Alexandre Souza dos Santos

**Respostas fisiológicas e variações histoquímicas da
macroalga vermelha *Bostrychia radicans* (Montagne)
Montagne: efeitos do cádmio.**

Physiological responses and histochemical changes in
the red macroalga *Bostrychia radicans* (Montagne)
Montagne: cadmium effects.

São Paulo

2016

Alexandre Souza dos Santos

**Respostas fisiológicas e variações histoquímicas da
macroalga vermelha *Bostrychia radicans* (Montagne)
Montagne: efeitos do cádmio.**

Dissertação apresentada ao Instituto de
Biociências da Universidade de São
Paulo, para obtenção de título de
Mestrado em Ciências na área de
Botânica.

Orientadora: Fanly Fungyi Chow Ho

Versão Corrigida

Versão original encontra-se disponível no Instituto
de Biociências da USP.

São Paulo

2016

Ficha catalográfica

Santos, A. S. dos
Respostas fisiológicas e variações histoquímicas da
macroalga vermelha *Bostrychia radicans* (Montagne)
Montagne: efeitos do cádmio.
Alexandre Souza dos Santos. São Paulo: A. S. Santos,
2016. 90p

Dissertação (Mestrado) – Instituto de Biociências da
Universidade de São Paulo. Departamento de Botânica,
2016.

1. Metais pesados, 2. Cádmio, 3. Ecotoxicologia,
4. *Bostrychia radicans*, 5. Bioindicador.
Universidade de São Paulo. Instituto de Biociências.
Departamento de Botânica.

Comissão julgadora:

Prof (a). Dr(a).

Prof (a). Dr(a).

Prof (a). Dr(a). Fanly Fungyi Chow Ho
(Orientadora)

Aos meus familiares,
principalmente aos meus pais, Carlos e Jacira
e meus irmãos Danilo e Flavio.
Obrigado por estarem sempre me apoiando
dando conforto e segurança.

Só existem dois dias no ano que nada pode ser feito.
Um se chama ontem e o outro se chama amanhã,
portanto, hoje é o dia certo para amar,
acreditar, fazer e principalmente viver.

Tenzin Gyatso-Dalai Lama

Agradecimentos

Aos meus pais, Jacira Mara e Carlos Roberto, pelo carinho, apoio nesta minha caminhada. Não sei o que seria sem vocês. Amo muito vocês.

Aos meus irmãos, Danilo e Flavio, pela amizade e companheirismo e a todos os meus familiares.

Ao CNPq pela bolsa de pesquisa que me permitiu ter dedicação exclusiva neste trabalho e ao Biota/Fapesp pelo Auxílio à Pesquisa que possibilitou o desenvolvimento deste projeto.

À Profa. Fungyi Chow pela sua orientação por ter confiado em mim. Obrigado pela oportunidade, ensinamentos, dedicação, amizade e muita paciência.

À Flavia Ramoneda, pelo companheirismo, carinho, paciência e incentivo. Muito obrigado por tudo mesmo. Te amooo!

À Thais Merida e Valdir Ramoneda, pela atenção e milhares de conselhos. Muito obrigado.

Às Profas. Flávia Zanotto, Valeria Cassano e Mariana Cabral, pela contribuição no meu exame de qualificação com sugestões para realização deste trabalho.

Aos professores do LAM, Estela, Flavio, Mariana, Suzana e Valeria. Muito obrigado por tudo.

Aos técnicos, André Nakasato, Rosário Petti e William Oliveira por todo o auxílio. Muito obrigado!

À, Cintia Iha e Karoline Magalhães pelas contribuições com as análises moleculares. E ao Gabriel (UFBA) e Ellen (Univali), pela companhia no sofrimento nessa vida das análises moleculares. Valeuuuu.

Aos companheiros do LAM André Faria, Beatriz Torrano, Bruno Lenhaverde, Cíntia Iha, Carolina Azevedo, Carolina Franco (minha 2º mestra de yoga) Fabiana Marchi, Fábio Nauer, Fernando Sena, Gabi Lourenço, Karoline Magalhães, Lygia Ayres, Mariana Sousa, Mariana Mungiolli, Mário Machado, Naome Towata, Nuno Tavares, Sabrina Golçalves, Talita Vieira, e em especial, Allyson Nardelli, Ana Maria

Amorim, Janaína Pires, Luz Karime Polo (Chatinha), Rennan Henrique, Tallisa Harb (Ivete) e Vanessa Urrea por todos os momentos de conversas, reuniões, desabafos, desesperos, ajudas e risadas. Valeu Galera.

À todo o apoio e colaboração nas análises de microscopias realizados na Universidade Federal de Santa Catarina.-UFSC. Obrigado Profa. Dra. Zenilda Bouzon, Dr. Éder, Dra. Carmem, Débora e Marianne.

Agradecer a colaboração do Prof. Dr. Paulo Sergio Cardoso da Silva do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares da USP (IPEN-USP) com a colaboração nas análises de bioabsorção. Muito obrigado.

Aos Professores da UNISANTA: André Faccini, Mara Magenta e Paulo Sampaio, por me ensinar a amar esse fascinante mundo da Botânica.

Aos amigos de coleta: Wellington Pinheiro dos Santos Silva (Ganso) pela companhia e empréstimo dos caiaques (melhor meio de transporte nos manguezais), Thiago (Tita) irmão para toda hora kkk, Flavia Ramoneda, Thais Merida, Jafa e Barreto. Muito obrigado, sem vocês pode ter certeza que a coleta seria muito mais difícil.

À todos que participaram do “Trilha sub 2015”. Valeuuu

Aos companheiros de moradias “REP.dos artistas”: Alex, Aninha (neguinha), Elizabeth, Eloah, Fernando, Gustavo, Ismael, Leo e Ranulfo, “CRUSP”-Ju Tomaz, Jéssica Leal, Michel Rocha, Fernanda, Rosangela e Thiago. Com vocês viver em São Paulo se tornou muito agradável. Muito obrigado amigos

À Universidade de São Paulo e a todos os funcionários do Instituto de Biociências pela infraestrutura necessária para o melhor desempenho deste estudo.

Por fim, a todos os seres que contribuíram direta ou indiretamente com esta obra.

