

Efeito *in vitro* de poluentes inorgânicos usados na agricultura sobre a atividade da catalase da alga *Pseudokirchneriella subcapitata*

Silvana Duarte^{1,2}, Nelson Moura Brasil Amaral Sobrinho¹, Cláudio Martín Jonsson² & Lieselotte Jokl³

¹Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Instituto de Agronomia, Laboratório de Ciências do Solo, km 47, Seropédica, Rio de Janeiro, Brasil. silvduarte1962@gmail.com

²Embrapa Meio Ambiente, Laboratório de Biosegurança e Toxicologia, Jaguariúna, Caixa Postal 69 CEP 13820-000, São Paulo, Brasil.

³Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Farmácia, Departamento de Alimentos. Av. Antônio Carlos 6627, CEP 31270-010, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil.

Recebido em 4.V.2011. Aceito em 06.X.2014.

RESUMO – O efeito de poluentes em ecossistemas pode ser verificado pela sua ação sobre os produtores primários, como a alga *Pseudokirchneriella subcapitata* (Korshikov) F. Hindák (Chlorophyceae), que tem ampla distribuição em águas dulcícolas e no solo. O efeito de oito íons metálicos empregados na agricultura (alumínio, cádmio, chumbo, magnésio, manganês, mercúrio, selênio e zinco) sobre a atividade enzimática em *P. subcapitata* foi estudado, usando a catalase como marcador bioquímico. Alumínio, chumbo, mercúrio e zinco foram considerados inibidores e magnésio e manganês como ativadores da ação enzimática. A atividade da catalase na presença de cádmio e selênio não foi alterada. A atividade da catalase pode ser uma ferramenta promissora como biosensor potencial na detecção de poluentes na água e no solo.

Palavras-chave: biosensor, íons metálicos, atividade enzimática

ABSTRACT – *In vitro* effect of inorganic pollutants used in agriculture on the catalase activity of the alga *Pseudokirchneriella subcapitata*. The effect of pollutants in particular ecosystems can be verified by their action on primary producers such as the alga *Pseudokirchneriella subcapitata* (Korshikov) F.Hindák (Chlorophyceae), which is widely distributed in freshwater and in the soil. The effects of eight metallic ions used in agriculture – aluminum, cadmium, lead, magnesium, manganese, mercury, selenium and zinc on the enzymatic activity in *P. subcapitata* were investigated, using catalase as a biochemical marker. Aluminum, lead, mercury and zinc were found to be inhibitors, and magnesium and manganese as activators of the enzymatic action. The catalase activity in the presence of cadmium and selenium did not change. The activity of catalase could be a promising tool as a potential biosensor in the detection of pollutants in freshwater and soil.

Key words: biosensor, metallic ions, enzymatic activity

INTRODUÇÃO

O conceito básico que sustenta o uso de bioindicadores de poluição ambiental se baseia no fato que os distúrbios por metais pesados no meio ambiente levam, inicialmente, à perturbação de uma

reação bioquímica em um determinado organismo (Jimenez & Stegeman 1990).

Uma série de critérios deve ser considerada na escolha do organismo-teste, como: sensibilidade entre as espécies, disponibilidade no ecossistema em estudo, facilidade de manutenção e informação

adequada sobre a espécie em análise. Uma variedade de protocolos com recomendações das espécies a serem utilizadas tem sido desenvolvida por algumas organizações: American Public Health Association, Environmental Protection Agency, American Society for Testing and Material e Organization for Economic Cooperation and Development. No Brasil, procedimentos de testes com organismos aquáticos estão descritos no “Manual de testes para a avaliação de toxicidade de agentes químicos” do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e de Recursos Renováveis (IBAMA 1988) e em Normas Técnicas da Companhia de Tecnologia e Saneamento Ambiental de São Paulo (CETESB 2009). Estas metodologias com diferentes organismos contribuem para a aplicação dos resultados no controle de efluentes tóxicos (Bassoi *et al.* 1990, Gherardi-Goldstein *et al.* 1990).

Pseudokirchneriella subcapitata [= *Raphidocelis subcapitata* (Korshikov) Nygaard, Komarek, J. Kristiansen & O.M. Skulberg] é uma clorofícea colonial planctônica, constituída por células lunadas de ápice pontiagudo (Bicudo & Menezes 2006). Esta espécie também conhecida como *Selenastrum capricornutum* Printz, tem sido amplamente utilizada em estudos de ecotoxicidade de poluentes ambientais (Jonsson & Aoyama 2007, 2010) e recomendada no registro de agentes químicos e de biopesticidas por órgãos nacionais (IBAMA 1988, Jonsson & Maia 1999) e internacionais (OECD 1981, USEPA 1994). Alguns íons metálicos (Al, Cd, Hg, Mg, Mn, Pb, Se, Zn) podem causar estresse oxidativo à alga, pela indução da produção de espécie ativa de oxigênio (EAO) e, conseqüentemente, resultando no descontrole do status redox celular.

