptodira, pertencentes às famílias Dermochelyidae (*Dermochelys coriacea*) e Cheloniidae (*Chelonia mydas*, *Chelonia agassizii*, *Caretta caretta*, *Eretmochelys imbricata*, *Lepidochelys olivacea*, *Lepidochelys kempii* e *Natator depressus*) (Márquez, 1990). Das oito espécies de tartarugas marinhas que ocorrem no mundo, três tem distribuições restritas: *Natator depressus*, no nordeste da Austrália; *Lepidochelys kempi*, no Golfo do México e *Chelonia mydas agassizii*, no Pacífico Americano (Cheng & Chen, 1997). As outras cinco são circunglobais e ocorrem na costa brasileira, desovando principalmente na Praia de Comboios, Espírito Santo; Praia do Forte, Bahia; e Pirambu, Sergipe. A tartaruga *Caretta caretta* é a mais abundante, desovando no continente, enquanto a tartaruga verde desova principalmenete em ilhas (Marcovaldi & Marcovaldi, 1999). Existe alguma controvérsia quanto ao número de espécies de tartarugas marinhas, perfazendo sete ou oito espécies (Karl & Bowen 1999).

A tartaruga verde (*Chelonia mydas*) é uma espécie tropical de quelônio, bem distribuída em águas tropicais e subtropicais próximas aos continentes e ao redor de ilhas, sendo rara em águas temperadas. Sua distribuição é limitada pela temperatura da água, ficando nos limites de 20°C de isotermy. Essa espécie é tipicamente solitária, mas ocasionalmente forma agregações em águas rasas que possuam abundância de algas ou gramas marinhas (Márquez, 1990). O litoral do estado de Santa Catarina é uma área de alimentação para tartarugas marinhas, mas não há registros de desovas regulares, embora um número muito pequeno de desovas ocasionais (por *Caretta caretta* e *Dermochelys coriacea*) já foi observado na região (Soto & Beheregaray, 1997; Santos & Soto 2005).

Nas últimas décadas o crescimento da população humana foi acompanhado de um rápido desenvolvimento industrial e do surgimento de novos materiais e produtos. As zonas costeiras foram extensivamente ocupadas, de forma desordenada, e como consequência, tem sido observado um aumento da contaminação dos ambientes marinho e costeiro. A contaminação destes ambientes pode resultar em efeitos deletérios para os recursos vivos e não vivos, caracterizando a poluição marinha (Kennish, 1997). Uma das consequências dessa prática é o contato de animais marinhos com tais contaminantes e frequentemente causando sua ingestão (Lutz, 1990).

Existem diferentes formas de poluição que constituem uma ameaça para os habitats marinhos e terrestres das tartarugas marinhas que incluem poluição sonora, térmica, fótica, plásticos, produtos químicos, efluentes e outros (Hamann *et al.*, 2010), sendo aquela por plástico a maior ameaça para a vida marinha (Derraik, 2002). Algumas pesquisas já vêm demonstrando o efeito potencial dos poluentes sobre as tartarugas marinhas (Hutchinson & Simmonds, 1992), em especial os resíduos sólidos (Mrosovsky *et al.*, 2009), artes de pesca descartadas (Monagas *et al.*, 2008), metais pesados (Garcia-Fernández *et al.*, 2009), pesticidas organoclorados (Ikonomopoulou *et al.*, 2011) e hidrocarbonetos (Chan *et al.*, 1988). Devido a isso, as tartarugas marinhas sofrem ameaças em todos os estágios de vida, tanto nas praias onde desovam quanto nos mares. As tartarugas jovens pelágicas estão constantemente expostas aos resíduos sólidos nas zonas de convergências e muitas espécies estão expostas em habitats costeiros onde se alimentam (Bjorndal, 1997).

Os efeitos do lixo na água e nas praias são mais diretos. As tartarugas ingerem plásticos e outros resíduos e ficam presas em redes e outros materiais descartados por navios pesqueiros. A ingestão de plásticos pode causar obstrução do trato gastrointestinal (TGI), reduzir a absorção de nutrientes (Guebert, 2008) e aumentar a absorção de várias substâncias químicas presentes nos plásticos e em outros resíduos (Ryan *et al.*, 1988).

Claramente, se a quantidade de material ingerido for suficiente para causar uma completa obstrução no TGI causará a morte do animal. Em vertebrados domésticos, um bloqueio parcial persistente do intestino pode interferir na função gástrica (Fraser, 1986). Em tartarugas marinhas a cobertura da parede do estômago por plástico poderia causar uma redução na eficiência da digestão química e física, e nos intestinos pode causar uma redução da absorção, assim como dano mecânico à

mucosa do trato gastrointestinal. A ingestão subletal, portanto, onde a completa obstrução do intestino não ocorre, pode ser bastante comum e afetar negativamente o comportamento, crescimento, reprodução e a homeostasia fisiológica geral e levar a outras situações potencialmente letais.

Bugoni *et al.* (2001) verificaram a ingestão de resíduos antrópicos em 60,5% das tartarugas verdes analisadas em um estudo realizado no litoral do Rio Grande do Sul. Em estudos realizados na mesma região (Barros *et al.*, 2007; Tourinho *et al.*, 2008) verificaram a ingestão de resíduos antrópicos em 100% das tartarugas verdes analisadas. Durante 2009, foi constatada a ingestão de resíduos antrópicos em 97,5% das tartarugas verdes necropsiadas encontradas na região da ilha de Santa Catarina (Yoshida *et al.*, dados ainda não publicados). Em um estudo realizado por Guebert (2008) no litoral norte do Paraná, observou-se a ingestão de resíduos antrópicos em 69,7% das tartarugas verdes. Todos referidos estudos foram realizados com tartarugas mortas.

No oceano Pacífico 86% do total de resíduos antrópicos é composto por plásticos (Dahlberg & Day, 1985). Similarmente no Mar Mediterrâneo, o lixo plástico é responsável por 60-70% do total de resíduos antrópicos (Morris, 1981).

Desde os anos 1970, as disciplinas ecológicas se expandiram não apenas em mais âmbitos funcionais, mas também para incluir muitas outras técnicas (Porter *et al.*, 1973). Vários desses avanços modernos são vitais não apenas para a pesquisa básica, mas para a ciência aplicada. Entre as mais novas dessas recentes áreas está a "ecologia do estresse oxidativo".

O termo estresse oxidativo refere-se ao desbalanço entre a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e as defesas antioxidantes nos organismos (Sies, 1985). EROs são moléculas derivadas do metabolismo do oxigênio com fortes propriedades oxidativas, as quais tem potencial de dano para proteínas, lipídios e ácidos nucleicos (Martinez-Cayuela, 1998; Gil-Del-Valle *et al.*, 1999), causando dano molecular, celular e tecidual e, como consequência, disfunção metabólica e morte celular (Halliwell & Gutteridge, 2006). Estão incluídos nas EROs o radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxila ($\bullet OH$). Organismos aeróbicos tem um sistema de defesa antioxidante responsável pela prevenção, neutralização ou reparação dos danos induzidos por EROs (Gil-Del-Valle *et al.*, 1999).

As tartarugas marinhas passam apenas de 3 a 6% do tempo na superfície (Lutcavage & Lutz, 1997), e há relatos de submersão de mais de 7 horas durante o inverno (Hochscheid *et al.*, 2005), ou possivelmente mais (Felger *et al.*, 1976; Ogren & McVea, 1995), embora a maioria dos mergulhos seja mais curta e os animais permaneçam em condição aeróbica (Southwood *et al.*, 1999). Portanto, como outros répteis tolerantes à hipóxia, as tartarugas marinhas devem lidar com uma geração de maior quantidade de EROs como consequência da isquemia-reperusão associada aos mergulhos (Storey, 1996; Willmore & Storey, 1997a,b; Wilhelm Filho *et al.*, 2000, Zenteno-Savín, 2002; Storey, 2006; Vázquez-Medina *et al.*, 2006). A fim de combater esse aumento na geração EROs, os animais dependem das suas defesas antioxidantes constitutivas. A manutenção de elevados níveis constitutivos das atividades das defesas antioxidantes é uma estratégia utilizada por espécies propensas ao estresse oxidativo (Joanisse & Storey, 1996; Willmore & Storey, 1997a,b).

As enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutadiona peroxidase (GPx), glutadiona redutase (GR), e glutadiona S-transferase (GST), são alguns dos antioxidantes enzimáticos mais importantes (Halliwell & Gutteridge, 2006). Indicadores de estresse oxidativo como a peroxidação de lipídios, perda da integridade do DNA e a atividade das enzimas antioxidantes, têm sido usados como biomarcadores da exposição a contaminantes em uma variedade de espécies (Wilhelm Filho *et al.*, 2000). Há poucos estudos de estresse oxidativo em répteis (Hermes-Lima & Storey, 1993; Willmore & Storey, 1997a,b), e o conhecimento básico sobre estresse oxidativo em tartarugas marinhas é ainda escasso.

Fatores como contaminantes, radiação UV (Beckman & Ames, 1997a,b), xenobióticos (Martinez-Cayuela, 1998) e isquemia – reperusão (Storey, 1996; Willmore & Storey, 1997a,b; Gil-Del-Valle *et al.*, 1999; Zenteno-Savín, 2002), podem induzir uma produção excessiva de EROs, e os antioxidantes existentes serem incapazes de reagir a seus efeitos deletérios, resultando em estresse oxidativo (Sies, 1985).

No intestino, há indícios que as EROs desempenham um importante papel no dano endotelial e epitelial associado com certos modelos de isquemia\hipóxia (ausência\diminuição de fluxo sanguíneo vascular), seguida de reperusão (retorno do fluxo). Se o período de isquemia ou hipóxia é insuficientemente longo para causar um dano irreversível ao tecido, a reperusão sanguínea do tecido e a reintrodução de O₂ e nutrientes podem sanar tal dano. Entretanto, Granger *et al.*

(1986), mostraram que a reintrodução de O_2 em tecidos isquêmicos ou hipóxicos poderia causar um dano adicional ao tecido, que é, em grande parte, mediada por EROs.

O mecanismo para a produção de superóxido nessa condição difere daquelas descritas para outros estados patológicos (ex. toxicidade do oxigênio e inflamação mediada por neutrófilos). Esse mecanismo envolve a reação da xantina oxidase, hipoxantina, e oxigênio molecular para produzir um aumento de EROs com a reperfusão sanguínea do tecido isquêmico (Fig. 1).

A Xantina Oxidase (XO) é uma enzima altamente versátil que participa de forma importante no catabolismo das purinas. O intestino é a mais rica fonte inicial de radicais livres que podem causar dano tecidual adicional (Parks *et al.*, 1983). Em mamíferos a Xantina desidrogenase (XDH) pode ser convertida em XO, tanto reversivelmente quanto irreversivelmente (Meneshian & Bulkley, 2002). Durante o período isquêmico, o ATP celular é catabolizado para produzir hipoxantina (Younes *et al.*, 1984). O estresse hipóxico também promove a conversão de XDH em XO produzindo radicais de oxigênio. A depleção de ATP resulta na perda da regulação do canal ATP-íon dependente, causando a passagem passiva de íons através das membranas celular: K^+ e Mg^{2+} difundem para fora, porém Na^+ , Ca^{2+} e H_2O difundem para dentro, causando o inchamento da célula. O aumento do Ca^{2+} é danoso, uma de suas consequências importantes é a ativação da protease cálcio-dependente, a qual cliva a XDH em XO.

Durante a reperfusão, oxigênio molecular é reintroduzido nos tecidos, onde reage com a Hipoxantina e a XO para produzir um aumento acentuado de EROs (Harrison, 2002) (Figura 1). Sob condições fisiológicas normais, os efeitos nocivos do $O_2^{\bullet-}$ são prevenidos pela SOD, a qual converte o $O_2^{\bullet-}$ em H_2O_2 (Harrison, 2002). Entretanto, durante a reperfusão dos tecidos isquêmicos, essas defesas naturais podem ser ultrapassadas. O $O_2^{\bullet-}$ por si só é um radical relativamente pouco reativo, porém ele é responsável pela produção do radical hidroxila ($\bullet OH$), altamente reativo e nocivo, através da reação de Haber-Weiss (Halliwell & Gutteridge, 2006). Tipicamente, o $\bullet OH$ causa danos biológicos através da reação conhecida como peroxidação lipídica, onde o $\bullet OH$ ataca os ácidos graxos das membranas fosfolipídicas causando o rompimento da organela e ou da célula (Halliwell & Gutteridge, 2006). Os dados disponíveis sugerem que as EROs parecem ser um mecanismo fundamental para a lesão tecidual na patogênese de várias desordens do sistema digestivo (Parks *et al.*, 1983).