Índice

1	Introdução Geral	1
1.1	Manguezais: o gênero <i>Bostrychia</i>	1
1.2	Polo industrial de Cubatão	4
1.3	Poluição de metais em sistemas aquáticos: cádmio	5
1.4	Absorção de cádmio e efeito nas macroalgas	7
2	Justificativa	12
3	Objetivos	12
4	Materiais e Métodos	13
4.1	Coleta do material biológico	13
4.2	Identificação taxonômica por biologia molecular	15
4.3	Delineamento experimental	17
4.4	Bioabsorção de cádmio	18
4.5	Taxa de crescimento	19
4.6	Desempenho fotossintetizante	19
4.7	Pigmentos fotossintetizantes e proteínas solúveis totais	20
4.8	Potencial antioxidante	21
4.9	Processamento para análise em microscopia de luz (ML)	23
4.10	Análises estatísticas	24
5	Referências	26
6	Anexos	32
6.1	Anexo I: Cultivo em laboratório de <i>B. radicans</i>	32
6.2	Anexo II: Adaptação do protocolo de pigmentos para microplaca de 96 poços	34
7	Estudos sobre o desempenho fisiológico de <i>Bostrychia radicans</i> (Montagne)	
	Montagne sob o efeito de cádmio: crescimento, fotossíntese, pigmentos e proteínas	37
7.1	Resumo	37
7.2	Abstract	38
7.3	Introdução	39
7.4	Material e métodos	40
7.5	Resultados	42
7.5.1	Identificação taxonômica por biologia molecular	42
7.5.2	Taxa de crescimento (TC)	43
7.5.3	Desempenho fotossintetizante	46
7.5.4	Pigmentos e proteínas totais	51
7.5.5	Análise de componentes principais (PCA)	53
7.6	Discussão	55
7.7	Referências	56
7.8	Anexo – Dados complementares da análise de componentes principais (PCA).	59
8	Bioabsorção, potencial antioxidante e organização celular de <i>Bostrychia radicans</i>	
	(Montagne) Montagne sob condições variáveis de cádmio.	61
8.1	Resumo	61
8.2	Abstract	62
8.3	Introdução	63
8.4	Material e métodos	65
8.4.1	Coleta e cultivo	65
8.4.2	Bioabsorção de cádmio	65

8.4.3	Potencial antioxidante.....	66
8.4.4	Microscopia de luz (ML)	66
8.4.5	Análise dos dados	67
8.5	Resultados	68
8.5.1	Bioabsorção de cádmio	68
8.5.2	Potencial antioxidante: percentual de atividade	68
8.5.3	Potencial antioxidante: equivalente padrão.....	71
8.5.4	Potencial antioxidante: EC50	73
8.5.5	Microscopia de luz.....	76
8.5.6	Análise de componentes principais (PCA)	81
8.6	Discussão.....	82
8.7	Referências	85
8.8	Anexo - Dados complementares de análise histoquímica de azul brilhante de Coomassie (CCB) e análise de componentes principais (PCA)	88
8.8.1	Anexo II- Autovalores dos componentes, coeficiente de correlação de Pearson e probabilidades da análise dos componentes principais (PCA).	89
9	Considerações finais.....	90

Lista de figuras

Figura 1: Aspecto geral de <i>Bostrychia radicans</i> (Montagne) Montagne.....	3
Figura 2: Modelo de absorção de Cd pela célula vegetal. Cd⁺ (íons de cádmio), PR (proteínas), ZIP (transportador de íons de Zn/Fe), PO (polissacarídeos), TP (transportador passivo, GF (grupos fosfato), BC (bomba de cálcio), E. AOX (enzimas antioxidantes), C.AOX (compostos antioxidantes), ABC (carreadores de ligação ao ATP), CAX (carreador de prótons), MTP (proteína tolerante a metais).....	9
Figura 3: Visão geral do Rio Una e o ponto de coleta (P1) na.....	14
Figura 4: Visão geral do Município de Cubatão e o ponto de coleta (P2) no	14
Figura 5: Exsicatas depositadas no Herbário do Instituto de Biociências SPF. (A) SPF57887 do Município de Peruíbe, local não impactado e (B) SPF57888 do Município de Cubatão, local impactado.....	15
Figura 6: Árvore filogenética molecular construída pelo método da máxima verossimilhança para o marcador molecular rbcL. A porcentagem da taxa de grupos associados é mostrada ao lado dos ramos da árvore. A árvore foi desenhada em escala, com comprimentos dos ramos medidos com base no número de substituições por sítio. Os dados em vermelho representam às sequências obtidas pela espécie-alvo do presente estudo.	43
Figura 7 Taxa de crescimento (%.dia ⁻¹) ao longo dos 11 dias de experimento, calculadas em relação à concentração controle (0 mg.mL ⁻¹) para (A) algas do local não impactado e (B) algas do local impactado submetidas a diferentes concentrações de Cd: 6, 12, 18, 37 e 55 mg.mL ⁻¹ . Os valores representam média ± desvio padrão (n = 5). Letras distintas representam diferenças significativas (p < 0,05).....	45
Figura 8 Taxa de crescimento (%.dia ⁻¹) ao longo dos 11 dias de experimento, calculadas em relação à concentração controle (0 mg.mL ⁻¹) para algas do local não impactado e algas do local impactado submetidas a diferentes concentrações de Cd: (A) 6 mg.mL ⁻¹ , (B) 12 mg.mL ⁻¹ , (C) 18 mg.mL ⁻¹ , (D) 37 mg.mL ⁻¹ e (E) 55 mg.mL ⁻¹ . Os valores representam média ± desvio padrão (n = 5). Letras distintas representam diferenças significativas (p < 0,05).....	46
Figura 9 Rendimento quântico máximo (Fv/Fm) ao longo dos 11 dias de experimento para (A) algas do local não impactado e (B) algas do local impactado submetidas a diferentes concentrações de Cd: 0, 6, 12, 18, 37 e 55 mg.L ⁻¹ . Os valores representam média ± desvio padrão (n = 5). Letras distintas representam diferenças significativas (p < 0,05).	47
Figura 10: Rendimento quântico máximo (Fv/Fm) ao longo dos 11 dias de experimento para algas do local não impactado e algas do local impactado submetidas a diferentes concentrações de Cd: (A) 6 mg.L ⁻¹ , (B) 12 mg.L ⁻¹ , (C) 18 mg.L ⁻¹ , (D) 37 mg.L ⁻¹ e (E) 55 mg.L ⁻¹ . Em cada um dos gráficos foi incluída a concentração de 0 mg Cd.L ⁻¹ (concentração controle). Os valores representam média ± desvio padrão (n = 5). Letras distintas representam diferenças significativas (p < 0,05).	48
Figura 11: Curva P-I de transporte de elétrons (ETR) versus PAR após três dias de experimento para algas do (A) local não impactado e (B) local impactado submetidas a	