A eficiência da enzima antioxidante – catalase – como mecanismo de proteção da célula vem sendo estudada comparativamente, sendo utilizada como bioreceptora em macrófitas (Teisseire *et al.* 1998) e algas como: *Gracilaria tenuistipitata* Chang & Xia (Chang & Xia 1976, Collen *et al.* 2003), *Scenedesmus* sp. (Tripathi *et al.* 2006) e *P. subcapitata* (Jonsson & Aoyama 2010). Como na cinética da enzima não há reversibilidade, suas especificidade e estabilidade possibilitam estimar o componente tóxico em toda parede da célula da alga (Dixon & Webb 1979, Cooper & Hausman 2007). Além disto e de acordo com Jonsson & Aoyama (2007), o teste de ecotoxicidade pode ser expresso como concentração média efetiva (CE50), que consiste em avaliar a concentração efetiva em 50% de inibição ou 50%

de ativação no crescimento da alga. Neste caso, as atividades da catalase são determinadas na presença de várias concentrações de cada metal e comparadas com uma solução controle isenta do íon em estudo.

A maioria dos trabalhos publicados relativos ao efeito de agentes tóxicos sobre a atividade da catalase de algas são relatos de estudos *in vivo* com metais pesados, existindo carência de trabalhos *in vitro* (Assche & Clijsters 1990, Kong & Cheng 1995, Peterson e Stauber 1996, Rai *et al.* 1998, Devriese *et al.* 2001, El Enany & Issa 2001, Fathi 2002, Young & Woung 2003, Jonsson & Aoyama 2007). Para compreender melhor a capacidade da alga ser utilizada como biosensor, avaliou-se *in vitro* o efeito de poluentes inorgânicos usados na agricultura sobre a atividade da catalase de *Pseudokirchneriella subcapitata*.

MATERIAL E MÉTODOS

A *P. subcapitata* em condições de cultivo foi adquirida de culturas axênicas, fornecidas pela CETESB e repicadas em meio líquido de água destilada, preparado como recomendado pela OECD (1981). Em seguida foram colocadas dentro de Erlenmeyers de 250 mL contendo 200 mL de meio esterilizado, que foram selados com tampões de algodão. A alga cresceu em ambiente com temperatura controlada (20 ± 2 °C), sob luz branca fluorescente contínua (3.000-4.000 lux) e os recipientes foram agitados manualmente duas vezes ao dia. A cada 40 dias novas culturas foram preparadas pela inoculação de aproximadamente 5×10^4 células/mL em novo meio de cultura.

Para extrair a catalase da *P. subcapitata* em fase exponencial de crescimento, a alga foi centrifugada (4°C, 4.000 rpm) durante cinco minutos na ultracentrífuga refrigerada Sorval Super T21 (rotor SL 50T: rpm máximo 18.500) e lavada duas vezes com tampão acetato de sódio 0,1 M, pH 5,0 e transferido para béquer de plástico mantido em banho de gelo. O precipitado algal foi re-suspensão em tampão fosfato (1:4 peso/volume). A suspensão passou por sonicação (processador ultra-sônico – Cole Parmer 60), durante 50 segundos, seguido de intervalo de 20 segundos (um ciclo) em amplitude 70%. O processo foi realizado em béquer de plástico em banho de gelo e repetido duas vezes.

As alíquotas do extrato bruto foram acondicionadas na geladeira (20°C). Posteriormente, a cada experimento, as suspensões resultantes dos processos de disrupção celular (sonicador) foram

centrifugadas a 10.000 rpm durante seis minutos. O líquido sobrenadante foi utilizado para avaliar a cinética da atividade da catalase mediante a presença de um poluente inorgânico.

Para avaliar como a estabilidade da catalase de *P. subcapitata* variava em ambientes diferentes, alíquotas dos extratos brutos foram acondicionadas, dentro da geladeira (20 °C), em dois compartimentos distintos: no congelador (-15 °C) e na primeira prateleira (-5 °C). Estes procedimentos foram repetidos em espaços correspondentes a um mês e oito dias, paralelamente aos períodos em que foram realizadas as atividades experimentais.

As soluções estoques dos íons metálicos sob a forma de $Al_2(SO_4)_3$, $CdCl_2$, $HgCl_2$, $MgCl_2 \cdot 6H_2O$, $MnCl_2 \cdot 4H_2O$, $Pb(NO_3)_2$, $NaSeO_3 \cdot 5H_2O$, $ZnSO_4$ (Sardella, 1998) foram preparadas em água Milli-Q. Todos os agentes químicos avaliados como poluentes foram de grau pró análise ou cromatográfico. O descarte das soluções poluentes foi feito em frascos lacrados, devidamente etiquetados. Portanto, os resultados do efeito cinético foram embasados na comparação individual dos poluentes em quatro a seis diferentes concentrações. A porcentagem do efeito foi calculada em relação à atividade da enzima na ausência do poluente, à qual foi atribuída como tendo 100% de atividade.