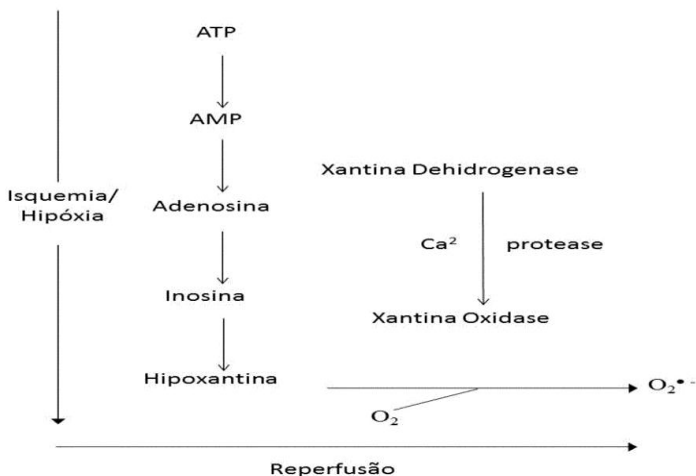


Figura 1. Geração de EROs mediada pelo mecanismo xantina oxidase. Modificado de Granger et al. (1986).

A primeira evidência sustentando o mecanismo demonstrado na Fig.1 surgiu de estudos sobre o intestino. A oclusão parcial de uma artéria que irriga um segmento do intestino delgado de um gato (hipóxia), seguido da reperfusão, causa danos histológicos graves ao tecido e aumenta a permeabilidade vascular do intestino. A administração intravenosa de SOD, ou a administração oral de alopurinol (um inibidor da xantina oxidase) aos animais antes da desobstrução arterial, diminui o dano. A infusão de uma mistura de hipoxantina e xantina oxidase na artéria que irriga um segmento do intestino de um gato normal aumenta a permeabilidade vascular, um efeito que era diminuído pela presença de SOD ou dimetilsulfóxido (DMSO) na infusão. O efeito do DMSO, um poderoso inibidor de $\cdot\text{OH}$, sugere a participação deste radical no dano (Halliwell & Gutteridge, 2006).

Os efeitos de contaminantes ocorrem em diferentes níveis da organização biológica (Stegeman *et al.*, 1992). As respostas bioquímicas são a primeira linha de defesa das células expostas a compostos tóxicos. A interação do composto tóxico com alvos moleculares gera uma reação bioquímica em cascata na tentativa de livrar a célula da toxina ou para defendê-la dos efeitos adversos. Estas respostas podem eventualmente se iniciar com uma resposta fisiológica sistêmica nos organismos e,

finalmente se estender para níveis populacionais e ecossistema (Stegeman *et al.*, 1992; Schlenk & Di Giulio, 2002).

O desenvolvimento de um sistema de biomarcadores para avaliar o estado de saúde de tartarugas marinhas, especialmente um que pudesse detectar precocemente a exposição a contaminantes e outros estressores ambientais, proveria uma importante ferramenta na conservação dessas espécies. A inclusão de indicadores de estresse oxidativo como parte de tal sistema de biomarcadores já foi previamente sugerida, e contribuiu para a distinção entre diferentes tipos de estressores (Downs *et al.*, 2001). Esse sistema de biomarcadores poderia ser usado como uma referência em áreas onde doenças e poluição têm sido implicadas como uma ameaça para as populações de tartarugas marinhas (Aguirre & Lutz, 2004).

O presente estudo pretende analisar os biomarcadores de estresse oxidativo presentes no sangue de tartarugas verdes vítimas de ingestão de lixo plástico, as consequências do processo de isquemia-reperusão associadas ao estresse oxidativo sistêmico consequente da obstrução do trato gastrointestinal. Neste sentido, espera-se entender melhor os efeitos da ingestão subletal de resíduos antrópicos e desenvolver informações de referência sobre estresse oxidativo em tartarugas verdes (*Chelonia mydas*) na região litorânea de Santa Catarina.

MATERIAIS E MÉTODOS

Área de estudo

O estudo foi desenvolvido na Ilha de Santa Catarina, situada entre as latitudes 27°22' e 27°50' S (Fig. 2), com área de aproximadamente 423 km², 172 km de perímetro, tendo direção geral NE-SW. Na Ilha distinguem-se três ambientes de planície costeira de acordo com o nível de energia ambiental a que estão sujeitos: 1) Setor leste, submetido à atuação de ondas e ventos de alta energia provenientes do quadrante sul, onde os maciços rochosos e as áreas de sedimentação quaternária configuram uma alternância de costões e praias; 2) Setor oeste, que compreende as águas protegidas das baías de pequena profundidade, formando um ambiente estuarino com manguezais; e 3) Setor norte, com nível energético intermediário, atingido pelos ventos e ondulações do quadrante norte e protegido dos ventos do Sul pelas elevações da dorsal central.

A ocupação humana na Ilha é relativamente recente, com os vestígios mais remotos de ameríndios apontando para menos de 5000 anos, seguidos pelos Itararés e, a partir do século XIV, pelos Carijós, que migrariam anos mais tarde, tendo praticamente abandonado a Ilha por volta do ano 1.600 d.C. A partir do século XVIII ocorreu a ocupação mais efetiva da Ilha de Santa Catarina com a imigração de casais oriundos do Arquipélago dos Açores. Depois vieram os alemães, italianos, gregos, sírios e libaneses. Entre 1960 e 1991 Florianópolis teve um crescimento vertiginoso, com sua população crescendo 161% (de 97.800 para 254.941 habitantes) (CECCA, 1997).

Desenho amostral

Foram amostradas, no total, 27 tartarugas da espécie *Chelonia mydas* de várias procedências: encalhadas, capturadas por diferentes tipos de pesca e através de mergulhos. As tartarugas permaneceram em tanques individuais, foram alimentadas *ad libitum* com alga (*Pterocladia sp.*), e foram observadas diariamente para a constatação de resíduos antrópicos em suas fezes, os indivíduos que realizaram três evacuações consecutivas livres de resíduos antrópicos e após exame clínico realizado por um médico veterinário, apresentaram boa condição corpórea (segundo Thompson *et al.*, 2009), natação normal, presença dos reflexos: palpebral, cloacal e de retração do pescoço, e ausência de

lesões e tumores foram consideradas saudáveis e formaram o grupo 1, (controle, n=7). Os indivíduos que apresentaram as mesmas condições do grupo 1, porém, que foi constatado resíduos antrópicos em suas fezes ao menos em uma das evacuações foram considerados do grupo 2 (n=10), e os indivíduos que apresentaram ao menos um dos sintomas avaliados durante o exame clínico e também resíduos antrópicos em ao menos uma das evacuações foram consideradas do grupo 3 (n=10).

O número reduzido de amostras dos grupos 1 e 3 (n=4 e n=5, respectivamente) na análise da CAT, dos grupos 1 e 3 (n=6 e n=9, respectivamente) na análise de TBARS e dos grupos 1, 2 e 3 (n=2, n=9 e n=1, respectivamente) na análise das proteínas carboniladas, ocorreu devido a problemas logísticos.

Foram considerados, para efeito comparativo, dois exemplares assintomáticos, aparentemente sem ingestão de lixo antrópico (pois não foi possível examinar suas evacuações devido à captura, rápida obtenção de amostra de sangue e mensurações biométricas seguida da soltura) de *C. mydas* coletados em cruzeiro do IBAMA, realizado no ano de 2005 (Wilhelm Filho *et al.*, dados não publicados).

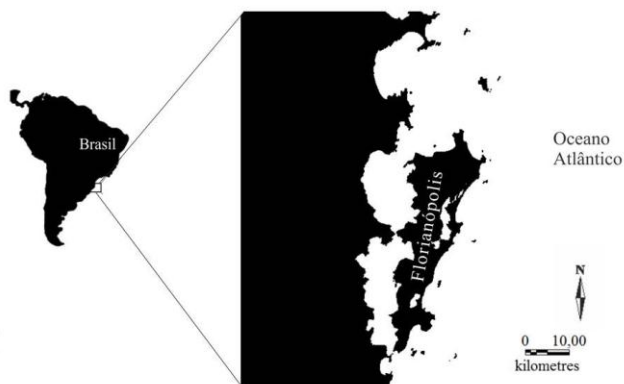


Figura 2. Mapa da ilha de Santa Catarina

Quantificação dos resíduos antrópicos

Todo resíduo antrópico foi pesado, utilizando-se uma balança de precisão de 10^{-4} g e o volume foi medido através do deslocamento de água marinha em provetas de 5, 20, 100 e 250 ml.

Coleta sanguínea

A coleta sanguínea foi feita pela veia jugular externa, através do seio venoso para-occipital (Owens & Ruiz, 1980), no momento do exame clínico. Foi coletado de cada indivíduo 2 a 3 ml de sangue em seringa heparinizada, e logo em seguida, alíquotas de sangue foram precipitadas em ácido tricloroacético (TCA) 12% (1:4, v:v) e armazenadas em nitrogênio líquido (-170°C), até a realização da análise de GSH.

A separação dos eritrócitos e plasma, os quais foram utilizados para os ensaios dos marcadores de estresse oxidativo/defesas antioxidantes, foi realizada através de centrifugação rápida (~5000 g durante 3 minutos) do sangue total (1 a 2 ml), para a obtenção da fração plasmática e eritrócitos. As amostras foram separadas em alíquotas, porção celular e o plasma, que foram armazenados à -170°C (nitrogênio líquido) para posterior análise. Foram observados os cuidados técnicos de coleta e conservação do material biológico até a análise laboratorial final.

Espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)

Foi utilizado o método espectrofotométrico para a avaliação da peroxidação lipídica endógena, realizada em triplicata, através da detecção em A_{535} dos derivados de seus produtos de oxidação, através de substâncias que reagem com o ácido tiobarbitúrico (TBARS), destacando-se o malondialdeído (MDA), produzindo um composto rosa, estável durante algumas horas (Bird & Draper, 1984).

As frações do plasma foram precipitadas com ácido tricloroacético (TCA) a 12% e agitadas vigorosamente. Em seguida, incubadas em tampão Tris-HCl 60 Mm pH 7,4 (0,1 mM DPTA) e ácido tiobarbitúrico (TBA) a 0,73% durante 60 minutos a 100°C, em banho-maria. Após, o material foi resfriado durante 30 minutos a 5°C e centrifugado (5 minutos a 5000 g), e a absorbância do cromóforo de cor rósea medida em 535 nm, contra o branco, sendo os valores expressos em nmol TBARS ml⁻¹.

Catalase (CAT)

A atividade da CAT foi analisada segundo Aebi (1984), método que se baseia na velocidade de degradação do peróxido de hidrogênio

solução de 10 mM em tampão fosfato 50 mM pH 7,0 preparada no dia da análise em 240 nm, durante 30 segundos. Todas as amostras foram analisadas em duplicata e os valores expressos em $\text{mmol min}^{-1} \text{ml}^{-1}$.

Superóxido dismutase (SOD)

A atividade da SOD foi analisada em duplicata em 480 nm, de acordo com o método de Misra e Fridovich (1971), mediante a oxidação da adrenalina 60 mM (mudança de pH 2,0 para pH 10,2) que produz o ânion superóxido e um cromóforo róseo, o adenocromo. As amostras foram tratadas por uma mistura de clorofórmio:etanol (3:5 v:v), para retirar a hemoglobina presente e impedir a geração e interferência do ânion superóxido artefactual no ensaio. A velocidade inicial de formação do adenocromo foi monitorada durante cerca de 100 segundos do início da reação, com acréscimo de absorvância a cada intervalo de 15 segundos em torno de 0,013 – 0,015 unidades para então adicionar a alíquota da amostra. O tempo total de monitoramento da reação foi de 3 minutos. Curvas de 4 ou 5 pontos permitiram avaliar indiretamente a atividade enzimática da SOD. Os valores da SOD foram expressos em termos de atividade relativa da enzima (U SOD ml^{-1}), sendo que uma unidade arbitrária de SOD é definida como a quantidade de SOD necessária para diminuir à metade a velocidade de formação do adenocromo (Misra & Fridovich, 1971).