diferentes concentrações de Cd: 0, 6, 12, 18, 37 e 55 mg.L ⁻¹ , e os respectivos valores de área sob a curva para algas do (C) local não impactado e (D) local impactado.....	49
Figura 12: A) Taxa máxima de transporte de elétrons (ETR _{máx}), (B) eficiência fotossintetizante (alfa) e (C) saturação luminosa (I _k) de <i>Bostrychia radicans</i> no período de três dias de experimento nas concentrações de 0, 6, 12, 18, 37 e 55 mg.L ⁻¹ Cd, para os locais não impactado e impactado.....	50
Figura 13: Conteúdo pigmentar de <i>Bostrychia radicans</i> após 11 dias de experimento para algas submetidas a diferentes concentrações de Cd: 0, 6, 12, 18, 37 e 55 mg.L ⁻¹ para o local não impactado (A) ficoeritrina, (C) ficocianina, (E) aloficocianina, (G) clorofila a e (I) carotenoides e para o local impactado (B) ficoeritrina, (D) ficocianina, (F) aloficocianina, (H) clorofila a e (J) carotenoides. Em cada um dos gráficos foi inclusa o teor do respectivo pigmento antes de iniciar o experimento (Inicial). Os valores representam média ± desvio padrão (n = 5). Letras distintas representam diferenças significativas (p < 0,05).....	52
Figura 14: Conteúdo de proteína solúveis totais de <i>Bostrychia radicans</i> após 11 dias de experimento para algas do local não impactado e algas do local impactado submetidas a diferentes concentrações de Cd: 0, 6, 12, 18, 37 e 55 mg.L ⁻¹ . Os valores representam média ± desvio padrão (n = 5). Letras distintas representam diferenças significativas (p < 0,05).	53
Figura 15: Ordenação biplot dos componentes 1 e 2 de <i>B. radicans</i> para os locais não impactado (NI) e impactado (I) nos diferentes tratamentos de concentração de Cd (0, 6, 18, 37 e 55 mg.L ⁻¹) em função das variáveis métricas de Carot (carotenoides), chl a (clorofila a), ALO (aloficocianina), FE (ficoeritrina), FC (ficocianina), ETR (área), Fv/Fm (rendimento quântico máximo) e TC (taxa de crescimento). A PCA identifica quatro agrupamentos: um grupo isolado do tratamento I-0 (em vermelho), outro grupo isolado do tratamento I-55 (em marrom), um agrupamento incluindo I-6, NI-0 e I-12 (em laranja) e um grande agrupamento incluindo NI-6, NI-12, NI-18, I-18, I-37, NI-37 e NI-55 (em azul).....	54
Figura 16: Dendrograma obtido da análise de agrupamento hierárquico de <i>B. radicans</i> utilizando os locais não impactado (NI) e impactado (I) nos diferentes tratamentos de concentração de Cd (0, 6, 18, 37 e 55 mg.L ⁻¹).	55
Figura 17: Porcentagem de atividade antioxidante para os ensaios (A) DPPH, (B) ABTS, (C) Folin-Ciocalteu, (D) Quelante e (E) FRAP testados nas concentrações de 6, 8, 10, 12 e 13,3 mg.mL ⁻¹ de extrato bruto para algas de local não impactado e impactado submetidas a diferentes concentrações de Cd: 0, 6, 12, 18, 37 e 55 mg.L ⁻¹ . Os valores representam média ± desvio padrão (n = 5). Letras distintas representam diferenças significativas entre os locais e entre os tratamentos (p < 0,05). Para cada local e ensaio é representado o ajuste polinomial e o coeficiente de regressão (R ²).	70
Figura 18: Potencial antioxidante expresso em equivalentes de ácido gálico (EAG) e equivalentes Trolox (ET) para os ensaios (A) DPPH, (B) ABTS, (C) Folin-Ciocalteu, (D) Quelante e (E) FRAP calculados para a concentração de 6 mg.mL ⁻¹ de extrato bruto para algas do local não impactado e impactado submetidas a diferentes concentrações de Cd: 0, 6, 12, 18, 37 e 55 mg.L ⁻¹ . Os valores representam média ± desvio padrão (n = 5). Letras distintas representam diferenças significativas entre os locais e entre os tratamentos (p < 0,05).	72
Figura 19: Seções longitudinais de <i>B. radicans</i> do local não impactado, coradas com azul de toluidina (AT-O) submetidas a diferentes concentrações de Cd: (A) Ambiente,	

amostra controle que representa a condição da alga antes de ser submetida ao experimento, (B) 0 mg.L ⁻¹ (tratamento controle), (C) 6 mg.L ⁻¹ , (D) 12 mg.L ⁻¹ , (E) 18 mg.L ⁻¹ , (F) 37 mg.L ⁻¹ e (G) 55 mg.L ⁻¹ . cc = células corticais, cw = parede celular.	79
Figura 20: Seções longitudinais de <i>B. radicans</i> do local não impactado, coradas com azul de toluidina (AT-O) submetidas a diferentes concentrações de Cd: (A) Ambiente, amostra controle que representa a condição da alga antes de ser submetida ao experimento, (B) 0 mg.L ⁻¹ (tratamento controle), (C) 6 mg.L ⁻¹ , (D) 12 mg.L ⁻¹ , (E) 18 mg.L ⁻¹ , (F) 37 mg.L ⁻¹ e (G) 55 mg.L ⁻¹ . cc = células corticais, cw = parede celular.	80
Figura 21: Ordenação biplot dos componentes 1 e 2 de <i>B. radicans</i> para os locais não impactado (NI) e impactado (I) nos diferentes tratamentos de concentração de Cd (0, 6, 18, 37 e 55 mg.L ⁻¹) em função das variáveis métricas de bioabsorção de Cd e atividade antioxidante (DPPH, ABTS, Folin, Quelante e FRAP).	82
Figura A1: Exemplar de <i>Bostrychia radicans</i> (Montagne) Montagne.	32
Figura A2: Espectro de absorbância padronizado por massa de alga fresca nos comprimentos de onda de 400 a 700 nm. A amostra Cubeta representa a cubeta de quartzo com volume de 1 mL de amostra e percurso óptico de 1 cm, a amostra Elisa corresponde à microplaca de 96 poços e volume de 400 µL de amostra.	35
Figura A3: Seções longitudinais de <i>B. radicans</i> do local não impactado, coradas com azul brilhante de Coomassie (CCB) submetidas a diferentes concentrações de Cd: (A) Ambiente, amostra controle que representa a condição da alga antes de ser submetida ao experimento, (B) 0 mg.L ⁻¹ (tratamento controle), (C) 6 mg.L ⁻¹ , (D) 12 mg.L ⁻¹ , (E) 18 mg.L ⁻¹ , (F) 37 mg.L ⁻¹ e (G) 55 mg.L ⁻¹	88
Figura A4: Seções longitudinais de <i>B. radicans</i> do local impactado, coradas com azul brilhante de Coomassie (CCB) submetidas a diferentes concentrações de Cd: (A) Ambiente, amostra controle que representa a condição da alga antes de ser submetida ao experimento, (B) 0 mg.L ⁻¹ (tratamento controle), (C) 6 mg.L ⁻¹ , (D) 12 mg.L ⁻¹ , (E) 18 mg.L ⁻¹ , (F) 37 mg.L ⁻¹ e (G) 55 mg.L ⁻¹	88