Os testes de ecotoxicidade utilizando a CE50 consistiram no estabelecimento da concentração de íon metálico que promove a redução ou aumento da atividade da catalase. Para os compostos que apresentaram maior efeito na alteração da atividade enzimática, a CE50 e seu intervalo de confiança (95 %), foram calculados pelos ajustes dos dados, em função das diferentes concentrações do agente químico em estudo.

A determinação da atividade da catalase foi realizada segundo AEBI (1983). Utilizando-se solução de peróxido de hidrogênio como substrato em solução de tampão fosfato (50 mM, pH 7,0), a

reação foi iniciada pela adição do extrato contendo catalase, sendo que a absorbância foi monitorada em vários intervalos no comprimento de onda (240 nm), no espectrofotômetro (Shimadzu UV 1605 PS). Alternativamente, a atividade de catalase foi avaliada pela concentração de substrato remanescente (peróxido de hidrogênio) quantificada pela formação de acetato crômico. Os resultados foram analisados pelos módulos "Simple Regression" contidos no software Statgraphics Plus Version 2. Um valor de $p < 0,05$ foi considerado significativo.

RESULTADOS

Durante um mês e oito dias a estabilidade da atividade de *P. subcapitata* foi constante quando esta foi mantida em temperatura mais baixa. Assim, quando a temperatura foi mais baixa, maior foi a estabilidade da catalase (Fig.1).

Com relação ao efeito inibidor, observou-se que, de modo geral, o aumento da concentração do poluente resultou no incremento da inibição da catalase da *P. subcapitata*. A CE50 foi calculada para cada poluente: mercúrio > chumbo > zinco > alumínio e segue especificada: a) mercúrio - a inibição da catalase apresentou comportamento semelhante à do chumbo, a CE50 foi efetiva em todas as concentrações, resultando em 47,56; b) chumbo - as seis concentrações usadas foram inativadoras da catalase. A CE50 ocorreu nas duas concentrações mais elevadas: 60 mM e 119 mM, sendo estas menores do que 50%, mas estando dentro da faixa de 35,67; c) zinco - seguiu o comportamento de chumbo e mercúrio. A concentração média foi efetiva nas diferentes concentrações analisadas, sendo iguais a 146,49; d) alumínio - atingiu um pico de ativação em 81 mM. Houve tendência a decréscimo da atividade enzimática nas concentrações mais elevadas, quando comparadas ao controle (Tab.1, Fig 2).

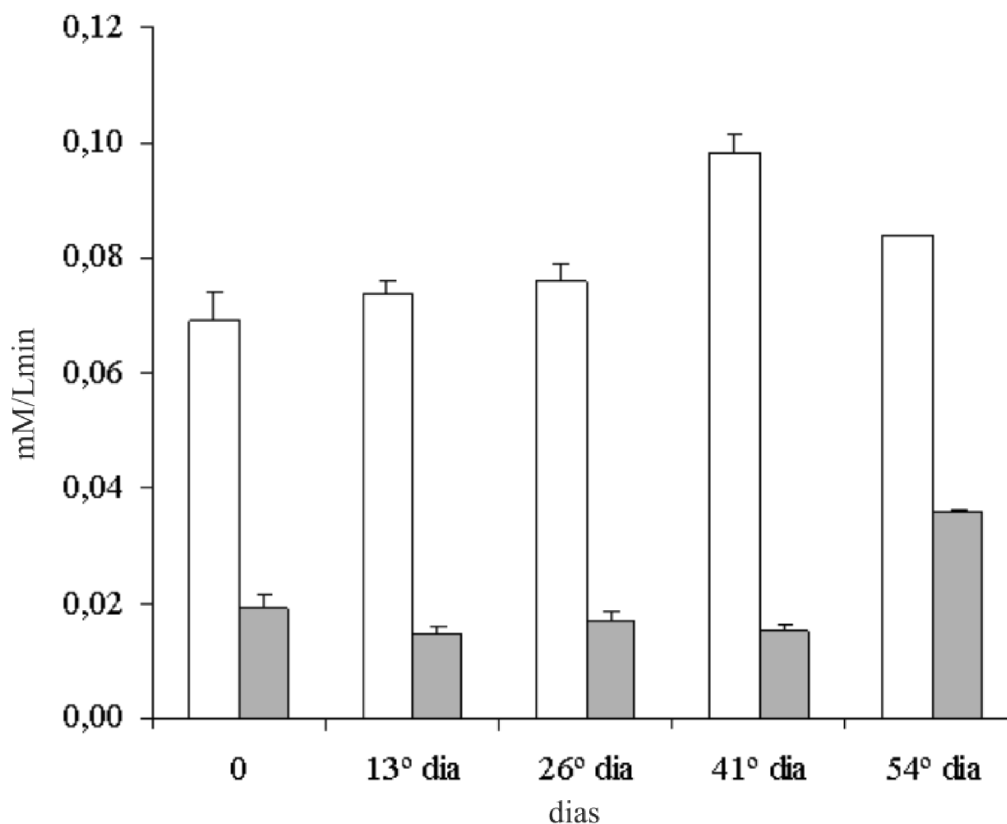


Fig.1. Aliquotas dos extratos de catalase da alga *Pseudokirchneriella subcapitata* foram analisadas periodicamente, durante o armazenamento em dois ambientes distintos dentro da geladeira (-20 oC): no congelador (□-15 oC) e na primeira geladeira (■-5 oC)

Tabela 1. Comportamento cinético da catalase de *Pseudokirchneriella subcapitata* em relação aos poluentes inorgânicos.