Glutadiona peroxidase (GPx)

Para a determinação da atividade desta enzima foi utilizado o método de Flohé e Gunzler (1984) usando 10 μl de amostra e 10 μl de tert-butilhidroperóxido (t-BuOOH) colocados em 1 ml de meio de reação, que continha 25 ml de tampão fosfato 0,1 M pH 7,0, 8,6 mg de NADPH, 10 ml de DPTA (ácido dietilenotriaminopentacético) 5mM pH 7,0, 15 ml de água destilada, 24 mg de GSH, e 5 U de GR, colocada momentos antes do ensaio. O método baseia-se em dismutar o t-BuOOH pela oxidação da GSH e formação de GSSG, catalisada pela GPx, onde a oxidação do NADPH é medida em 340 nm. Todas as amostras foram analisadas em duplicata e os valores foram expressos em $\mu\text{mol min}^{-1} \text{ml}^{-1}$ (Flohé & Gunzler, 1984).

Glutadiona redutase (GR)

O método utilizado para a determinação da GR foi o de Calberg e Mannervick (1985), que verifica em 340 nm durante 30 segundos, a taxa de oxidação do NAPH devido à formação de glutadiona reduzida, a partir da glutadiona oxidada, pela ação da GR, em meio de reação contendo tampão fosfato 0,1 M pH 7,0; 8,6 mg de NADPH; 30,6 mg de glutadiona oxidada e DPTA 5 mM. Todas as amostras foram analisadas em duplicata e os valores da atividade desta enzima foram expressos em $\mu\text{mol min}^{-1} \text{ml}^{-1}$.

Glutadiona S-transferase (GST)

A atividade da GST foi analisada em duplicata e medida em 340 nm, de acordo com Habig *et al.* (1974), onde 10 μl da amostra era adicionada a um meio contendo 10 μl de 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno 0,1 M (CDNB), 10 μl de GSH 0,1 M e 970 μl de tampão fosfato 0,1 M pH 7,0, sendo que na cubeta de referência utilizou-se 980 μl de tampão fosfato 0,1 M pH 7,0. Este ensaio tem como princípio o uso de 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) como substrato para que a enzima GST, presente na amostra, conjugue a GSH ao CDNB e forme a substância detectável em 340 nm, esta atividade foi monitorada durante 60 segundos, sendo os valores expressos em $\mu\text{mol min}^{-1} \text{ml}^{-1}$.

Glutadiona reduzida (GSH)

Foi utilizado o método de Beutler (1975), onde se avaliou a concentração eritrocitária de pequenos tióis em precipitado ácido (TCA 12%, 1:4, v:v). A adição de 0,2 ml de ácido 2-nitrobenzóico 2,5 mM (DTNB) nas cubetas contendo 1,9 ml de tampão Tris-HCl 0,2M pH 8,0 e 0,1 ml da amostra, permitiu, após cerca de 3 minutos e agitação da cubeta, a obtenção máxima de formação do ânion tiolato (TNB) de cor amarela, mensurável em 412 nm. As amostras foram analisadas em duplicata e os valores foram expressos em $\mu\text{mol ml}^{-1}$.

Proteína carbonilada (PC)

O dano oxidativo por carbonilação foi determinado adicionando-se 100 μl do plasma em 600 μl de DPNH (2,4-dinitro fenil hidrazina). Incubou-se por 1 hora à temperatura ambiente no escuro,

com agitação a cada 10 minutos. Adicionou-se 600 µl de TCA 20%, agitou-se em agitador de tubos, manteve-se em banho de gelo por 10 minutos e em seguida centrifugou-se por 5 minutos a 11000g. Descartou-se o sobrenadante e o pellet foi ressuspendido em 200 µl de água destilada, em seguida adicionou-se 800 µl de etanol-acetado de etila (1:1, V:V), com agitação seguinte e centrifugação por 5 minutos a 14000g, procedimento que foi repetido por 3 vezes, utilizando o pellet. Ao final, o excesso de etanol-acetato de etila foi retirado com auxílio de uma haste flexível (cotonete), adicionou-se 600 µl de guanidina, manteve-se em banho maria a 37°C por 1 hora sob agitação contínua, centrifugou-se por 5 minutos a 14000 g e procedeu-se a leitura a 360 nm. A concentração de proteínas totais foi determinada segundo o método colorimétrico-Biureto, onde as ligações peptídicas das proteínas (-HN-CO-) reagem com íons cúpricos em meio alcalino (Reagente do Biureto) formando um complexo de coloração violeta, cuja absorbância medida em 545 nm é diretamente proporcional à concentração de proteínas na amostra.

Exames radiográficos

Para a caracterização da obstrução do trato gastro entérico das tartarugas foi realizado um exame radiográfico simples de um indivíduo obstruído (Fig. 3) e outro exame contrastado sequencial, com base em Di Bello *et al.* (2006) de um indivíduo sadio (não obstruído, Fig. 4).

Exames necroscópicos

Todos os indivíduos que foram a óbitos foram submetidos a exames necroscópicos com base em Wineken (2001) para a verificação da presença de resíduos antrópicos no trato gastrointestinal e caracterização macroscópica das lesões.

ANÁLISES ESTATÍSTICA

Previamente às análises estatísticas, foi avaliada a normalidade dos dados através do teste de Shapiro-Wilk. Para determinar se houve diferença na produção de indicadores de estresse oxidativo entre os grupos, foi realizada a análise de variância (ANOVA) de uma via e Kruskal-Walis para dados paramétricos e não paramétricos respectivamente, seguido do teste *a posteriori t* de Student. Foi utilizado coeficiente de correlação de Pearson para avaliar a correlação entre o volume do material antrópico e a atividade dos indicadores de estresse oxidativo.



Figura 3. Radiografia dorso-ventral simples, de um indivíduo obstruído por fecalomas. (Seta) pedaço de plástico em alça intestinal.

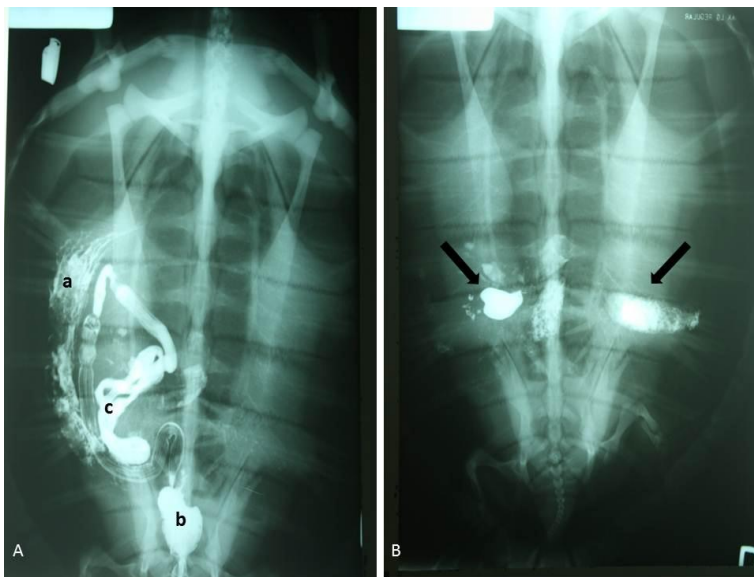


Figura 4. Radiografia dorso-ventral 2 horas após administração de contraste via oral e imediatamente após enema em um indivíduo do grupo I, (a) estômago, (b) bexiga urinária e (c) intestino grosso. (B) radiografia dorso-ventral do mesmo indivíduo da Fig. 4A, 24 horas após administração do contraste. Contraste residual em cólon transverso (setas).

RESULTADOS

De 2010 a 2012, um total de 27 amostras de sangue de tartarugas verdes foi coletado para esse estudo, porém apenas 7 delas formaram o grupo controle, animais que, após exame clínico realizado por um médico veterinário, foram consideradas sadias e não defecaram material inorgânico nas 3 primeiras evacuações. As tartarugas tiveram uma média de $38,7 \pm 4,99$ cm (31,5-51,0 cm) de comprimento curvilíneo do casco (CCC) consideradas jovens de acordo com Aguirre & Balazs (2000).

As médias aritméticas, erros-padrão, intervalos de referência (I.R.) dos indicadores de estresse oxidativo medidos no sangue das tartarugas verdes estão apresentados na Tabela 1. As atividades das enzimas superóxido dismutase (SOD) e glutathione-S-transferase (GST) não mostraram diferenças estatísticas entre os tratamentos. Na avaliação da atividade da enzima catalase, o grupo 2, animais sem sintomas e que apresentaram resíduos antrópicos em ao menos uma evacuação, apresentou uma diminuição estatisticamente significativa comparado com os grupos 1 (controle) e 3, animais com sintomas e que apresentaram resíduos antrópicos em ao menos uma evacuação, ($p=0,02$ e $p=0,04$, respectivamente). Na avaliação da enzima glutathione peroxidase (GPx) houve diferença estatisticamente significativa somente entre o grupo 2 e o grupo 3 ($p=0,002$). A atividade da enzima glutathione reductase do grupo 2 apresentou um aumento quando comparado com o grupo 1 e o grupo 3 ($p=0,04$ e $p=0,008$). O resultado da glutathione reduzida (GSH) mostrou uma queda gradual de seus níveis do grupo 1 ao grupo 3, apesar de não apresentar diferença estatística. Os gráficos das atividades das enzimas antioxidantes e o da glutathione reduzida (GSH) estão apresentados na figura 5. O indicador de peroxidação lipídica (TBARS) não mostrou diferença entre os tratamentos ($P=0,35$) e na análise das proteínas carboniladas, indicadores de dano oxidativo às proteínas, foi verificada apenas uma tendência de aumento de acordo com o grau de comprometimento das tartarugas (Fig. 6), pois não foi possível realizar análise estatística devido ao número reduzido de amostras.

Tabela 1. Indicadores de estresse oxidativo: SOD, superóxido dismutase (U SOD.ml-1); GST, glutatona S-transferase (µmol.min-1.ml-1); GPx, glutatona peroxidase (µmol.min-1.ml-1); GR, glutatona redutase (µmol.min-1.ml-1); CAT, catalase (mmol.min-1.ml-1); GSH, glutatona reduzida (µmol GSH.ml-1); TBARS = peroxidação lipídica (µmol TBARS.ml-1) e PC, proteína carbonilada (mg ml-1) no sangue de tartarugas verdes.

Indicadores de E.O.	G1			G2			G3					
	Média	E.P	I.R.	N	Média	E.P	I.R.	N	Média	E.P	I.R.	N
SOD	95,95	22,99	39,13-208,33	7	74,66	7,56	36,65-104,55	10	88,59	11,29	27,83-138,89	10
CAT	5,93a	1,19	4,15-9,50	4	3,66a	0,35	2,18-5,40	10	5,91	1,27	2,53-8,81	5
GPx	3,22	0,4	1,12-4,21	7	3,52b	0,16	2,72-4,17	10	2,32b	0,31	1,20-3,74	10
GR	0,30c	0,08	0,05-0,67	7	0,65c,d	0,12	0,23-1,45	10	0,24d	0,07	0,03-0,54	10
GST	105,15	24,9	61,17-243,25	7	78,39	5,73	41,26-101,05	10	78,15	18,48	21,61-166,27	10
GSH	1,18	0,12	0,55-1,61	7	0,97	0,16	0,52-2,18	10	0,89	0,19	0,14-2,15	10
TBARS	35,32	6,84	10,19-72,52	6	35,83	6,45	11,36-68,60	10	49,2	9,11	20,18-76,44	9
PC	11,7	1,61	10,17-13,38	2	12,36	0,99	8,82-19,00	9	17,62	-	-	1

Abreviações: E.P, erro padrão; I.R., intervalo de referência. Letras sobrescritas: diferença estatisticamente significante entre grupos (a) p=0,03, (b) p=0,002, (c) p=0,04 e (d) p=0,008

Somente a glutatona reduzida ($R=-0,69$ e $p=0,0008$) e a glutatona peroxidase ($R=-0,48$ e $p=0,033$) apresentaram uma correlação significativa com o volume de lixo.