Lista de tabelas

Tabela 1: Iniciadores para a subunidade grande (rbcL) para a PCR e sequência para os diferentes marcadores moleculares usados no presente estudo.	16
Tabela 2: Relação das concentrações dos padrões ácido gálico e Trolox (expressa em massa) para cada um dos ensaios antioxidantes com sua respectiva equação da reta e coeficiente de regressão (R^2).	67
Tabela 3: Percentual de bioabsorção de cádmio de algas de local não impactado e impactado submetidas a diferentes concentrações de Cd: 0, 6, 12, 18, 37 e 55 mg.mL ⁻¹ . Os valores representam média $\pm$ desvio padrão (n = 5). Letras distintas representam diferenças significativas entre os locais e entre os tratamentos ($p < 0,05$).	68
Tabela 4: Valores de EC50 (mg.mL ⁻¹) para os ensaios DPPH, ABTS, Folin-Ciocalteu, Quelante e FRAP calculados para algas de local não impactado (Não imp.) e impactado (Imp.), submetidas a diferentes concentrações de Cd: 0, 6, 12, 18, 37 e 55 mg.L ⁻¹ . Os valores em porcentagem representam tratamentos nos quais não foi possível calcular o EC50, visto que as curvas de dose-resposta atingiram valores percentuais menores do que 50%.	75
Tabela A1: Autovalores para os componentes da análise de componentes principais (PCA).	59
Tabela A2: Probabilidades ($p < 0,05$; em vermelho) e coeficientes de correlação de Pearson (r; em preto) da análise de componentes principais (PCA) para os diferentes parâmetros estudados. As probabilidades destacadas em negrito indicam significância estatística ($p < 0,05$).	59
Tabela A3: Autovalores para os componentes da análise de componentes principais (PCA).	89
Tabela A4: Probabilidades ($p < 0,05$; em vermelho) e coeficientes de correlação de Pearson (r; em preto) da análise de componentes principais (PCA) para os diferentes parâmetros estudados. As probabilidades destacadas em negrito indicam significância estatística ($p < 0,05$).	89

Resumo Geral

Os metais tóxicos têm uma influência direta ou indireta em aspectos fisiológicos das macroalgas como crescimento, desenvolvimento, reprodução, desempenho fotossintetizante, respiração, organização celular e morfologia. O cádmio está entre os poluentes mais comuns encontrados nos efluentes industriais e residenciais. Nos manguezais, devido às suas características do seu sedimento e grande quantidade de matéria orgânica, podem reter uma quantidade considerável de metais, reduzindo a transferência destes poluentes para os organismos. O objetivo deste estudo foi caracterizar as respostas fisiológicas, variações bioquímicas e histoquímicas da macroalga vermelha *Bostrychia radicans* procedente de dois ambientes, um conhecido como impactado pela influência de resíduos industriais (Cubatão-SP) e outro considerado não impactado por metais (Peruíbe-SP), frente à contaminação por Cd. Os parâmetros analisados foram taxa de crescimento, desempenho fotossintetizante, conteúdo pigmentar (ficobiliproteínas, clorofila *a*, carotenoides), proteínas solúveis totais, bioabsorção de Cd, potencial antioxidante e variações histoquímicas. Neste estudo foram utilizadas seis concentrações de Cd: 6, 12, 18, 37 e 55 mg.L⁻¹. As algas expostas às maiores concentrações (37 e 55 mg.L⁻¹), de ambos os locais, não sobreviveram após o quinto dia de experimento, as demais amostras expostas às outras concentrações mantiveram-se vivas até o fim do experimento que durou 11 dias. As amostras de *B. radicans* do ambiente impactado mostraram maior tolerância ao metal em todos os testes quando comparadas com algas do local não impactado, demonstrando um menor decréscimo na taxa de crescimento e desempenho fotossintetizante. Em relação à clorofila *a*, algas do local não impactado tiveram um decréscimo menor em relação ao local impactado. Os resultados da atividade antioxidante mostraram um decréscimo direto em relação a concentração de Cd, quanto maior foi a concentração de Cd menor foi a atividade antioxidante, mas *B. radicans* demonstrou ser uma fonte natural de antioxidante. Os resultados deste estudo complementam futuros trabalhos de ecofisiologia e fornecem subsídios da estratégia de vida de *B. radicans* entre duas populações frente ao estresse ao Cd, pois não foi encontrada nenhuma literatura sobre o efeito deste metal em *B. radicans*.

General Abstract

Toxic metals have direct or indirect influence in physiological aspects of macroalgae such as growth, development, reproduction, photosynthetic performance, respiration, cell organization and morphology. Cadmium is among the most common pollutants found in industrial and residential wastewater. Mangroves due to the sediment characteristics and great amount of organic matter can retain considerable amounts of metals, reducing the transference of these pollutants to the organisms. The aim of this study was characterize the physiological responses, biochemical and histochemical variations of the red macroalga *Bostrychia radicans* coming from two environments, one known as impacted by the influence of industrial wasters (Cubatão-SP) and the other considered as not impacted by metals (Peruíbe-SP), under the Cd exposure. The analyzed parameters were growth rate, photosynthetic performance, pigment content (phycobiliproteins, chlorophyll *a*, carotenoids), total soluble proteins, Cd bioabsorption, antioxidant potential and histochemical changes. In this study were used six concentrations of Cd: 6, 12, 18, 37 and 55 mg.L⁻¹. The seaweed treated with higher concentrations (37 and 55 mg.L⁻¹), for both sites, did not survive after the fifth day of experiment, the remaining samples exposed to lower Cd concentrations stayed alive until the end of the experiment which lasted 11 days. Samples of *B. radicans* form impacted environment showed higher Cd tolerance in all tests compared with algae from not impacted environment, showing a smaller decrease in growth rate and photosynthetic performance. For chlorophyll *a* samples from not impacted environment there were minor decrease related to impacted environment. The results of antioxidant activity showed direct decrease from Cd concentration, at higher Cd concentration there was lowest antioxidant activity, but *B. radicans* demonstrated to be a natural source of antioxidants. The results of this study complement future ecophysiological studies and providing profits about the life strategy of *B. radicans* against Cd stress because there was not found any literature on the effect of rhis metal on *B. radicans*.

1 Introdução Geral

1.1 *Manguezais: o gênero Bostrychia*

Os manguezais desempenham inúmeras funções ecológicas, sendo considerados berçários de diversas espécies de seres vivos. Como parte dos ecossistemas costeiros, eles constituem um sistema de transição entre os ambientes terrestre e marinho, são característicos de regiões tropicais e subtropicais e estão sujeitos ao regime das marés. São constituídos de espécies vegetais lenhosos, além de micro e macroalgas, adaptados à flutuação de salinidade, sendo os espécimes lenhosos caracterizados por colonizarem sedimentos predominantemente lodosos, com baixos teores de oxigênio (Schaeffer-Novelli, 1995).

Em tempos passados, os manguezais eram considerados áreas inóspitas, pois seriam fontes de inúmeras doenças transmitidas por insetos. Para a economia do país eram consideradas áreas inúteis, pois não serviam para a agricultura e não eram fontes de matéria prima de exploração. Por isso, por muito tempo, esses ambientes foram aterrados e drenados, acarretando a degradação do ecossistema, até o ser humano entender o seu grau de importância para o equilíbrio dos demais ambientes (Odum & Pigeon, 1970).