Poluentes	Efeito (mM)	CE50	Intervalo de confiança a 95%
Alumínio	Tendência à inibição	--	--
Chumbo	Inibição	35,67	24,8 a 56,21
Mercúrio	Inibição	47,56	27,02 a 77,83
Zinco	Inibição	126,49	99,73 a 182,43
Magnésio	Ativação	43,88	32,24 a 76,12
Manganês	Ativação	113,04	82,60 a 160,90
Cádmio	Tendência à inibição	--	--
Selênio	Tendência à ativação	--	--

Efeito ativador e íons inativos

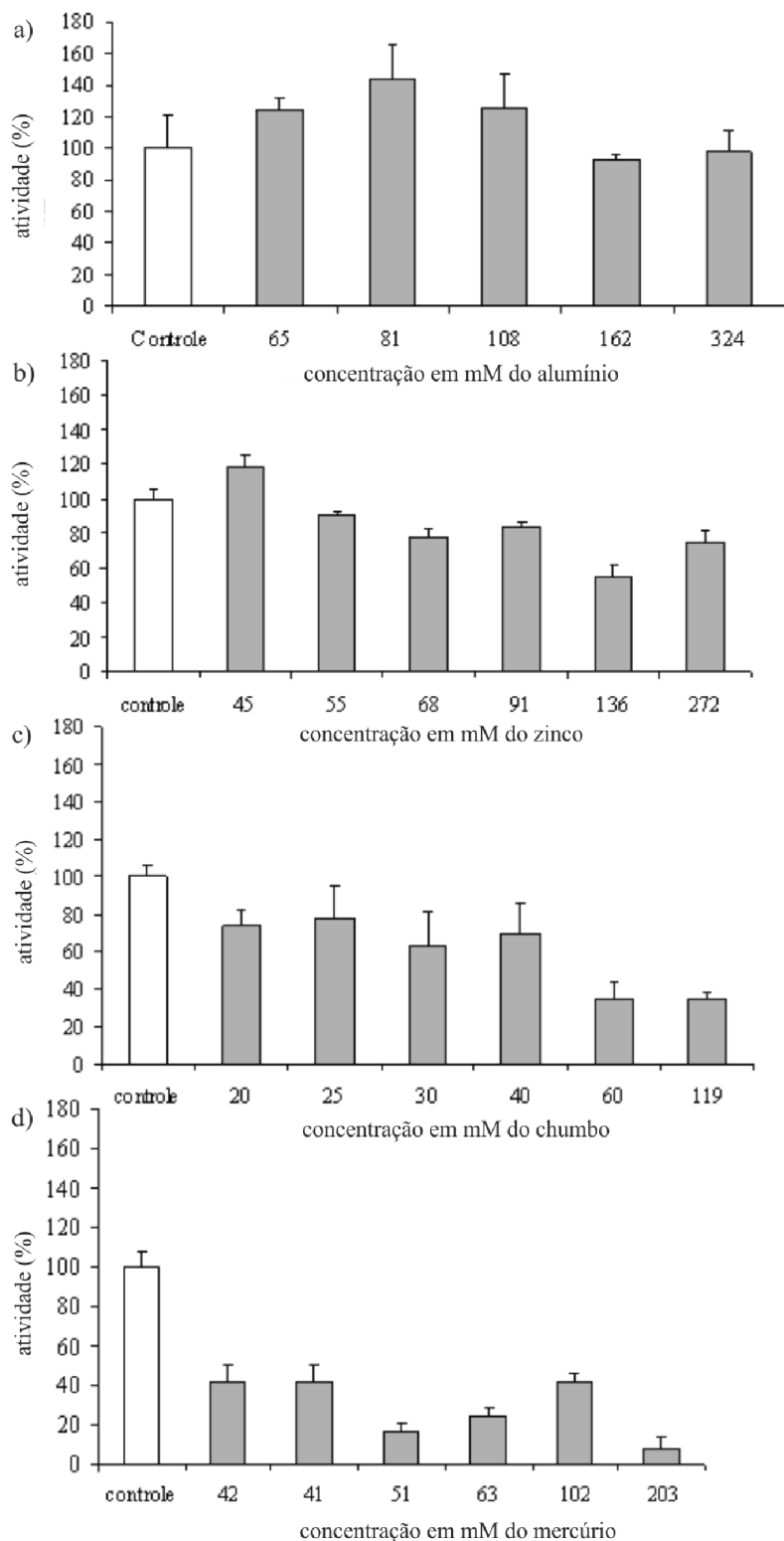
O comportamento cinético da catalase de *P. subcapitata* em relação ao efeito ativador dos íons metálicos estudados seguiu ordem crescente apenas para manganês > magnésio, conforme especificado. Para manganês houve ativação da catalase em todas