O intervalo médio entre evacuações dos indivíduos do grupo 1 foi de 1,7 dias, do grupo 2 foi de 2,66 dias e do grupo 3 somente um animal defecou, com um intervalo entre as evacuações de 2,73 dias. A taxa de sobrevivência do grupo 1 e 2 foi de 100%, enquanto o grupo 3 teve uma taxa de mortalidade de 100%. A média da massa de material antrópico no grupo 2 foi de 0,8 g, variando de 0,04 a 2,2 g e a média do volume foi de 11,02 ml, variando de 2,2 a 34,8 ml, enquanto a média da massa de material antrópico do grupo 3 foi de 3,0 g, variando de 0,2 a 7,0 g e a média do volume obtido foi de 19,65 ml, variando de 5,0 a 60,0 ml (Tabela 2). Durante o exame necroscópico, foi constatado a presença de fecalomas (Fig. 7), vasos congestos (Fig.8) e presença de lesões gástricas hemorrágicas (Fig.8B) em todos os casos.

Tabela II. Dados do monitoramento dos animais até a realização de 3 evacuações consecutivas livres de resíduos antrópicos.

Grupos	G1	G2	G3
\bar{X} de evacuações	3,0	10,37	9,0*
Intervalo médio entre evacuações (dias)	1,70	2,66	2,73
Sobrevivência (%)	100	100	0
Mortalidade (%)	0	0	100
\bar{X} de lixo (g) / min-máx	0	0,8 ^a / 0,04 - 2,2	11,02 ^a / 2,2 - 34,8
\bar{X} de lixo (ml) / min-máx	0	3,0 ^b / 0,2 - 7,0	19,65 ^b / 5,0 - 60
N	7	10	10

\bar{X} , média aritmética, (*) dados referentes a somente um indivíduo. Letra sobrescrita: (a) $p=0,004$, (b) $p=0,007$.

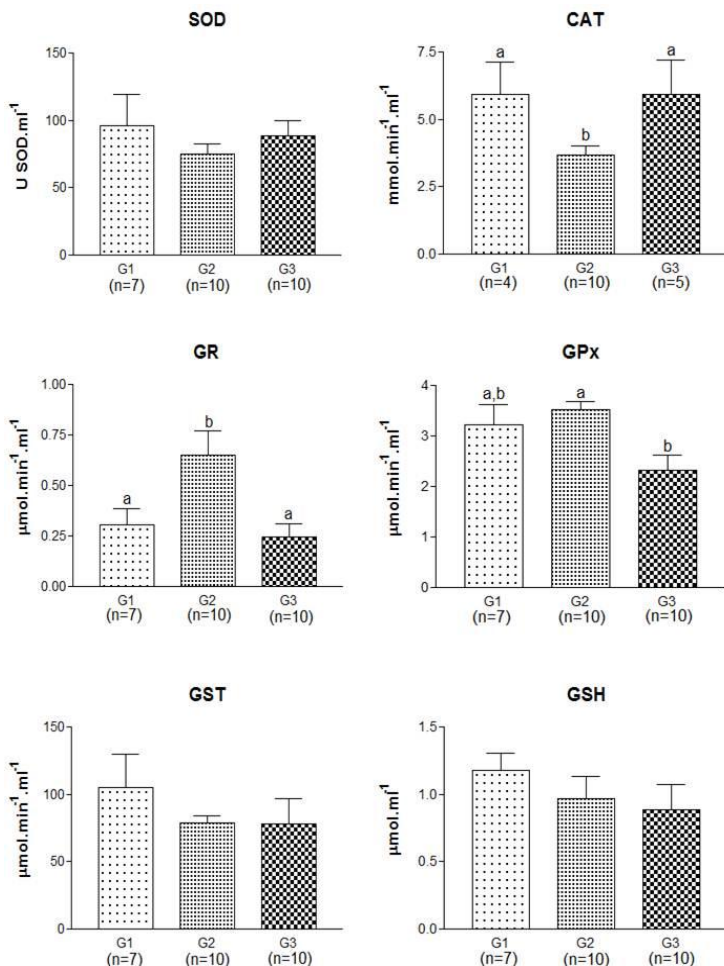


Figura 5. Gráficos das atividades das enzimas antioxidantes: SOD (U SOD.ml⁻¹); CAT (mmol.min⁻¹.ml⁻¹); GPx (μmol. min⁻¹.ml⁻¹); GR (μmol. min⁻¹.ml⁻¹); GST (μmol. min⁻¹.ml⁻¹) e da GSH (μmol.ml⁻¹) presentes no sangue de tartarugas verde, *Chelonia mydas*. G1 é o grupo controle; G2, animais assintomáticos que ingeriram resíduos antrópicos e G3, animais sintomáticos que ingeriram resíduos antrópicos. Os dados estão apresentados como média±E.P., n=n° de amostras. Letras representam diferença estatisticamente significante entre grupos, p<0,05.

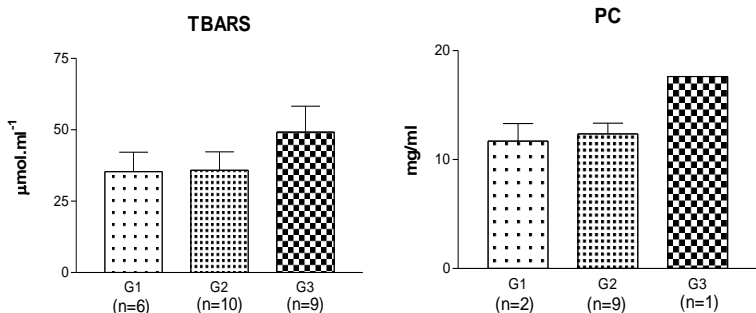


Figura 6. Gráficos das substâncias que reagem com o ácido tiobarbitúrico ($\mu\text{mol TBARS}\cdot\text{ml}^{-1}$) e das proteínas carboniladas (PC, $\text{mg proteínas}\cdot\text{ml}^{-1}$) no sangue de tartarugas verde, *Chelonia mydas*. Onde, G1 é o grupo controle; G2, animais assintomáticos que ingeriram resíduos antrópicos e G3, animais sintomáticos que ingeriram resíduos antrópicos. Os dados estão apresentados como média \pm E.P.



Figura 10. (A) Fecalomas retirado após necrópsia de um indivíduo do grupo 3. (B) Resíduos antrópicos do mesmo indivíduo da fig. 7A.

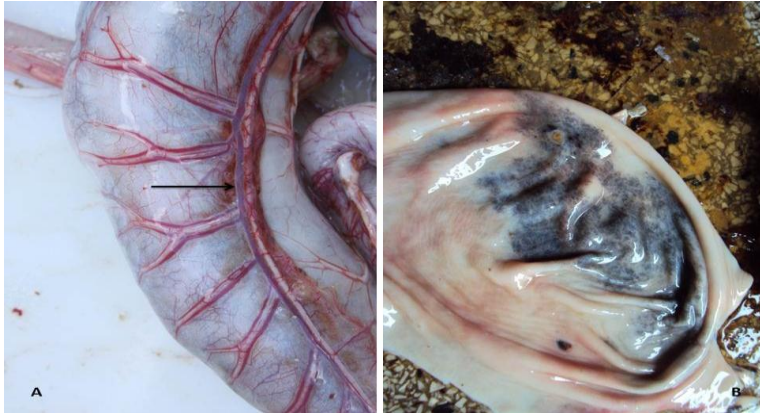


Figura 11. (A) Estômago repleto, (seta) artéria gástrica dorsal congesta de um indivíduo do grupo 3. (B) Lesão hemorrágica em fundo de estômago do mesmo indivíduo da fig.8A



Figura 12. Segmento do intestino grosso necrosado devido obstrução por ingestão de resíduos antrópicos, de um indivíduo do grupo 3.

DISCUSSÃO

A atividade da SOD das tartarugas do grupo 2 apresentou apenas uma tendência de queda em relação ao grupo controle, porém não significativa em termos estatísticos. Resultados similares foram observados por Storey (1996) e Lushchak *et al.* (2005), em fígado, músculo e cérebro de tartarugas de água doce expostas a reoxigenação após anóxia, e em fígado de carpa *Cyprinus carpio* durante reoxigenação após hipóxia, respectivamente.

Quando comparados àqueles verificados (~ 260 U SOD ml^{-1}) nos dois exemplares assintomáticos de *C. mydas* coletados em cruzeiro do IBAMA no ano de 2005 (Wilhelm Filho *et al.*, dados não publicados), a atividade da SOD no presente estudo (~ 140 U SOD ml^{-1}), apresentaram valores cerca de, aproximadamente, a metade. Esta diferença poderia representar uma certa incapacidade dos animais de cativeiro, tanto os destituídos de lixo plástico, como os assintomáticos como sintomáticos, de manterem esta defesa antioxidante em nível mais adequado.

Os resultados da atividade da enzima antioxidante CAT, assim como da GPx verificadas nas tartarugas do grupo 2, foram cerca de 3-4 vezes maiores ($\sim 3-6$ $\text{mmol min}^{-1} \text{ml}^{-1}$) que os verificados em dois exemplares de *C. mydas* ($0,47$ $\text{mmol min}^{-1} \text{ml}^{-1}$) coletados em cruzeiro do IBAMA no ano de 2005, sem apresentarem sintomas de ingestão de lixo antrópico (Wilhelm Filho *et al.*, dados não publicados). Por outro lado, estes resultados foram similares aos resultados obtidos por Akçil *et al.* (2000), que investigaram o impacto da isquemia-reperusão sobre as atividades das enzimas oxidantes em intestinos de ratos. Naquele estudo, os pesquisadores observaram uma diminuição significativa da atividade da catalase e um aumento da atividade da GPx, porém não significativo ($p > 0,05$), nos animais submetidos à isquemia-reperusão. A atividade da CAT, também, foi significativamente menor em fígados de ratos expostos à isquemia-reperusão (Inal *et al.*, 2006). Entretanto, ambos estudos expuseram estes animais de laboratório a períodos agudos e relativamente curtos (horas) de isquemia-reperusão.

Os resultados obtidos no presente estudo, por outro lado, sugerem uma indução da CAT associada a processos crônicos de isquemia-reperusão, ou seja, de intervalos que provavelmente constituem vários dias a até mesmo meses de obstrução do trato digestivo.

A inibição da catalase causa um desequilíbrio redox durante os estágios iniciais da reoxigenação em tilápias, porém, não o suficiente para desenvolver estresse oxidativo (maior dano oxidativo, determinado

pela peroxidação lipídica ou oxidação de proteínas) típico deste episódio (Welker *et al.*, 2012). Entretanto, Aceto *et al.* (1990) observaram um aumento significativo na atividade da GPx, somente durante o período de isquemia do miocárdio em humanos, e sugeriram que tal aumento da GPx poderia proporcionar ao miocárdio uma menor suscetibilidade ao ataque oxidativo, particularmente durante a reoxigenação, período o qual os níveis de EROs são amplamente elevados (Halliwell & Gutteridge, 2006).

Contrariamente aos resultados obtidos na SOD, os valores encontrados no presente estudo para a atividade da GPx, foram muito semelhantes ($3 \mu\text{mol min}^{-1} \text{ml}^{-1}$) àqueles verificados em dois exemplares, aparentemente saudáveis, de *C. mydas* ($3,1 \mu\text{mol min}^{-1} \text{ml}^{-1}$) coletados em cruzeiro do IBAMA no ano de 2005 (Wilhelm Filho *et al.*, dados não publicados).

A atividade enzimática da GPx é um dos meios de controle do organismo dos níveis de peróxido de hidrogênio e hidroperóxidos lipídicos, oriundos do ataque de EROs (Cohen & Hochstein, 1963). A manutenção da atividade da GPx em níveis semelhantes aos encontrados em dois exemplares de *C. mydas* naquele cruzeiro, e também considerando que os indivíduos obstruídos analisados no presente estudo, exibiram atividades da CAT cerca de 3-4 vezes maiores que exemplares aparentemente saudáveis, poderia explicar, pelo menos em parte, o resultado da TBARS obtido no presente trabalho (níveis de lipoperoxidação igualmente 3-4 vezes maiores).

Outra enzima antioxidante de suma importância é a GR. Esta enzima não age diretamente na remoção de EROs, porém é responsável pela regeneração da glutatona à sua forma reduzida (GSH), na presença de nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH), tendo como objetivo impedir a paralisação do ciclo metabólico da glutatona (Meister & Anderson, 1983).

Um aumento significativo da GR, assim como nos animais do grupo 2 do presente estudo, também foi verificado por Wilmore e Storey (1997a,b), em coração de tartarugas de água doce (*Trachemys scripta elegans*), expostas 24 horas à normoxia, após 20 horas de anóxia. Segundo Maulik *et al.* (1999), o aumento da atividade da GR e outras enzimas pode ser significativo para a proteção contra o estresse oxidativo durante a reoxigenação.