Os manguezais atuam como proteção da linha da costa, formando uma barreira natural que reduz o impacto das inundações e evitando a erosão dessas áreas, ocasionada também pelos ventos. Os sedimentos dos manguezais, devido às suas características físico-químicas, são capazes de reter grande quantidade de matéria orgânica e metais como cobre, cromo, cádmio, zinco, manganês, cobalto, chumbo e níquel, reduzindo a transferência direta destes poluentes para os organismos que ali habitam (Okpiliya et al., 2013). No entanto, esse adsorvente natural não evita a contaminação do ecossistema.

Entre os organismos encontrados nos manguezais, as algas estão entre os mais eficientes na conversão de energia solar em energia química e produtividade primária mediante fotossíntese (Vonshak & Maske, 1980). Estudos têm demonstrado que as

macroalgas representam uma fonte significativa de produção primária em alguns ecossistemas de manguezais, constituindo importantes fontes de energia e elementos minerais para as redes tróficas estuarino-lagunares (Rodriguez & Stoner, 1990; Steinke & Naidoo, 1990; Karsten et al., 1994; Narasimha Rao, 1995).

As macroalgas epífitas que habitam o ecossistema de manguezal, encontradas sobre a superfície dos troncos e das raízes das árvores de mangue, pertencem, em nível global, aos gêneros *Bostrychia* Montagne, *Caloglossa* (Harvey) G. Martens, *Catenella* Greville e *Murrayella* F. Schmitz, e constituem uma associação florística denominada “Bostrychietum” (Fontes et al., 2007). Nos trabalhos de Cunha & Costa (2002), Cunha & Duarte (2002), Fontes et al. (2007), Machado & Nassar (2007) e Sena et al. (2012), *Bostrychia* foi o gênero que apresentou os maiores valores de percentual de ocorrência e biomassa. O gênero *Bostrychia* corresponde a algas vermelhas pertencentes à família Rhodomelaceae (Rhodophyta). Apresenta larga distribuição em águas tropicais e temperadas frias e ocorrem frequentemente em manguezais, frestas e fendas abrigadas de recifes e costões rochosos. No banco de dados da *NCBI Nucleotide Sequences* (Centro Nacional de Informação Biotecnológica) existem registros de 142 espécies, sendo que apenas 38 destas estão taxonomicamente aceitas (Algaebase, 2016a).

Nos manguezais brasileiros existem registros da ocorrência de sete espécies de *Bostrychia*: *Bostrychia calliptera* (Montagne) Montagne, *Bostrychia kelanensis* Grunow, *Bostrychia montagnei* Harvey, *Bostrychia moritziana* (Sonder ex Kutzing) J. Agardh, *Bostrychia pilulifera* Montagne, *Bostrychia radicans* (Montagne) Montagne e *Bostrychia tenella* (J. V. Lamouroux) J. Agardh (Joly, 1954; Taylor, 1960; Creed et al., 2010). Dentre elas, *B. radicans* é de grande representatividade em ambientes de manguezais.

Bostrychia radicans (Fig. 1) é uma espécie com vasta ocorrência e biomassa nos manguezais do Brasil; motivo que levou à escolha desta espécie, pois nas áreas de estudo sua ocorrência e abundância permitiriam a exequibilidade da presente pesquisa. A espécie pertence à família Rhodomelaceae, dentro da ordem Ceramiales, segundo a sinopse da AlgaeBase (2016b) a seguir:

Reino Plantae

Filo Rhodophyta

Classe Florideophyceae

Ordem Ceramiales

Família Rhodomelaceae

Gênero *Bostrychia*

Espécie *Bostrychia radicans*

Figura 1: Aspecto geral de *Bostrychia radicans* (Montagne) Montagne.

Segundo Joly (1954), Taylor (1960) e Oliveira (1984), *B. radicans* é uma espécie cosmopolita com ocorrência em todo o litoral brasileiro nas zonas de manguezais. São plantas pequenas que crescem em tufo densos, ocorrendo geralmente acima do nível da maré alta, fixadas a rochas e protegidas da incidência do sol. Frequentemente encontradas nos manguezais sob a influência de rios e estuários ou em áreas próximas de manguezais, assim como locais calmos, próximos a baías com grande quantidade de sedimento, tão comuns e característicos da costa sudeste do Brasil (Joly, 1954).

Esta espécie tem características morfológicas de fixação através de cladohaptera que se origina da proliferação de células axiais, pericentrais ou corticais nas extremidades de

ramos vegetativos de crescimento determinado ou indeterminado (Zucarelo & West, 2006). Tem o padrão de ramificação alterno-dístico, apresentando de 1-2(-3) ordens, com talos ecorticados e inteiramente polissifônicos.

Bostrychia radicans, por apresentar uma morfologia simples e uma plasticidade fenotípica, tem sua identificação por caracteres morfológicos dificultada. Recentemente, estudos moleculares de *B. radicans* e *B. moritziana* mostraram que ambas são espécies crípticas, formando um complexo que compreendem sete linhagens moleculares (Zucarelo & West, 2003, 2006; Zucarelo et al., 2006).

A espécie *B. radicans* apresenta uma grande tolerância a condições potencialmente estressantes, característica que destaca para seu bom desempenho em ambientes de manguezal, onde sofre constantemente variações de intensidade luminosa, dessecação e estresse osmótico (Cunha & Duarte, 2002). Tem um grande papel ecológico por manter protegido entre seus filamentos uma fauna diversificada, servir como alimento para animais herbívoros, estruturar ambientes propícios para reprodução de diversas espécies da fauna marinha e estuarina e contribuir significativamente para elevar a biodiversidade nestes ambientes.

1.2 Pólo industrial de Cubatão

Na cidade de Cubatão, São Paulo, encontra-se o maior pólo industrial da América Latina, o Pólo Industrial de Cubatão (23°53'57,53"S e 46°22'49,76"O), que constitui a principal fonte de contaminantes químicos para o sistema estuarino da Baixada Santista (Hortellani et al., 2008). Por causa da diversidade de poluentes e do volume dos mesmos, nos anos 80 Cubatão ficou conhecida internacionalmente devido à grande quantidade de poluentes químicos lançados sem controle no meio ambiente, prejudicando todo o seu ecossistema (CETESB, 2001). Em 1984, a Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental do governo paulista (CETESB) implantou no município o Programa de Controle Ambiental, com o objetivo de reduzir ou eliminar as 320 principais fontes de poluição do ar, 46 de poluição do solo e 44 de poluição das águas. Até o ano da implantação do programa, as 44 fontes de poluição das águas

emitiam 64 ton/dia de poluentes, dos quais se reduziu até o ano de 1990 em 93,8% (CETESB, 1990).