as concentrações usadas (120 mM, 165 mM e 330 mM) e CE50 foi de 126,49; para o magnésio quanto maior a concentração, foi mais ativo (30 mM a 49 mM) e CE50 foi de 43,88 (Tab.1, Fig.3).

Cádmio e selênio não apresentaram ativação e ou inibição da atividade da catalase bem definida, porém têm tendência branda a serem ativadores

ou inibidores, respectivamente, em função da concentração do íon metálico. Quando se comparou as seis concentrações usadas do íon metálico cádmio com o controle, constatou-se que ocorreu tanto ativação (169 mM, 675 mM) como inativação (135 mM, 225 mM).

Ao contrário do cádmio, na maioria das concentrações usadas de selênio, a atividade enzimática permaneceu inalterada em relação ao controle. Porém, verificou-se a tendência ativadora nas concentrações de 118 mM e 235 mM (Fig.4).



Figs. 2a-d. Efeito cinético inibidos da catalase de *Pseudokirchneriella subcapitata* na presença de quatro poluentes inorgânicos (a. alumínio; b. zinco; c. chumbo; d. mercúrio). Atividade foi medida considerando o controle como 100%.

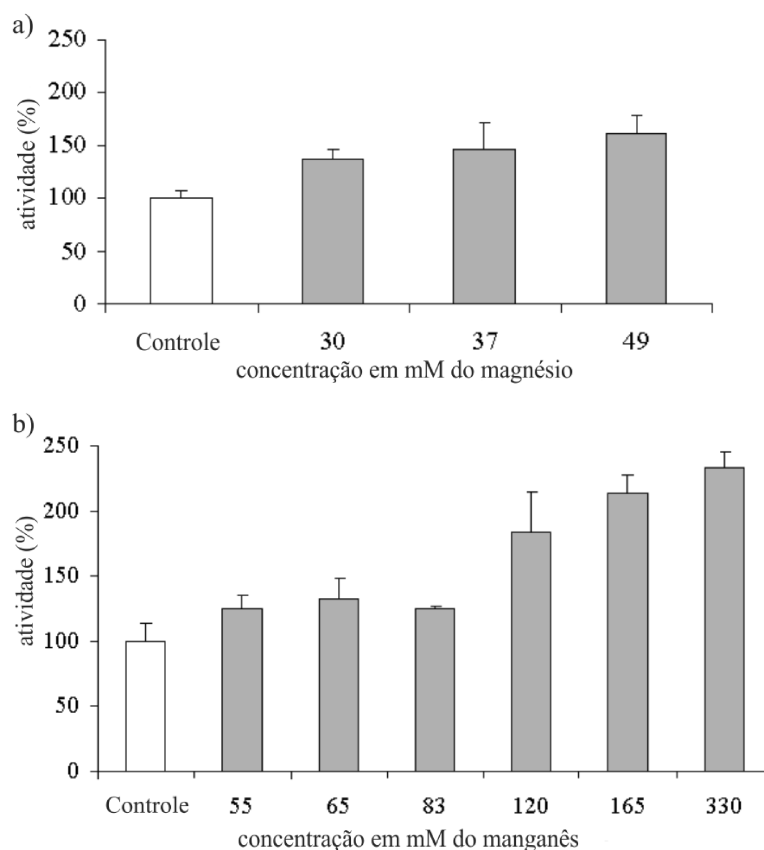


Fig. 3a,b. Efeito cinético ativador da catalase da *Pseudokirchneriella subcapitata* na presença de a. magnésio e b. manganês, respectivamente. A atividade foi medida considerando o controle como 100%.