Ao contrário do verificado para as atividades de CAT e GPx, os resultados encontrados no presente estudo para a atividade da GR ($\sim 0,5 \mu\text{mol min}^{-1} \text{ml}^{-1}$), foram cerca de, aproximadamente, 10 vezes menores

daqueles verificados nos dois exemplares, aparentemente saudáveis, de *C. mydas* ($6,1 \mu\text{mol min}^{-1} \text{ml}^{-1}$) coletados em cruzeiro no ano de 2005 (Wilhelm Filho *et al.*, dados não publicados). O aumento das atividades da GR e GPx, embora não significativo em termos estatísticos, combinado com a diminuição da atividade da catalase nos animais do grupo 2, sugere que o H_2O_2 estaria em baixa concentração, não causando estresse oxidativo nos animais desse grupo, pois a GPx parece ser a principal enzima a atuar na remoção do H_2O_2 , quando a taxa de produção desta ERO é baixa nas células vermelhas de mamíferos (Halliwell & Gutteridge, 2006). Porém, se a concentração de H_2O_2 é aumentada (ex. por uma toxina que aumente a geração de H_2O_2 intracelular), a catalase torna-se mais importante na remoção do H_2O_2 (Halliwell & Gutteridge, 2006). Entretanto, Gaetani *et al.* (1994), verificaram que o aumento da dependência do mecanismo glutatona peroxidase/reductase não ocorre até que mais de 98% da catalase tenha sido inativada.

À semelhança do que foi verificado na atividade da SOD, quando comparados àqueles dois exemplares saudáveis capturados em cruzeiro ($66,5 \mu\text{mol min}^{-1} \text{ml}^{-1}$; Wilhelm Filho *et al.*, dados não publicados), a atividade da GST nos indivíduos examinados no presente estudo exibiram uma atividade cerca do dobro ($\sim 100 \mu\text{mol min}^{-1} \text{ml}^{-1}$). Além de seu papel contra a detoxificação de xenobióticos, a GST é importante na detoxificação de hidroperóxidos produzidos de forma endógena, notadamente aqueles oriundos de processos de lipoperoxidação (Halliwell & Gutteridge, 2006), o que poderia consistir em justificativa para sua manutenção relativamente elevada nos indivíduos mantidos em cativeiro.

Muitos dos xenobióticos, os quais os organismos estão expostos, são metabolizados através da conjugação da GSH catalisada pela enzima GST (Halliwell & Gutteridge, 2006). Muito pouco se sabe sobre a expressão ou atividade da GST em tartarugas marinhas. Por seu papel na detoxificação de químicos endógenos e exógenos, a GST deve desempenhar uma função crítica na mitigação dos potenciais insultos tóxicos causados por estressores antropogênicos nas tartarugas marinhas (Richardson *et al.*, 2009). Apesar da diminuição na atividade da GST dos animais do grupo 2 no presente estudo, não ter sido estatisticamente significativa, o resultado foi bastante similar aos relatados por Wilmore e Storey (1997a), onde verificaram uma diminuição significativa de 25% e 39% na atividade da GST no fígado exposto à anóxia e cérebro durante a reperfusão após anóxia, respectivamente, em tartarugas de água doce.

Mudanças na atividade da GST foram igualmente observadas após a exposição ao H₂O₂ e a locais contaminados por tetracloroetileno, tanto no ofídeo *Thamnophis sirtalis parietalis* (Hermes-Lima & Storey, 1993), como em tartarugas pintadas (Rie *et al.*, 2000).

A glutatona reduzida (GSH) possui papel central na biotransformação e eliminação de xenobióticos e na defesa das células contra o estresse oxidativo (Joseph *et al.*, 1996). Este tripeptídeo é encontrado intracelularmente em altas concentrações, essencialmente em todos os organismos aeróbicos (Wilhelm Filho *et al.*, 2000). A GSH é uma das mais importantes defesas antioxidantes não enzimáticas e é considerada como uma primeira linha de defesa, devido à sua habilidade de ser um antioxidante generalista e ser prontamente e continuamente recuperada através do ciclo da GSH (Kosower & Kosower, 1978; Meister & Anderson, 1983).

Os valores da GSH sanguínea no presente estudo foram cerca de um pouco mais do dobro (~1 μmol ml⁻¹) dos verificados em dois exemplares de *C. mydas* (0,38 mol μmol ml⁻¹) coletados em cruzeiro do IBAMA no ano de 2005, sem apresentarem sintomas de ingestão de lixo antrópico (Wilhelm Filho *et al.*, dados não publicados). Provavelmente o estresse de captura (anzol) destes indivíduos durante aquele cruzeiro, poderia justificar estes níveis depletados da GSH sanguínea, considerando que este tripeptídeo responde rapidamente a estressores, enquanto os antioxidantes enzimáticos demoram pelo menos algumas horas para serem expressos (Halliwell & Gutteridge, 2006).

Os raros estudos realizados sobre o metabolismo oxidativo em tartarugas marinhas foram focados nas defesas antioxidantes enzimáticas, não levando em consideração a GSH e outros antioxidantes não-enzimáticos (ex. Valdivia *et al.*, 2007; Richardson *et al.*, 2009; Labrada-Martagon *et al.*, 2011). Portanto, o presente estudo é o primeiro a investigar os níveis de GSH no sangue de tartarugas marinhas.

O nível de GSH observado no grupo controle nesse estudo foi proporcional ao verificado em sangue de peixes e duas espécies de répteis crocodilianos amazônicos (Wilhelm Filho *et al.*, 2000), e em sangue de mamíferos mergulhadores (Wilhelm Filho *et al.*, 2002). No grupo 2 houve uma queda da GSH, porém estatisticamente não significativa. Eventos similares foram também observados por Ferencz *et al.* (2002) e Inal *et al.* (2006) em intestino de cão e em fígados de ratos expostos à isquemia-reperusão, respectivamente. Há forte suspeita de que o estresse oxidativo induzido pela reperusão é sustentado pelo

consumo de GSH e concomitante formação de glutatona oxidada (GSSG, um importante indicador de estresse oxidativo), na mucosa gastroentérica, que é alvo principal da isquemia-reperfusão (Younes *et al.*, 1987; Schoenberg *et al.*, 1985; Navarro-González *et al.*, 1998), fato que justificaria o considerável aumento da atividade da GR nos animais do grupo 2. Contrariamente, existem relatos de que o desaparecimento da maioria da GSH ocorre durante o período isquêmico, enquanto que a GSH não é oxidada durante o episódio de isquemia-reperfusão (Gibson *et al.*, 1993).

A média da concentração de TBARS no sangue das tartarugas marinhas do grupo controle foi praticamente o dobro da média verificada no sangue de mamíferos mergulhadores (Wilhelm Filho *et al.*, 2002), e no grupo 2 do presente estudo. Assim como as proteínas carboniladas (PC), quase não houve alteração do TBARS, quando comparados ao controle.

Estes valores de TBARS plasmáticos encontrados no presente estudo foram cerca de 6-10 vezes maiores ($\sim 30-50 \mu\text{mol ml}^{-1}$), comparativamente aos verificados em dois exemplares de *C. mydas* assintomáticos ($4,7 \mu\text{mol ml}^{-1}$) coletados em cruzeiro do IBAMA no ano de 2005 (Wilhelm Filho *et al.*, dados não publicados). Aparentemente, estes dois exemplares refletiriam melhor a condição de lipoperoxidação da espécie, pois não teriam sofrido toda a gama de contribuição estressora de cativeiro, e também considerando que o estresse de captura não afetaria os níveis de TBARS tão rapidamente (Halliwell & Gutteridge, 2006).

Órgãos de tartarugas de água doce expostas à anóxia-reperfusão não indicaram nenhum aumento na concentração de TBARS, sugerindo que as defesas antioxidantes nos órgãos de tartarugas seriam suficientes para evitar o dano oxidativo aos lipídios durante a reoxigenação (Willmore e Storey, 1997a). Desta forma, a hipótese de que o processo de isquemia-reperfusão associado ao mergulho não causaria dano oxidativo adicional a mamíferos mergulhadores (Wilhelm Filho *et al.*, 2002), poderia também ser aplicado às tartarugas mergulhadoras sadias. Por outro lado, Labrada-Martagón *et al.* (2011) não observaram nenhuma influência da condição corpórea, tamanho ou peso das tartarugas marinhas nos níveis de TBARS.

O fato das tartarugas em cativeiro terem sido alimentadas somente com uma tipo de alga (*Pterocladia sp.*), pode ter contribuído para a fragilidade do sistema de defesa antioxidante uma vez que em vida livre a dieta das tartarugas verdes é constituída por diferentes itens

(Seminoff *et al.*, 2002; Amorocho & Reina, 2007) e os níveis de antioxidantes como os carotenóides e vitamina C são variáveis entre as algas que constituem a dieta dessa espécie (McDermid *et al.*, 2007).

Nos animais do grupo 3, animais obstruídos com sintomas, não foi observado mudanças significativas em nenhum indicador de estresse oxidativo, quando comparados ao o grupo controle, porém houve uma tendência de aumento na concentração de TBARS (28,2%), e apesar de uma amostragem insuficiente para uma análise estatística mais robusta, as proteínas carboniladas também apresentaram apenas uma tendência de aumento de 33,6%. Tais resultados poderiam ser explicados pela incapacidade do organismo em responder aos insultos oxidativos persistentes, provavelmente relacionados aos processos de isquemia-reperfusão, devido ao estado de saúde geral bastante comprometido, uma vez que todos os indivíduos do grupo foram a óbito (Tab.2).

Durante os exames necroscópicos foi identificada a presença de fecalomas (Fig.7), vasos congestos (Fig.8), presença de lesões gástricas hemorrágicas (Fig.8B) em todos os casos e, apesar de ter sido feita somente a observação macroscópica das lesões, alguns indivíduos apresentaram sinais de necrose intestinal (Fig.9). Entretanto, Orós *et al.* (2004), identificaram histopatologicamente, enterite necrotizante em todas as tartarugas com intussuscepção intestinal (obstrução causada por corpo estranho linear). Segundo Flint *et al.*, (2009), enterites fibrinosa, catarral e necrotizante são frequentemente diagnosticadas em tartarugas marinhas com obstrução do trato gastroentérico.

Íons ferro capazes de catalisar a produção de $\cdot\text{OH}$ poderiam surgir como resultado da necrose celular, causando a liberação de ferro intracelular, digestão proteolítica de metaloproteínas, liberação de ferro da ferritina ou proteínas ferro-sulfuro pelo $\text{O}_2^{\cdot-}$ e/ou quebra da hemoglobina (ex. pelo H_2O_2), liberada como consequência do sangramento após a reperfusão do tecido (Fig.8B) (Halliwell & Gutteridge, 2006).

O sistema hipoxantina-xantina oxidase provavelmente não é a única fonte de EROs à qual o intestino reoxigenado está sujeito. O dano causado às mitocôndrias pela isquemia poderia fazer “vazar” mais elétrons que o usual da cadeia transportadora de elétrons, formando mais $\text{O}_2^{\cdot-}$ (McCord & Turrens, 1994). A geração de EROs pela ativação de neutrófilos entrando ou já presente no intestino reoxigenado é outra potencial fonte (Granger & Kubes, 1994). Tecidos pós-isquêmicos podem gerar um aumento na quantidade de leucotrienos B_4 , PAF e outros atratores químicos para neutrófilos, e aumentar a expressão de

moléculas de adesão. Os neutrófilos, então aderem ao endotélio e podem ativar a liberação de produtos ($O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 , ClOH, cloraminas, ClOH derivadas, eicosanoides, enzimas proteolíticas como a elastase) que podem agravar a lesão. De fato, a depleção neutrofilica dos animais, ou o pré-tratamento deles com anticorpos que previnem a aderência dos neutrófilos ao endotélio tem sido relatada na diminuição dos danos causados pela reoxigenação do intestino e outros tecidos em estudos com animais inteiros (Kilgore & Lucchesi, 1993, Valen & Vaage, 1993).

A translocação bacteriana é a passagem de bactérias do trato gastroentérico através da mucosa epitelial para locais extraintestinal como linfonodos mesentéricos, fígado e baço (Van Leeuwen *et al.*, 1994). Subsequentemente a bactéria pode se disseminar pelo corpo, produzindo sepsis, choque, ou falência múltipla dos órgãos (FMO). O aumento da permeabilidade do intestino que ocorre durante a isquemia-reperfusão do intestino é um dos fatores que causa a translocação bacteriana (Aksoyek *et al.*, 2002; Iijima *et al.*, 1997; Xia *et al.*, 2002). Outros fatores são o crescimento excessivo de bactérias no intestino e diferenças nas defesas imune do indivíduo (Berg *et al.*, 1999).