Segundo Hortellani et al. (2008), existem diversas indústrias em Cubatão que podem ser agrupadas de acordo com seus produtos e potenciais de emissão de metais poluentes nos efluentes. Análises realizadas pela CETESB no período entre 1984 a 2000, mesmo quando os níveis atenderam os padrões legais de lançamento ou os lançamentos foram esporádicos ou eventuais, resultaram na seguinte divisão: uma indústria siderúrgica com potencial de emissão dos elementos metálicos Cu, Mn, Ni e Zn; duas refinarias de petróleo com potenciais de emissão de Cu, Cr, Ni, Hg e Zn; 11 indústrias químicas e petroquímicas com potenciais de emissão de Cd, Cu, Cr, Mn, Ni, Pb, Zn e Hg e sete indústrias de fertilizantes com potenciais de emissão de Pb, Ni e Zn. Entre essas últimas sete existem quatro indústrias de fertilizantes fosfatados que já produziram como resíduo cerca de 69 milhões de toneladas de fosfogesso, estocados em imensas pilhas a céu aberto ao lado da rodovia Piaçaguera-Guarujá, com potencial de emissão de radionuclídeos, que são nuclídeos instável que se degeneram e emitem radiações ionizantes (Eisenbud, 1987). Das 21 indústrias localizadas no pólo industrial de Cubatão-SP, 11 têm um alto potencial de emissão de Cd, um metal não essencial e tóxico aos organismos (Bouzon et al., 2012).

1.3 Poluição de metais em sistemas aquáticos: cádmio

Em sistemas estuarinos, como o da Baixada Santista, estão presentes um conjunto de substâncias que são introduzidas por diversas fontes, incluindo rios, deposição atmosférica, efluentes e escoamento de água superficial, muitas delas produto do crescimento desenfreado da ação antrópica. Estas áreas, em geral, apresentam forte gradiente de concentração de componentes químicos, constituindo regiões nas quais a matéria orgânica, os nutrientes e os agentes de poluição (os poluentes) são transformados, retidos ou eliminados (Garnier et al., 2010). A poluição, ou seja, a degradação da qualidade ambiental resultante de atividades que direta ou indiretamente prejudicam a saúde, a segurança e o bem-estar da população, propicia condições adversas às atividades sociais e econômicas e afeta desfavoravelmente a biota e as

condições estéticas ou sanitárias do meio ambiente mediante o lançamento de matéria ou energia em desacordo com os padrões ambientais estabelecidos (Brasil, 1981).

Entre os poluentes encontrados nos estuários, os metais são os mais comuns tanto no Brasil como em todo o mundo. Existem metais como Zn, Fe e Cu que são essenciais para uma ampla gama de processos fisiológicos em organismos fotossintetizantes. Mas eles também podem se tornar tóxicos em concentrações elevadas. Os metais como Ar, Cd, Pb e Hg são elementos não essenciais e altamente tóxicos. Quando há um aumento desequilibrado na concentração de metais no interior da planta ocorre a fitotoxicidade, causando transtornos em seus principais sistemas fisiológicos (ex. transpiração, fotossíntese, respiração e metabolismo de carboidratos), tendendo assim a tensões secundárias como estresse nutricional e estresse oxidativo, afetando desenvolvimento, crescimento e reprodução das plantas (Kramer & Clemens, 2005).

Os metais de maior preocupação são Cu, Zn, Cd, Pb, Ni e Cr, que entram nos cursos de água a partir de uma ampla gama de fontes naturais e antropogênicas (McClusky & Elliot, 2004). Os metais podem se acumular em sedimentos aquáticos, onde podem permanecer por períodos de tempo curtos ou longos antes de serem remobilizados, devido a alterações físicas, químicas e biológicas dentro do estuário (Harbison, 1986; Murray, 1996).

Com o crescente desenvolvimento das atividades industriais e a falta de tratamento dos seus resíduos, como exemplificado no pólo industrial de Cubatão, os metais têm sido depositados indevidamente em corpos d'água, causando contaminação em regiões costeiras e afetando diversos organismos marinhos. Devido à maior emissão de combustíveis fósseis provindo de fontes industriais e domésticas, existem registros de aumento nas concentrações de Cd em ambientes marinhos (Benavides et al., 2005). E dentre os metais, o Cd é um dos que atrai maior preocupação, da qual a cidade de Cubatão registrou 11 indústrias com rejeitos contendo este metal.

Na natureza, o Cd ocorre junto com o Zn, pois apresenta várias propriedades físicas e químicas semelhantes. O Cd e o Zn são encontrados, geralmente, em uma relação que varia, respectivamente, entre 1:100 e 1:1000, sendo que o Cd ocorre principalmente sob a forma de sulfetos (Cardoso & Chasin, 2001).

Conforme Russel (1981), o Cd é um metal de transição. Na forma metálica apresenta-se cinza-esbranquiçado, mole e de fusão baixa se comparado a outros metais. O Cd está se tornando um dos maiores contaminantes dos ecossistemas (Chen & Kao, 1995), sendo propagado em nosso ambiente principalmente pelas atividades industriais, agroindustriais e metalúrgicas e pela incineração do lixo (Marchiol et al., 1996). Este metal não faz parte de moléculas orgânicas, entretanto, quando presente, pode estar relacionado ao decréscimo de fotossíntese, de absorção de cálcio e da taxa de crescimento em macroalgas marinhas (Visviki & Rachlin, 1992; Diannelidis & Delivopoulos, 1997).

Nos ambientes aquáticos, o Cd é encontrado em menor concentração na coluna d'água, e com uma maior concentração no sedimento, principalmente em regiões estuarinas, pois o sedimento tem características quelantes, imobilizando os metais e diminuindo a disponibilidade do mesmo para a biota local (Zheng et al., 1997).

1.4 Absorção de cádmio e efeito nas macroalgas

O Cd, por ser um metal não essencial, não existe uma via especializada para a sua absorção, sendo transportado para dentro das células através de canais de Ca^{+2} (Perfus-Barbeoch et al., 2002). A parede celular constitui uma barreira física e química para a entrada de metais. A composição de celulose, associada a polissacarídeos de parede (ex. alginatos, carragenanas e agaranas), constituintes básicos da maioria das algas, formam longas cadeias de polissacarídeos associadas a diferentes resíduos de açúcares, variando conforme o filo das algas. Entre os grupos de algas, as vermelhas apresentam uma grande complexidade de polissacarídeos que compõem sua parede celular, apresentando a galactose como o principal componente de açúcar e as carragenas e o ágar como os principais constituintes da mucilagem da parede celular (Moreira, 2007).