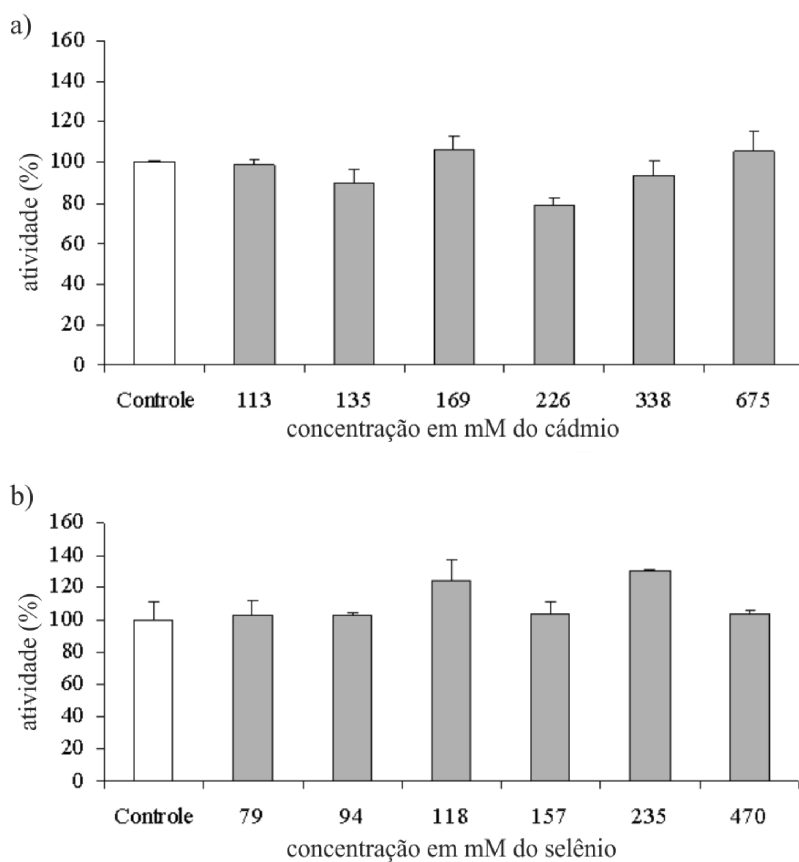


Fig. 4a,b. Efeito cinético ativador da catalase da *Pseudokirchneriella subcapitata* na presença de dois poluentes inorgânicos (cádmio e selênio). A atividade foi medida considerando o controle como 100%.

DISCUSSÃO

O extrato bruto de *P. subcapitata* armazenado em temperatura mais baixa (-15 °C) foi escolhido para realizar os procedimentos experimentais, pois nela a atividade da catalase se manteve estável. De acordo com Lehninger (2006), as enzimas não costumam ser inativadas pelo congelamento, suas reações continuam lentamente, ou talvez cessem por completo a baixa temperatura, porém sua atividade catalítica reaparece quando a temperatura se eleva ao normal. Os peroxissomos das células vegetais (folhas, cloroplastos) contêm a catalase – solúvel em água – que capta o oxigênio e é formado o peróxido de hidrogênio. Este é potencialmente perigoso. Em seguida ele é destruído pela catalase. Esta enzima é, portanto, empregada como característica de identificação do peroxissomo. De acordo com Machado & Soares (2012), a integridade da membrana celular tem sido usada como critério para definição da viabilidade celular em *P. subcapitata*.

O mercúrio promoveu a inibição da atividade da catalase. De acordo com Assche & Clijsters (1990), Peterson & Stauber (1996) e Fathi (2002) o mercúrio inibe várias enzimas em algas distintas.

Todas as seis concentrações do chumbo usadas promoveram a inativação da catalase de *P. subcapitata*. Fathi (2002) demonstrou que o chumbo tem capacidade de inibir várias enzimas em *Scenedesmus bijuca* (Turpin) Lagerheim. Segundo Santos (2005), o excesso de chumbo causa vários sintomas de toxicidade em plantas como: redução de crescimento, clorose e escurecimento do sistema radicular. Ele também inibe a fotossíntese, altera a nutrição mineral e o balanço hídrico, modifica o estado hormonal e afeta a estrutura e a permeabilidade da membrana.

O zinco, assim como chumbo e mercúrio, apresentou efeito inibidor na catalase. Com este íon metálico, a CE50 foi efetiva quando comparada com a do controle. Tripathi (2006) em ensaios de toxicidade crônica com *P. subcapitata* após 96 horas, constatou também que o zinco inibiu o crescimento desta alga. Nas investigações realizadas por demais autores (Assche & Clijsters 1990, Kong & Chen 1995, Omar 2002) o zinco teve capacidade de inibir várias enzimas em algas distintas.

O alumínio inativou a catalase de *P. subcapitata* em maiores concentrações. Constatou-se a inativação do alumínio em algumas enzimas de *Selenastrum capricornutum* (Kong & Chen 1995) *Chlamydomonas reinhardtii*, *Chlorella vulgaris* Beyerinck [Beijerinck] (Rai *et al.* 1998). Também

as alterações bioquímicas e fisiológicas na planta devido à ação do alumínio têm sido observadas por Assche & Clijsters (1990) nas membranas das células da raiz, na inibição da síntese de DNA e divisão celular, na inibição de alongamento celular, nas alterações da absorção de nutrientes, no balanço nutricional e no efeito sobre a simbiose rizóbio/leguminosa. Os mecanismos de tolerância da alga pelo alumínio se resumem basicamente em duas situações: a) os que agem no sentido de expulsar o íon metálico depois de absorvido ou de impedir sua entrada pela raiz da planta; b) os de desintoxicação, ao complexar o alumínio em organelas específicas da planta, principalmente os vacúolos (Rai *et al.* 1998, Kong & Chen 1995).