A isquemia-reperfusão do intestino resulta na produção de moléculas tais como H_2O_2 , $O_2^{\cdot-}$, e citocinas inflamatórias que podem lesionar órgãos distantes. Isso leva ao desenvolvimento da síndrome da resposta inflamatória sistêmica, que pode progredir para (FMO) (Ceppa *et al.*, 2003). A isquemia-reperfusão do intestino pode ainda causar a infiltração de neutrófilos no pulmão, fato que contribui para o desenvolvimento da síndrome respiratória aguda (Koksoy *et al.*, 2001; Xiao *et al.*, 1997). Por isso, o intestino é chamado de “motor da FMO” (Marshall, 1998).

A correlação negativa, estatisticamente significativa, entre as atividades de algumas enzimas antioxidantes (GPx e GR) e o volume de resíduos antrópicos ingeridos, verificada no presente estudo, sugere que o aumento da ingestão de resíduos antrópicos pode causar uma falência do sistema de defesa antioxidante das tartarugas, agravando o quadro clínico e as levando a morte. Entretanto, uma correlação positiva entre a concentração de pesticidas organoclorados e as atividades da catalase e glutathiona peroxidase no sangue das tartarugas marinhas foi observada por Labrada-Martagón *et al.* (2011). Há vários registros da ocorrência de contaminantes orgânicos em animais que consumiram resíduos antrópicos (Mato *et al.*, 2001; Endo *et al.*, 2005; Rios *et al.* 2007; Ogata *et al.*, 2009; Colabuono *et al.*, 2011).

Diversos estudos já foram realizados sobre a interação das tartarugas marinhas com resíduos antrópicos, principalmente em relação à ingestão desses resíduos (Bugoni *et al.*, 2001; Barros *et al.*, 2007; Tourinho *et al.*, 2008; Guebert *et al.*, 2008), porém esse é o primeiro estudo com o enfoque do estresse oxidativo e realizado com tartarugas marinhas vivas.

Foi verificada a presença de resíduos antrópicos em 74% das tartarugas, porém o mais surpreendente foi o alto índice de tartarugas marinhas sem sintomas, ou seja, aparentemente saudáveis que mostraram ter ingerido resíduos antrópicos (63%). Houve uma diferença bastante significativa, em termos estatísticos, em relação à massa e o volume de resíduos ingeridos entre o grupo 2 e 3 ($p < 0,0007$ e $p < 0,002$, respectivamente).

Estudos sobre as defesas antioxidantes e dano oxidativo em animais selvagens sob uma perspectiva ecológica tiveram início somente há pouco mais de duas décadas (McGraw *et al.*, 2010). Algumas das questões abordadas são as fontes naturais de variação das defesas antioxidantes entre espécies, dentro de espécies entre os indivíduos de acordo com o habitat, condição fisiológica, tecido, e entre os indivíduos ao longo do tempo (McGraw *et al.*, 2010). Há poucos estudos de estresse oxidativo em répteis (Hermes-Lima & Storey, 1993; Wilmore & Storey, 1997a,b), e o conhecimento básico sobre estresse oxidativo em tartarugas marinhas é ainda muito escasso.

O presente estudo é o primeiro relato sobre indicadores de estresse oxidativo no sangue de tartarugas verdes associado à obstrução por resíduos antrópicos, portanto não há dados disponíveis para comparação, particularmente sobre a influência da ingestão de resíduos antrópicos nesses indicadores.

CONCLUSÕES

Os resultados do presente trabalho sugerem que a quantidade de resíduos ingerida pelos animais assintomáticos do grupo 2, aparentemente não foi suficiente para causar uma maior produção de EROs (isquemia-reperfusão), e que os níveis constitutivos da atividade de algumas enzimas, notadamente da catalase, seriam suficientes para combater as EROs geradas em excesso, ou que as tartarugas sujeitas à isquemia-reperfusão do intestino, recorrem preferencialmente às enzimas peroxidásicas para detoxificar, tanto o H_2O_2 (CAT e GPx), como os demais hidroperóxidos (GST e GPx).

Aparentemente, as defesas antioxidantes constitutivas, relativamente elevadas para um grupo de organismos que apresentam um nível de atividade metabólica relativamente baixa, parecem, pelo menos em parte, atenuar o estresse oxidativo vinculado aos processos de isquemia-reperfusão que estes quelônios estão submetidos, não somente restrito às atividades fisiológicas do mergulho, mas também aos aspectos patológicos relacionados à obstrução vinculada à ingestão de lixo de natureza antrópica.

Não foi observada nenhuma alteração estatisticamente significativa dos indicadores de estresse oxidativo nos indivíduos do grupo 3 em relação ao controle, porém a quantidade de resíduos antrópicos ingerida foi maior 13,8 vezes em relação a massa e 6,5 vezes em relação ao volume, quando comparada ao grupo 2. Isto sugere que a manifestação dos sintomas estaria diretamente ligada ao grau de ingestão de resíduos. O grande volume de resíduo ingerido causa uma diminuição mais acentuada do aporte sanguíneo (hipóxia/isquemia) aos órgãos do sistema digestivo por compressão mecânica. A manutenção desse insulto oxidativo agrava ainda mais seu quadro clínico, a tal ponto que o sistema de defesas antioxidantes não é mais adequadamente responsivo às agressões oxidativas, podendo conduzir à falência múltipla dos órgãos, culminando com a morte do animal. Neste particular também seria importante avaliar as consequências da desobstrução (evacuação), pois poderia acentuar, num primeiro momento, o estresse oxidativo sistêmico, aspecto que poderia estar relacionado com a alta mortalidade dos indivíduos após as respectivas evacuações verificadas em cativeiro.

Portanto, considerando aspectos fisiológicos, a ingestão de resíduos antrópicos pelas tartarugas marinhas pode ser muito mais

nociva que as descritas anteriormente (Lutz, 1990; Schulman & Lutz, 1995; Guebert, 2008).

Devido ao alto índice de ingestão de resíduos antrópicos por tartarugas que não apresentaram nenhum tipo de sintoma, verificado no presente estudo, faz-se necessária uma reavaliação dos protocolos de reabilitação para essas espécies, implementando-se procedimentos para evitar o acúmulo de material antrópico ingerido e a suplementação de antioxidante, como sugerido por Walsh, 1999, diminuindo as chances do animal sofrer as consequências decorrentes da isquemia-reperfusão do trato gastrointestinal, pois esses animais, geralmente, são apenas marcados, medidos, pesados e liberados.

Os animais do grupo controle utilizados nesse estudo eram clinicamente saudáveis e foram coletadas em um ambiente relativamente prístino, assim como os dois exemplares que foram utilizados, apesar do número reduzido, para efeito comparativo, por não sofrerem as consequências deletérias relacionadas ao cativeiro. Portanto, em futuras avaliações do estresse oxidativo, através do sangue de tartarugas marinhas, os valores aqui apresentados poderiam ser usados como parâmetros indicadores auxiliares quanto à ingestão de resíduos antrópicos.

REFERÊNCIAS

ACETO, A. MEZZETTI A.; DI ILIO, C; CALAFIORE, A.M.; DE CESARE, D.; BOSCO, G.; ACCIAI, N.; CAPPELLETTI, L.; FEDERICI, G.; CUCCURULLO, F.; Effect of ischaemia-reperfusion on glutathione peroxidase, glutathione reductase and glutathione transferase activities in human heart protected by hypothermic cardioplegia, **Free Radical Research Communications**, v.8, n 2, p.85-91, 1990.

AEBI, H., Catalase in vitro. **Methods in Enzymology**, v.105, p.121-126, 1984.

AGUIRRE, A.A.; BALAZS, G.H., Blood biochemistry values of green turtles, *Chelonia mydas*, with and without fibropapillomatosis. **Comparative Haematology International**, v.10, p.132–137, 2000.

AGUIRRE, A.; LUTZ, P., Sea turtles as sentinels of marine ecosystem health: is fibropapillomatosis an indicator? **EcoHealth**, v.1, p.275-283, 2004.

AKÇIL, E.; TUĞ, T.; DÖŞEYEN, Z., Antioxidant enzyme activities and trace element concentrations in ischemia–reperfusion. **Biological Trace Element Research**, v.76, n.1, p.13-17, 2000.

AKSOYEK, S.; CINEL, I.; AVLAN, D.; CINEL, L.; OZTURK, C.; GURBUZ, P.; NAYCI, A.; ORAL, U., Intestinal ischemic preconditioning protects the intestine and reduces bacterial translocation. **Shock**, v.18, n5, p.476–480, 2002.

AMOROCHO, D.F., REINA, R.D., Feeding ecology of the East Pacific green sea turtle (*Chelonia mydas agassizii*) at Gorgona National Park, Colombia. **Endangered Species Research**, v.3, p.43–51, 2007.

BARROS, J.A.; COPERTINO, M.S.; MONTEIRO, D.S.; ESTIMA, S.C., Análise da dieta de juvenis de tartaruga verde (*Chelonia mydas*) no extremo sul do Brasil. **ANAIS CONGRESSO DE ECOLOGIA DO BRASIL**, Caxambu – MG, 2007.

BECKMAN, K. B.; AMES, B. N., Oxidative decay of DNA. **Journal of Biological Chemistry**, v.272, p.19633–19636, 1997.

BERG, R.D., Bacterial translocation from the gastrointestinal tract. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v.473, p.11–30, 1999.

BEUTLER, E., **Red Metabolism: A Manual of Biochemical Methods**. (2nd ed). Grune & Stratton, New York. 1975.

BIRD, R.P.; DRAPER, A.H., Comparative studies on different methods of malondyaldehyde determination. **Methods in Enzymology**, v.90, p.105-110, 1984.

BJORNDAL, K.A., Foraging ecology and nutrition of sea turtles, in **The Biology of Sea Turtles**, Lutz, P.L. and Musick, J.A., Eds., CRC Press, Boca Raton, FL, p.199–231, 1997.

BUGONI, L.; KRAUSE, L.; PETRY, M.V., Marine debris and human impacts on sea turtles in southern Brazil. **Marine Pollution Bulletin**, v. 42, n.12, p.1330-1334, 2001.

BUITRAGO, J.; GUADA, H.J., La tortuga Carey (*Eretmochelys imbricata*) em Venuzuela. **Interciência**, v. 27, n.8, p. 392-399. 2002.

CALBERG, I.; MANNERVIK, B. Glutathione reductase from rat liver. **Methods in Enzymology**, v.113, p. 484-490, 1985.

CECCA, Centro de Estudos Cultura e Cidadania. **Uma cidade numa ilha**. Relatório sobre os problemas sócio-ambientais da Ilha de Santa Catarina. 2^a ed. Insular, Florianópolis, Brasil, p.248, 1997.

CEPPA, E.P.; FUH, K.C.; BULKLEY, G.B., Mesenteric hemodynamic response to circulatory shock. **Current Opinion in Critical Care**, v. 9, n.2, p.127–132, 2003.

CHAN, E.H.; LIEW, H.C.; MAZLAN, A.G., The incidental capture of sea turtles in fishing gear in Terengganu, Malaysia. **Biological Conservation**, v.43, p.1-7, 1988.

CHENG, I.- JIUNN; CHEN, T.- HSI., The incidental capture of five species of sea turtles by coastal setnet fisheries in the Eastern waters of Taiwan. **Biological Conservation**. v.82, n.2, 1997.

COHEN, G.; HOCHSTEIN, P., Glutathione peroxidase: the primary agent for the elimination of hydrogen peroxide in erythrocytes. **Biochemistry-USA**, v.2, p.1420-1428, 1963.

COLABUONO, F.I., **Poluentes orgânicos persistentes e ingestão de plásticos em albatrozes e petréis (*Procellariiformes*)**. 2011, p.221. Tese (Doutorado). Programa de Pós-graduação em Ciências, área de Oceanografia Química e Geológica, Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo. 2011.

DALBERG, M.L.; DAY, R.H., Observations of man-made objects on the surface of the North Pacific Ocean, In: **Proceedings of the Workshop on Fate and Impact of Marine Debris**, 27-29 November 1984, Honolulu, Hawaii, R.S. Shomura & O. Yoshida, (eds.), p.198-212. US Dep. Commer. NOAA Technical Memorandum, NMFS. NOAA-TM-NMFS-SWFC-54.