Nas macroalgas, os polissacarídeos presentes na parede celular são os principais responsáveis pela captura de íons metálicos, esses componentes atuam como quelantes, pois os metais reagem facilmente com os grupos sulfatos dos ficocoloides (Diannelidis & Delivopoulos, 1997)

Os mecanismos de transporte de Cd para o interior da célula e de detoxificação em

macroalgas ainda são desconhecidos. No entanto, Yang & Chu (2011) e Parrotta et al. (2015) propuseram alguns modelos baseados em plantas vasculares para explicar o transporte, a imobilização, o acúmulo e os processos subsequentes em relação ao estresse por metais tóxicos. Na Figura 2 apresenta-se um esquema geral de uma célula vegetal com os compartimentos de parede celular, citosol e vacúolo. Na presença de Cd disponível no meio, o primeiro mecanismo celular de defesa é a parede celular, visto que proteínas (PR), polissacarídeos (PO) e componentes de grupos fosfatos (GF) agem como quelantes dos íons de Cd na parede celular. O transporte celular dos íons de Cd para o citosol é mediante transportadores inespecíficos tais como membros da família ZIP (transportadores regulados por Zn/Fe) e pela bomba de cálcio (BC), devido ao fato dos íons de Cd ter estrutura parecida com íons de Zn e Ca. Adicionalmente, o Cd pode ingressar por transporte passivo (TP). Uma vez no citosol, os íons de Cd estimulam a síntese de fitoquelatinas, derivadas de glutathione, que se ligam ao Cd citossólico e são transportados para dentro do vacúolo via um transportador ABC (carreador de ligação ao ATP). No citosol, os íons de Cd podem também se ligar a diversos componentes celulares como metalotioneínas, ácidos orgânicos e aminoácidos, todos eles com propriedades quelantes. Íons de Cd que ainda permanecem livres no citosol são transportados para os vacúolos por meio de uma troca direta através de intercambiadores de cátions (CAX) e transportadores passivos proteicos tolerantes a metais (MTP), localizados no tonoplasto do vacúolo. Ainda no citosol, o acúmulo de Cd pode induzir a ação de enzimas antioxidantes (E. AOX) e compostos antioxidantes (C. AOX) que podem auxiliar na detoxificação do estresse oxidativo gerado pela toxicidade do metal. Assim, grande parte do Cd é quelado (imobilizado) e/ou depositado nos vacúolos na tentativa de evitar a toxicidade do metal e proteger o organismo de danos de estresse oxidativo induzido por Cd.

O Cd por ser um metal não essencial e de fácil absorção pelas algas, ao entrar em contato com este metal as algas revelam alterações diversas nas respostas fisiológicas, bioquímicas e estruturais. Estudos relacionados à absorção de Cd demonstraram que quanto maior a concentração do metal e o tempo de exposição do organismo, mais ele será absorvido, como visto no trabalho de Brinza et al. (2009) na alga parda *Fucus vesiculosus* Linnaeus procedentes do Mar da Bótnia e do mar da Irlanda. Os autores observaram que em algas expostas a três concentrações de Cd (2, 18 e 180 mg.L⁻¹) a absorção foi maior durante a primeira hora de exposição, atingido um máximo após de

duas horas. As maiores absorções foram para algas do mar de Bótnia (0,36; 3,3 e 42,2 mg.g⁻¹, respectivamente) e as menores para as do mar da Irlanda (0,013; 0,08 e 0,92 mg.g⁻¹, respectivamente). Esses resultados mostram que ocorre diferença na absorção de metais em relação à mesma espécie apenas variando os locais de origem. No estudo de García-Ríos et al. (2007) com as espécies *Gracilaria cornea* J. Agardh e *Chondrophycus poiteaui* (J.V. Lamouroux) K.W. Nam submetidas a 1 mg.L⁻¹ de Cd por sete dias houve uma elevada absorção do metal, tendo *C. poiteaui* um acúmulo quatro vezes maior que *G. cornea*. No entanto, a maior parte do metal encontrado em *G. cornea* foi observada extracelularmente (80%), já em *C. poiteaui* o acúmulo ocorreu no interior da célula (aproximadamente 100%). Nesse mesmo estudo, em relação à fotossíntese máxima (Pmax), *G. cornea* não teve diferença significativa nos tratamentos. Por outro lado, *C. poiteaui* teve um decréscimo no Pmax após três dias, mas no sétimo dia, os valores de Pmax não apresentaram diferenças significativas comparado com o controle.

Figura 2: Modelo de absorção de Cd pela célula vegetal. **Cd²⁺** (íons de cádmio), **PR** (proteínas), **ZIP** (transportador de íons de Zn/Fe), **PO** (polissacarídeos), **TP** (transportador passivo), **GF** (grupos fosfato), **BC** (bomba de cálcio), **E. AOX** (enzimas antioxidantes), **C.AOX** (compostos antioxidantes), **ABC** (carreadores de ligação ao ATP), **CAX** (carreador de prótons), **MTP** (proteína tolerante a metais).

Estudos mostram que as taxas de crescimento diminuem quando expostas ao Cd, sendo estas diretamente relacionadas com o tempo de exposição e à concentração do metal. Na alga vermelha *Gracilaria tenuistipitata* Chang et Xia, Collen et al. (2003) utilizaram a concentração de 1 mg.L^{-1} e obtiveram resposta significativa após o 4º dia de tratamento, com um decréscimo na taxa de crescimento de 57% em relação ao controle. Conforme Xia et al. (2004), *Gracilaria lemaneiformis* (Bory de Saint-Vincent) Greville também apresentou diminuição na sua taxa de crescimento quando expostas a 9, 18 e 37 mg.L^{-1} de Cd, de 7 a 89% em relação ao controle.

A concentração de ficobiliproteínas também foi negativamente afetada, de 51 a 90% em relação ao controle (Xia et al., 2004). Os autores observaram que com o decréscimo da concentração de ficobiliproteínas houve correlação negativa na absorção de energia luminosa e sua consequente transferência para os centros de reação do PSI e PSII, reduzindo significativamente a fotossíntese, de 25 a 7% em relação ao controle. Em testes realizados com *Gracilaria domingensis* (Kutzing) Sonder ex Dickie, nas concentrações de 18, 37 e 55 mg.L^{-1} Cd e durante 16 dias, Santos (2011) observou uma relação indireta do crescimento com a concentração de Cd em relação ao controle; quanto maior a concentração de Cd menor foi sua taxa de crescimento, obtendo no final do experimento 0,8 a 1,2% por dia. Segundo Bouzon et al. (2012), a alga vermelha *Hypnea musciformis* (Wulfen) J.V. Lamouroux mostrou decréscimo significativo na taxa de crescimento quando exposta a concentrações de 9, 18, 37 e 55 mg.L^{-1} Cd, comparados com o controle que apresentou um crescimento de 10% por dia e aumento na formação de ramos laterais. Nos tratamentos de 9 e 18 mg.L^{-1} Cd os autores observaram crescimento de apenas 5,8 e 4,8% por dia, respectivamente, com pouca formação de ramos laterais. Já em tratamentos de 37 e 55 mg.L^{-1} Cd houve um decréscimo de 8,5% e 17% ao dia, respectivamente, em relação ao controle, e após o 4º dia de exposição a essas concentrações as algas demonstraram branqueamento e despigmentação (Bouzon et al., 2012).