A contrário do zinco o magnésio, quando comparado com o controle, ativou a catalase de *P. subcapitata* em ordem crescente. De acordo com Yang *et al.* (2006), a suplementação de magnésio via foliar em presença de fósforo acelera consideravelmente a translocação dos nutrientes.

No presente caso, constatou-se que o manganês foi ativador nas seis concentrações estudadas. Também El Enany & Issa (2001) já haviam observado que o manganês agia como ativador da peroxidase de *Scenedesmus armatus* (R.Chodat) R.Chodat. Segundo Vidotti & Rollemberg (2004), em revisão sobre a absorção do manganês nas plantas, havia amplas evidências de que a mesma é controlada metabolicamente.

Considerando o ajuste das percentagens, há uma tendência de inativação da catalase pelo cádmio nas concentrações mais elevadas estudadas. O cádmio inativou diferentes enzimas das algas *Dunaliella tertiolecta* Butcher (Peterson & Stauber 1996) *Chlamydomonas reinhardtii* Dangeard (Devriese *et al.* 2001) *Nannochloropsis oculata* (Droop) D.J.Hibberd (Young & Woung 2003) *Euglena gracilis* Klebs (Assche & Clijsters 1990). Porém, em *Scenedesmus armatus* ele ativou a catalase (El Enany & Issa 2001)

O selênio não promoveu alteração da atividade da catalase em qualquer uma das concentrações usadas se comparadas com o controle, não apresentando CE50. Este elemento químico é essencial às plantas, sendo um antioxidante e componente da enzima glutatona peroxidase que neutraliza o hidroperóxido e os radicais livres de oxigênio produzidos dentro das células (Chan & Sung 2001, Obata *et al.* 2004).

A sensibilidade bioquímica a poluentes inorgânicos usados na agricultura foi detectada em várias faixas de concentração, tendo a catalase como

biosensor. A alga *P. subcapitata* é multireceptora podendo ser uma ferramenta para desenvolver sistemas de sensores de maneira analítica, direcionados à melhoria da qualidade de produtos de representativas cadeias do agronegócio e para avaliar impactos ambientais no sistema água-solo-planta.

AGRADECIMENTOS

Este trabalho foi realizado com apoio e financiamento do Programa de Aceleração de Crescimento. Agradecemos à Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro pela concessão de Bolsa de pesquisa. Ao Dr. Marcelo Porto Bemquerer, pesquisador da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Brasília, à doutoranda Darlene Denise Dantzger e à Dra. Elizabeth Biagioni Prestes pelo apoio e incentivo. À Dra. Vera Castro e da técnica Neusa Domingues pela supervisão do trabalho.