DERRAIK, J.G.B., The pollution of marine environment by plastic debris: a review, **Marine Pollution Bulletin**, v.44, p.842-852, 2002.

DI BELLO, A., VALASTRO, C., STAFFIERI, F., CROVACE, A., Contrast radiography of the gastrointestinal tract in sea turtles. **Veterinary Radiology & Ultrasound**, v.47, n.4, p.351-354, 2006.

DOWNS, C.A.; FAUTH, J.E.; WOODLEY, C.H., Assessing the health of grass shrimp (*Palaemonetes pugio*) exposed to natural and anthropogenic stressors: a molecular biomarker system. **Marine Biotechnology**, v.3, p.380-397, 2001.

ENDO, S.; TAKIZAWA, R.; OKUDA, K.; TAKADA, H.; CHIBA, K.; KANEHIRO, H.; OGI, H.; YAMASHITA, R.; DATE, T., Concentration of polychlorinated biphenyls (PCBs) in beached resin pellets: variability among individual particles and regional differences. **Marine Pollution Bulletin**, v.50, n.10, p.1103-1114, 2005.

FELGER, R.S.; CLIFFTON, K.; REGAL, P.J., Winter dormancy in sea turtles: Independent discovery and exploitation in the Gulf of California by two local cultures, **Science**, v.191, p.283, 1976.

FERENCZ, A.; SZANTO, Z.; BORSICZKY, B.; KISS, K.; KALMAR-NAGY, K.; SZEBERENYI, J.; HORVATH, P.O.; ROTH, E., The effects of preconditioning on the oxidative stress in small-bowel autotransplantation. **Surgery**, v.132, n.5, p.877–884, 2002.

FLINT, M.; PATTERSON-KANE, J.C.; LIMPUS, C.J.; THIERRY, W.M.; DAVID BLAIR; MILLS, P.C., Postmortem diagnostic investigation of disease in free-ranging marine turtle populations: a review of common pathologic findings and protocols, **Journal of Veterinary Diagnostic Investigations**, v.21, p.733-759, 2009.

FLOHÉ, L.; GUNZLER, W.A., Assays of glutathione peroxidase, **Methods in Enzymology**, v.105, p.114-121, 1984.

FRASER, C.M., (editor), **The Merck Veterinary Manual**. 6th ed. Merck and Co., Rahway, N.J., 1986.

GAETANI, G.F.; KIRKMAN, H.N.; MANGERINI, R.; FERRARIS, A.M., Importance of catalase in the disposal of hydrogen peroxide within human erythrocytes. **Blood**, v.84, p.325, 1994.

GARCIA-FERNANDEZ, A.J.; GOMEZ-RAMIREZ, P.; MARTINEZ-LOPEZ, E.; HERNANDEZ-GARCIA, A.; MARIA-MOJICA, P.; ROMERO, D.; JIMENEZ, P.; CASTILLO, J.J.; BELLIDO, J.J., Heavy metals in tissues from loggerhead turtles (*Caretta caretta*) from the southwestern Mediterranean (Spain). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.72, p.557–563, 2009.

GIL-DEL VALLE, L.; MARTÍNEZ-SÁNCHEZ, G.; GONZÁLEZ-BLANCO, I.; PÉREZ-AVILA, L.J., Estrés oxidativo: mecanismos generales involucrados y su relación con el virus de la inmunodeficiencia humana, **Bioquímica**, v.24, p.85–93, 1999.

GIBSON, D.D.; BRACKETT, D.J.; SQUIRES, R.A.; BALLA, A.K.; LERNER, M.R.; MCCAY, P.B.; PENNINGTON, L. R., Evidence that the large loss of glutathione observed in ischemia/reperfusion of the

small intestine is not due to oxidation to glutathione disulfide, **Free Radical Biology and Medicine**, v.14, p.427–433, 1993.

GRANGER, D.N.; HOLLWARTH, M.E.; PARKS, D.A., Ischemia-reperfusion injury: Role of oxygen-derived free radicals. **Acta Physiologica Scandinavica Supplementum**, v.548 p.47–63, 1986.

GRANGER, D.N.; KUBES, P., The microcirculation and inflammation: modulation of leukocyte-endothelial cell adhesion. **Journal Leukocyte Biology**, v.55, p.662, 1994.

GUEBERT, F.M., **Ecologia alimentar e consumo de material inorgânico por tartarugas-verdes, *chelonina mydas*, no litoral do estado do Paraná**. 2008. 76 p. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-graduação em Ciências biológicas, Zoologia, Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, 2008.

HABIG, W.H.; PABST, M.J.; JAKOBY, W.B. Glutathione-S-Transferases : The first enzymatic step in mercapturic acid formation. **Journal of Biological Chemistry**, v.249, n.22, p.7130-7139, 1974.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C., **Free Radicals in Biology and Medicine**, Oxford University Press. 4a. Ed., Oxford, UK, p.936, 2006.

HAMANN, M.; GODFREY, M.H.; SEMINOFF, J.A.; ARTHUR, K.; BARATA, P.C.R.; BJORN DAL, K.A.; BOLTEN, A.B.; BRODERICK, A.C.; CAMPBELL, L.M.; CARRERAS, C.; CASALE, P.; CHALOUPKA, M.; CHAN, S. K.F.; COYNE, M.S.; CROWDER, L.B.; DIEZ, C.E.; DUTTON, P.H.; EPPERLY, S.P.; FITZSIMMONS, N.N.; FORMIA, A.; GIRONDOT, M.; HAYS, G.C.; JIUNN, C.I.; KASKA, Y.; LEWISON, R.; MORTIMER, J.A.; NICHOLS, W.J.; REINA, R.D.; SHANKER, K.; SPOTILA, J.R.; TOMAS, J.; WALLACE, B.P.; WORK, T.M.; ZBINDEN, J.; GODLEY, B.J., Global research priorities for sea turtles: informing management and conservation in the 21st century. **Endangered. Species Research**, v.11, p.245–269, 2010.

HARRISON, R., Structure and function of xanthine oxidoreductase: Where are we now? **Free Radical Biology and Medicine**, v.33, n.6, p.774–797, 2002.

HERMES-LIMA, M.; STOREY, K.B., Role of antioxidants in the tolerance of freezing and anoxia by garter snakes. **American Journal of Physiology**, v.265, p.646–652, 1993.

HOCHSCHEID, S.; BENTIVEGNA, F.; HAYS, G.C., First records of dive durations for a hibernating sea turtle, **Biology Letters**, v.1, n.82, 2005.

HUTCHINSON, J.; SIMMONDS, M., Escalation of threats to marine turtles. **Oryx**, v.26, n.2, 1992.

IJIMA, S.; SHOU, J.; NAAMA, H.; CALVANO, S.E.; DALY, J.M., Beneficial effect of enteral glycine in intestinal ischemia/reperfusion injury, **Journal of Gastrointestinal Surgery**, v.1, n.1, p.53–60, 1997.

IKONOMOPOULOU, M.P.; OLSZOWY, H; LIMPUS, C.; FRANCIS, R.; WHITTIER, J., Trace element concentrations in nesting flatback turtles (*Natator depressus*) from Curtis Island, Queensland, Australia. **Marine Environmental Research**, v.71, p.10-16, 2011.

INAL, M.; KANBAK, G.; ADALI, M., Prevention of ischemia-reperfusion-induced oxidative injury in liver by allopurinol and pentoxifylline. **Transplantations Medizin**, v.29, 2006.

JOANISSE, D.R.; STOREY, K.B., Oxidative damage and antioxidants in *Rana sylvatica*, the freeze tolerant wood frog. **American Journal of Physiology**, v.271, p.545–553, 1996.

JOSEPH, J.A.; VILLALOBOS-MOLINA, R.; DENISOVA, N.; ERAT, S.; CUTLER, R.; STRAIN, J.G., Age differences in sensitivity to H₂O₂- or NO- induced reductions in K⁺-evoked dopamine release from superfused striatal slices: reversals by PBN or Trolox. **Free Radical Biology and Medicine**, v.20, p.821–830, 1996.

KARL, S.A.; BOWEN, B.W., Evolutionary significant units versus geopolitical taxonomy: molecular systematics of an endangered sea turtle (genus *Chelonia*), **Conservation Biology**, v.13, n.5, p.990-999, 1999.

KENNISH, M.J., **Practical Handbook of Estuarine and Marine Pollution**. CRC Press, Boca Raton, 1997.

KILGORE, K.S.; LUCCHESI, B.R., Reperfusion injury after myocardial infarction: the role of free radicals and the inflammatory response, **Clinical Biochemistry**, v.26, p.359, 1993.

KOKSOY, C.; KUZU, M.A.; KUZU, I.; ERGUN, H.; GURHAN, I., Role of tumour necrosis factor in lung injury caused by intestinal ischaemia-reperfusion, **British Journal of Surgery**, v.88, n.3, p.464–468, 2001.

KOSOWER, N.S.; KOSOWER, E.M., The glutathione status of cells. **International Review of Cytology**, v.54, p.109-160, 1978.

LABRADA-MARTAGÓN, V.; TENORIO RODRÍGUEZ, P. A.; MÉNDEZ-RODRÍGUEZ, L.C.; ZENTENO-SAVÍN, T., Oxidative stress indicators and chemical contaminants in East Pacific green turtles (*Chelonia mydas*) inhabiting two foraging coastal lagoons in the Baja California peninsula. **Comparative Biochemistry and Physiology**, 2011.

LUSHCHAK, V.I.; BAGNYUKOVA, T.V.; LUSHCHAK, O.V.; STOREY, J.M.; STOREY, K.B., Hypoxia and recovery perturb free radical processes and antioxidant potential in common carp (*Cyprinus carpio*) tissues. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v.37, 1319–1330, 2005.

LUTCAVAGE, M.; LUTZ, P.L., Diving physiology, in: **The Biology of Sea Turtles**, Lutz, P.L. and Musick, J.A. (eds.), CRC Press, Boca Raton, FL, p.277–296, 1997.

LUTZ, P., Studies on the ingestion of plastic and latex by sea turtles. In: **Proceedings of the 2nd international conference on marine debris**. R. S. Shomura & M. L. Godfrey (eds). NOAA Technical Memorandum. Honolulu, Hawaii, p.719-735, 1990.

MCGRAW, K.J.; COHEN, A.A.; DAVID COSTANTINI, D.; HŌRAK, P., The ecological significance of antioxidants and oxidative stress: a

marriage between mechanistic and functional perspectives. **Functional Ecology**, v.24, p.947–949, 2010.

MARCOVALDI, M.A.; MARCOVALDI, G.G., Marine turtles of Brazil: the history and structure of Projeto TAMAR-IBAMA, **Biological Conservation**, v.91, p.35-41, 1999.

MÁRQUEZ, M.R., **Sea Turtles of the World**. An another and illustrated catalogue of the turtle species known to date, p.81, 1990.

MARSHALL, J.C., The gut as a potential trigger of exercise-induced inflammatory responses, **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, v.76, n.5, p.479–484, 1998.

MARTÍNEZ-CAYUELA, M., Toxicidad de xenobióticos mediada por radicales libres de oxígeno, **Ars Pharm.**, v.39, p.5–18, 1998.

MATO, Y.; ISOBE, T.; TAKADA, H.; KANEHIRO, H.; OHTAKE, C.; KAMINUMA, T., Plastic resin pellets as a transport medium for toxic chemicals in the marine environment. **Environmental Science and Technology**, v.35, p.318–324, 2001.

MAULIK, N.; ENGELMAN, R.M.; ROUSOU, J.A.; FLACK III, J.E.; DEATON, D.; DAS, D.K., Ischemic preconditioning reduces apoptosis by upregulating anti-death gene Bcl-2. **Circulation**, v.100, p.369–375, 1999.

MCCORD, J.M.; TURRENS, J.F., Mitochondrial injury by ischemia and reperfusion, **Current Topics in Bioenergy**, v.17, p.173, 1994.

MCDERMID, K.J., STUERCKE, B., BALAZS, G.H., Nutritional composition of marine plants in the diet of the green sea turtle (*Chelonia mydas*) in the Hawaiian Islands. **Bulletin of Marine Science**, v.81, n.1, p.55-71, 2007.

MEISTER, A., ANDERSON, M.E., Glutathione. **Annual Review of Biochemistry**, v52, p.711–722, 1983.

MENESHIAN, A.; BULKLEY, G.B., The physiology of endothelial xanthine oxidase: From urate catabolism to reperfusion injury to

inflammatory signal transduction. **Microcirculation**, v.9, n.3, p.161–175, 2002.

MISRA, H.P.; FRIDOVICH, L., The generation of superoxide radical during the autoxidation of ferredoxins. **Journal of Biological Chemistry** v.246, n.22, p.6886-6890. 1971.

MONAGAS, P.; OROS, J.; ARANA, J.; GONZALEZ-DIAZ, O.M., Organochlorine pesticide levels in loggerhead turtles (*Caretta caretta*) stranded in the Canary Islands Spain. **Marine Pollution Bulletin**, v.56, p.1949–1956, 2008.

MROSOVSKY, N.; GERALDINE, R.D.; MICHAEL, J.C., Leatherback turtles: The menace of plastic, **Marine Pollution Bulletin**, v.58, n.2, p.287-289, 2009.

NAVARRO-GONZÁLVEZ, J.A.; GARCÍA-BENAYAS, C.; ARENAS, J., Semiautomated measurement of nitrate in biological fluids. **Clinical Chemistry**, v.44, n.3, p.679-681, 1998.

OGATA, Y.; TAKADA, H.; MIZUKAWA, K.; HIRAI, H.; IWASA, S.; ENDO, S.; MATO, Y.; SAHA, M.; OKUDA, K.; NAKASHIMA, A.; MURAKAMI, M.; ZURCHER, N.; BOOYATUMANONDO, R.; ZAKARIA, M.P.; DUNG, L.; GORDON, M.; MIGUEZ, C.; SUZUKI, S.; MOORE, C.; KARAPANAGIOTI, H.K., International pellet watch: global monitoring of persistent organic pollutants (POPs) in coastal waters. Initial phase data on PCBs, DDTs, and HCHs1. **Marine Pollution Bulletin**, v.58, n.10, p.1437–1446, 2009.

OGREN, L.; MCVEA, C.J., Apparent hibernation by sea turtles in North American waters, in **Biology and Conservation of Sea Turtles**, K.A. Bjorndal (ed.), Washington, DC: Smithsonian Institution Press, p.127–132, 1995.

ORÓS, J.; CALABUIG, P.; DÉNIZ, S., Digestive pathology of sea turtles stranded in the Canary Islands between 1993 and 2001, **Veterinary Record**, v.155, p.169-174, 2004.

OWENS, D.; WM.; RUIZ, G.J., New methods of obtaining blood and cerebrospinal fluid from marine turtles, **Herpetologica**, v.36, n.1, p.17-20, 1980.

PARKS, D.A.; BULKLEY, G.B.; GRANGER, D.N., Role of oxygen-derived free radicals in digestive tract diseases. **Surgery**, v.94, p.415-422, 1983.

PORTER, W.P.; MITCHELL, J.W.; BECKMAN, W.A.; DEWITT, C.B., Behavioral implications of mechanistic ecology. **Oecologia**, v.13, p.1-54, 1973.

RICHARDSON, K.L.; GOLD-BOUCHOT, G.; SCHLENK, D. The characterization of cytosolic glutathione transferase from four species of sea turtles: Loggerhead (*Caretta caretta*), green (*Chelonia mydas*), olive ridley (*Lepidochelys olivacea*), and hawksbill (*Eretimochelys imbricata*), **Comparative Biochemistry and Physiology**, v.150, p.279-284. 2009.

RIE, M.T.; LENDAS, K.A.; WOODIN, B.R.; STEGEMAN, J.J.; CALLARD, I.P., Hepatic biotransformation enzymes in a sentinel species, the painted turtle (*Chrysemys picta*), from Cape Cod, Massachusetts: seasonal-, sex- and location related differences. **Biomarkers**, v.5, p.382-394, 2000.

RIOS, L.M.; MOORE, C.; JONES, P., Persistent organic pollutants carried by synthetic polymers in the ocean environment. **Marine Pollution Bulletin**, v.54, p.1230-1237, 2007.

RYAN, P.G.,CONNELL, A.D., GRDNER, B.D., Plastic ingestion and PCB's in seabirds: Is there a relationship? **Marine Pollution Bulletin**, v.19, p.174-176, 1998.

SANTOS, R.C.A.; SOTO, J.M.R., Resgate Histórico da Ocorrência, Uso Tradicional e Comércio de Tartarugas Marinhas no Litoral Centro-Sul do Estado de Santa Catarina, Brasil. **II Jornada de Conservação e Pesquisa de Tartarugas Marinhas no Atlântico Sul Ocidental**, 2005.

SCHLENK, D.; DI GIULIO, R.T., Biochemical responses as indicators of aquatic ecosystem health. In: Adams, S.M. (Ed.), **Biological**

Indicators of Aquatic Ecosystem Stress. American Fisheries Society, Maryland, p.13–42, 2002.

SCHOENBERG, M.H.; FREDHOLM, B.B.; HAGLUND, U.; JUNG, H.; SELLIN, D.; YOUNES, M.; SCHILDBERG, F.W., Studies on the oxygen radical mechanism involved in the small intestinal reperfusion damage, **Acta Physiologica Scandinavica**, v.124, p.581–589, 1985.

SCHULMAN, A.A.; LUTZ, P., The effect of plastic ingestion on lipid metabolism in the green sea turtle (*Chelonia mydas*). In: **Proceedings 12th Annual Workshop On Sea Turtle Biology And Conservation**, J. J. Richardson. & I. H. Richardson (eds). NOAA Technical Memorandum. Miami, FL. p.122-124, 1995.

SEMINOFF, J.A., REZENDIZ, A., NICHOLS, W.J., Diet of east pacific green turtle (*Chelonia mydas*) in the central Gulf of California, México. **Journal of Herpetology**, v.36, n.3, p.447-453, 2002.

SIES, H., Oxidative stress: introductory remarks. In: Sies, H. **Oxidative stress**. Academic Press, p.1-7, 1985.

SOTO, J.M.R.; BEHEREGARAY, R.C.P. *Chelonia mydas* in the northern region of the Patos Lagoon, south Brazil. **Marine Turtle Newsletter**, v.77, p.10-11, 1997.

SOUTHWOOD, A.L., RUSSEL, A.D.; LUTCAVAGE, M.E.; PALADINO, F.V.; WEST, N.H.; GEORGE, R.H.; JONES, D.R., Heart rates and diving behavior of leatherback sea turtles in the eastern Pacific Ocean, **Journal of Experimental Biology**, 202 (Pt 9), 1115, 1999.

STEGEMAN, J.J.; BROUWER, M.; DI GIULIO, R.T.; FÖRLIN, L.; FOWLER, B.A.; SANDERS, B.M.; VAN VELD, P.A., Molecular responses to environmental contamination: enzyme and protein systems as indicators of chemical exposure and effect. In: Huggett, R.J., Kimerle, R.A., Mehrle Jr., P.M., Bergman, H.L. (Eds.), **Biomarkers. Biochemical, Physiological and Histological Markers of Anthropogenic Stress**. Lewis Publishers, Chelsea, p.235–335, 1992.

STOREY, K.B., Metabolic adaptations supporting anoxia tolerance in reptiles: recent advances, **Comparative Biochemistry and Physiology**, B, v.113, p.23–35, 1996.

STOREY, K.B., Reptile freeze tolerance: Metabolism and gene expression. **Cryobiology**, v.52, p.1–16, 2006.

THOMPSON, J.A., BURKHOLDER, D., HEITHAUS, M.R., DILL, L.M., Validation of a rapid visual-assessment technique for categorizing the body condition of green turtles (*Chelonia mydas*) in the field, **Copeia**, n.2, p.251–255, 2009.

TOURINHO, P.S.; IVAR DO SUL, J.A.; FILLMANN, G., Frequência de ingestão e tipos de resíduos sólidos em tartarugas-verdes na costa do Rio Grande do Sul, Brasil: distribuição e fragmentação no trato gastrointestinal, **Anais do III Congresso Brasileiro de Oceanografia – I Congresso Ibero-Americano de Oceanografia**, Fortaleza (CE), 2008.

VALDIVIA, P.A.; ZENTENO-SAVÍN, T.; GARDNER, S.C.; AGUIRRE, A.A., Basic oxidative stress metabolites in eastern Pacific green turtles (*Chelonia mydas agassizii*), **Comparative Biochemistry and Physiology**, Part C 146, p.111–117, 2007.

VALEN, G.; VAAGE, J., Toxic O₂ metabolites and leukocytes in reperfusion injury. **Scandinavian Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery**, (Suppl.) v.41, n.19, 1993.

VAN LEEUWEN, P.A.; BOERMEESTER, M.A.; HOUDIJK, A.P.; FERWERDA, C.C.; CUESTA, M.A.; MEYER, S.; WESDORP, R.I., Clinical significance of translocation. **Gut**, v.35, (Suppl 1), p.28–34, 1994.

VÁZQUEZ-MEDINA, J.P.; ELSNER, R.; ZENTENO-SAVIN, T., Antioxidant enzymes in ringed seal tissues: potential protection against dive-associated ischemia/reperfusion. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v.142, n.(3–4), p.198–204, 2006.

WALSH, M., Rehabilitation of Sea Turtles. In: **Research and Management Techniques for the Conservation of Sea Turtles**.

ECKERT, K.L., BJORNDAL, K.A., ABREU-GROBOIS, F.A., DONNELLY, M., (eds). IUCN/SSC Marine Turtle Specialist Group Publication n.4, 1999.

WELKER, A.F.; CAMPOS, E.G.; CARDOSO, L.A.; HERMES-LIMA, M., Role of catalase on the hypoxia/reoxygenation stress in the hypoxic-tolerant Nile tilapia. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, (February 29, 2012). doi:10.1152/ajpregu.00243.2011.

WILHELM FILHO, D.; TORRES, M.A.; MARCON, J.L.; FRAGA, C.G.; BOVERIS, A., Comparative antioxidant defences in vertebrates – emphasis on fish. **Trends in Comparative Biochemistry and Physiology**, v.7, p.33-44. 2000.

WILHELM FILHO, D.; SELL, F.; RIBEIRO, L., GHISLANDI, M.; CARRASQUEDO, F.; FRAGA, C.G.; WALLAUER, J.P.; SIMÕES-LOPES, P.C.; UHART, M.M., Comparison between the antioxidante status of terrestrial and diving mammals. **Comparative Biochemistry and Physiology**, Part A 133, p. 885-892, 2002.

WILLMORE, W.G.; STOREY, K.B., Antioxidant systems and anoxia tolerance in freshwater turtle, *Trachemys scripta elegans*. **Molecular and Cellular Biochemistry**, n.170, p.177–185, 1997a.

WILLMORE, W.G.; STOREY, K.B., Glutathione systems and anoxia tolerance in turtles. **American Journal of Physiology**, 273, p.R219–R225. 1997b.

WYNEKEN, J., The Anatomy of Sea Turtles. **NOAA Technical Memorandum NMFS-SEFSC-470**, US Department of Commerce, Washington, DC., p.172, 2001.

XIA, G.; MARTIN, A.E.; MICHALSKY, M.P.; BESNER, G.E., Heparin-binding EGF-like growth factor preserves crypt cell proliferation and decreases bacterial translocation after intestinal ischemia/reperfusion injury. **Journal of Pediatric Surgery**, v.37 n.7, p.1081, (Discussion), 2002.

XIAO, F.; EPIHIMER, M.J; YOUNG, J.A.; NGUYEN, K.; CARDEN, D.L., Lung neutrophil retention and injury after intestinal ischemia/reperfusion. **Microcirculation**, 4(3), p.359–367, 1997.

YOUNES, M.; MOHR, A.; SCHOENBERG, M.H.; SCHILDBERG, F.W.. Inhibition of lipid peroxidation by superoxide dismutase following regional intestinal ischemia and reperfusion. **Research in Experimental Medicine**, n.187, p.9–17, 1987.

YOUNES, M.; SCHOENBERG, M.H.; JUNG, H.; FREDHOLM, B.B; HAGLUND, U.; SCHILDBERG, F.W, Oxidative tissue damage following regional intestinal ischemia and reperfusion in the cat. **Research in Experimental Medicine**, v.184, n.4, p.259–264, 1984.

ZENTENO-SAVÍN, T., Oxidative stress in marine organisms: a review. In: Johnson, P., Boldyrev, A.A. (Eds.), **Oxidative Stress at Molecular, Cellular and Organ Levels**. Research Signpost, Kerala, India, p.68–76, 2002.