REFERÊNCIAS

- Aebi, H.E. 1983. Catalase. *In* Methods of Enzymatic Analysis (H. U. Bergmeyer & M. Bergmeyer eds.). Verlag Chemie, Weinheim, Germany, p 1- 46.
- Assche, F. & Clijsters, H. 1990. Effect of metals on enzyme activity in plants. *Plant Cell & Environmental* 13(3):195-206.
- Basso, L.J., Nieto, R. & Tremaroli, D. 1990. Implementação de testes de toxicidade para o controle de efluentes líquidos. Companhia de Tecnologia e Saneamento Ambiental do Estado de São Paulo. Série Manuais, Secretaria do Meio Ambiente. 7 p.
- Bicudo, C.E.M. & Menezes, M. 2006. Gêneros de Algas de Águas Continentais do Brasil - chave para identificação e descrições. Rima editora, São Carlos, São Paulo. 475 p.
- CETESB-Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental de São Paulo 2009. Disponível em: <https://www.cetesb.sp.gov.br>. Acessado em 02.08.2009.
- Chan, C.C. & Sung, J.M. 2001. Priming bitter gourd seeds with selenium solution enhances germinability and antioxidative responses under sub-optimal temperature. *Physiologia Plantarum* 111(1):9-16.
- Chang, C.F. & Xia, B.M. 1976. Studies on chenese species of Gracilaria. *Marine Studies Singapore* 12:91-163.
- Collen, J., Pinto, E., Petersen, M. & Colepicolo, P. 2003. Induction of oxidative stress in the red macroalga *Gracilaria tenuistipitata* by pollutant metals. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 45(3):337-342.
- Cooper, G.M. & Hausmann, R.E. 2007. A célula – uma abordagem molecular. Editora Artmed, São Paulo. 736 p.
- Dixon, M. & Webb, E.C. 1979. *Enzymes*. Longmans Green, London. 1116 p.
- Devriese, M., Tsakaloudi, V., Garbayo, I., Leon, R., Vilchez, C. & Vigar, J. 2001. Effect of heavy metals on nitrate assimilation in the eukaryotic microalga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiology and Biochemistry* 39(5):443-448.
- El Enany, A.E. & Issa, A.A. 2001. Proline alleviates heavy metal stress in *Scenedesmus armatus*. *Folia Microbiologica* 46(3):227-230.
- Fathi, A. A. 2002. Toxicological response of the green algae *Scenedesmus bijuga* to mercury and lead. *Folia Microbiologica* 47(6):667-671.
- Gherardi-Goldstein, E., Bertolotti, E., Zagatto, P.A., Araújo, R.P.A. & Ramos, M.L.L.C. 1990. Procedimentos para a utilização de testes de toxicidade no controle de efluentes líquidos. São Paulo, Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental. Série Manuais, Secretaria do Meio Ambiente. 17 p.
- IBAMA – Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Renováveis. 1988. Manual de testes para a avaliação da ecotoxicidade de agentes químicos. Secretaria de Meio Ambiente. Brasília. 351 p.
- Jimenez, B.D. & Stegman, J.J. 1990. Desotoxification enzymes as indicators of environmental stress on fish. *In*: Adams, S.M. (Ed). *Biological indicators of stress in fish*. American Fisheries Society Symposium 8:67-79.
- Jonsson, C.M. & Maia, A.H.N. 1999. Protocolo de avaliação de agentes microbianos de controle biológico de pragas para registro como biopesticidas. III. Testes de organismos não alvo do ambiente aquático. Embrapa Meio Ambiente. Série Documentos. 33 p.
- Jonsson, C.M. & Aoyama, H. 2007. *In vitro* effect of agriculture pollutants and their joint action on *Pseudokirchneriella subcapitata* acid phosphatase. *Chemosphere* 69(6):849-855.
- Jonsson, C.M. & Aoyama, H. 2010. Effect of copper on the activation of the acid phosphatase from the green algae *Pseudokirchneriella subcapitata*. *BioMetals* 23(1):93-98.
- Kong, F.X. & Chen, Y. 1995. Effect of aluminium and zinc on enzyme activities in the green alga *Selenastrum capricornutum*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 55(5):759-765.
- Lehninger, A.L. 2006. *Princípios de bioquímica*. Editora Savier, Osasco. 930 p.
- Machado, M. & Soares, E. 2012. Development of a short-term assay based on the evaluation of the plasma membrane integrity of the alga *Pseudochirchneriella subcapitata*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 95(4):1035-1043.
- Obata, T., Araie, H. & Shiraiwa, Y. 2004. Bioconcentration mechanism of selenium by Caccolithophosid, *Emiliana huxleyi*. *Plant and Cell Physiology* 45(10):1434-1440.
- OECD - Organization for Economic Cooperation and Development 1981. *Guidelines for Testing of Chemicals. Acute immobilization test and reproduction test*. Paris, 202 p.

- Omar, H.H. 2002. Bioremoval of zinc ions by *Scenedesmus obliquus* an *Scenedesmus quadricaudata* and its effect on growth metabolism. International Biodeterioration and Biodegradation 50(2):95-100.
- Peterson, S.M. & Stauber, J.L. 1996. New algal enzyme bioassay for the rapid assesment of aquatic toxicity. Bulletin of Environmental Contamination of Toxicology 56(5):750-775.
- Rai, L.C., Husaini, Y. & Mallick, N. 1998. pH altered the interaction of aluminum and fluoride on nutrient uptake, photosynthesis and other variables of *Chlorella vulgaris*. Aquatic Toxicology 42(1):67-84.
- Santos, F.S. 2005. Remediação da contaminação com metais pesados provenientes da disposição de resíduos perigosos da produção de zinco. Tese 95 f., Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica.
- Teisseire, H., Couderchet, M. & Vernet, G., 1998. Toxic responses and catalase activity of *Lemna minor* L. exposed to folpet, copper, and their combination. Ecotoxicology and Environmental Safety 40(3):194-200.
- Tripathi, B.N., Mehta, S.K., Amar, A. & Gaur, J.P. 2006. Oxidative stress in *Scenedesmus* sp during short- and long-term exposure to Cu²⁺ and Zn²⁺. Chemosphere 62(4):538-544.
- USEPA-US. 1994. 96-hour static toxicity test using *Selenastrum capricornutum*. Environmental Protection Agency SOP#:2027. 5p.
- Vidotti, E.C. & Rollemberg, M.C.E. 2004. Algas: da economia nos ambientes aquáticos à bioremediação e à química analítica. Química Nova 27(1):139-145.
- Yang, Y., Wu, Z., Chan, Y., Qião, J., Gao, M., Yuan, J., Nie, W. & Guo, Y. 2006. Magnesium deficiency enhances hydrogen peroxide production and oxidative damage in chick embryo hepatocyte *in vitro*. BioMetals 19(1):71-81.
- Young, L. M. & Woung, S.H. 2003. Cadmium – induced changes in antioxidant enzymes from the marine alga *Nannochloropsis oculata*. Journal of Applied Phycology 15(1):13-19.