No estudo de Diannelidis & Delivopoulos (1997) foram pesquisadas as alterações na ultraestrutura da macroalga vermelha *Ceramium ciliatum* (J. Ellis) Ducluzeau exposta nas concentrações de 1, 2 e 10 mg.L^{-1} , por seis dias. Os autores observaram que as amostras na concentração de 1 mg.L^{-1} tiveram alteração no retículo endoplasmático,

contendo abundante material fibroso e grânulos eletrodensos, demonstrando que os polissacarídeos das paredes celulares quelaram a maior parte do metal, impedindo a toxicidade celular em maior escala. Já na concentração de 10 mg.L^{-1} , as algas apresentaram alterações significativas, principalmente na desorganização dos tilacoides e presença de numerosos plastoglôbulos, assim como composição fibrilar da parede celular, demonstrando que sob maiores concentrações de Cd os polissacarídeos da parede celular não foram suficientes nem eficientes para quelar todo o metal. Grande parte do metal acaba entrando para o citosol e danificando organelas essenciais à vida do organismo.

Observou-se por Andrade et al. (2002) para *Padina gymnospora* (Kutzing) Sonder, utilizando 1 mg.L^{-1} de Cd, deposições granulares nas paredes celulares das regiões subapical e mediana do talo, sendo estes grânulos atribuídos à deposições do metal. Estes depósitos foram mais abundantes nas células corticais e subcorticais, estando espalhados por toda a parede, mas sem deposição nas estruturas citoplasmáticas como cloroplastos, mitocôndrias, núcleo e outras organelas, o que indicaria uma resposta física para a retenção ou quelação de metais já na parede celular. No trabalho de Santos (2011), *G. domingensis* tratada com 18, 37 e 55 mg.L^{-1} de Cd também observou-se espessamento da parede celular, especialmente na região mais externa das células corticais, adicionalmente houve aumento de material de reserva.

Apesar dos estudos sobre o efeito do Cd na organização celular, há muito menos informações sobre o estresse oxidativo ou os sistemas de defesa induzido por Cd em algas marinhas, e a maior parte dos estudos têm sido focada em algas microscópicas (Lee & Shin, 2003). Estudos relacionados aos sistemas de defesas ao estresse oxidativo induzido pelo Cd são escassos em macroalgas, mas cabe destacar o estudo realizado com a microalga verde *Nannochloropsis oculata* (Droop) D.J. Hibberd, no qual foi verificada alterações nas enzimas antioxidantes em diferentes concentrações de Cd, com uma inibição significativa no crescimento com o aumento da concentração de Cd, tendo uma redução de 15% da taxa de crescimento na concentração de $1,8 \text{ mg.L}^{-1}$ de Cd e de 50% para $3,6 \text{ mg.L}^{-1}$ de Cd (Lee & Shin, 2003). Além disso, os autores verificaram um aumento de 30% de H_2O_2 e lipídios e do nível de peroxidação em termos de produção de malondialdeído.

As macroalgas por serem produtoras primárias do ambiente aquático com capacidade de acumular metais, que estão disponíveis na água, preenchem os requisitos que os organismos biomonitoradores devem possuir, como capacidade de acumular metais nas suas células, variações fisiológicas quando expostas ao contaminante e sensibilidade ou tolerância ao metal (Melville & Pulkownik, 2007). Essas qualidades das macroalgas têm sido úteis para monitorar a contaminação por metais traço em ambientes aquáticos, pois as algas acumulam esses poluentes nas suas células, permitindo fornecer uma estimativa detectável da fração biodisponível, além de expressar sensibilidade ao contaminante com sua presença ou ausência, frequência de ocorrência e sua variação fisiológica (Vasconcelos & Leal, 2001). Como base da cadeia alimentar, elas podem representar vias críticas de transferências desses elementos para o homem, bem como para outros organismos, interferindo assim na biodiversidade e equilíbrio ecossistêmico.

2 Justificativa

As algas encontradas nos manguezais são eficientes na conversão de energia solar em energia química utilizável, representam uma fonte significativa de produção primária em alguns ecossistemas de manguezais, além de constituir importantes fontes de energia e elementos minerais para as redes tróficas estuarino-lagunares. A ação antrópica na cidade de Cubatão-SP há anos retrata a principal fonte de contaminantes químicos para o sistema estuarino da Baixada Santista, com efluentes industriais contendo metais que continuamente são lançados no ambiente aquático. Desta forma, esses elementos podem causar efeitos tóxicos nos diferentes organismos e no ecossistema. Como produtoras primárias, as algas podem representar vias críticas de transferência desses elementos para os organismos aquáticos, interferindo assim na biodiversidade e podendo chegar até a contaminação humana pela transferência desses poluentes através da cadeia trófica. A proposta de analisar o efeito do Cd com a macroalga *B. radicans* visa aprofundar nos estudos referentes ao potencial efeito deletério deste metal sobre organismos aquáticos, assim como identificar possibilidade de usar esta ou outras algas como indicadoras para monitoramento ambiental.

3 Objetivos

O presente estudo visa caracterizar e entender, em condições de laboratório, as respostas fisiológicas e as variações histoquímicas frente à exposição de Cd da macroalga *B. radicans* que ocorre em ambiente de manguezal, procedentes de locais com diferentes níveis de impacto. Para alcançar este objetivo geral, os objetivos específicos apontam a:

- a) Avaliar a capacidade de bioabsorção de Cd de *B. radicans* após exposição a diferentes concentrações do metal.
- b) Comparar as respostas fisiológicas de *B. radicans* submetida a diferentes concentrações de Cd quanto a taxa de crescimento, fotossíntese, conteúdo de pigmentos fotossintetizantes e proteínas solúveis totais e potencial antioxidante.
- c) Analisar as variações histoquímicas de *B. radicans* após exposição a diferentes concentrações de Cd.

4 Materiais e Métodos

4.1 Coleta do material biológico

Amostras de *Bostrychia radicans* foram coletadas no Rio Uma, situado na Estação Ecológica Juréia-Itatins, Peruíbe, SP (24°26'8,52"S e 47°4'45,85"O; Fig. 3), caracterizado por ser um local com menor interferência antrópica e, portanto, menos impactado, o qual foi considerado neste trabalho como “local não impactado”, e no Canal de Piaçaguera, Cubatão, SP (23°53'57,53"S e 46°22'49,76"O; Fig. 4), local reportado na literatura como sendo uma área impactada por metais (Hortellani et al., 2008), correspondendo neste trabalho ao “local impactado”.

O material coletado foi transportado para o Laboratório de Algas Marinhas Edison José de Paula (LAM) do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo em sacos plásticos pretos, dentro de caixas de isopor, sem água apenas úmidas. No laboratório, as algas foram triadas, lavadas com abundante água do mar filtrada e limpas de macroepífitas e de fauna acompanhante. Após limpos, dois exemplares de indivíduos diferentes para cada local foram acondicionados em sílica gel para posteriores análises moleculares, com o intuito de identificar o material mediante o uso de marcadores moleculares. Outros exemplares de indivíduos diferentes foram fixados em formol 4%, diluído em água de mar filtrada, para posterior herborização. As exsiccatas foram tombadas no Herbário SPF da Universidade de São Paulo, seção de ficologia, com o registro SPF57887 para o local não impactado (três exemplares; Fig. 5A) e SPF57888 para o local impactado (cinco exemplares; Fig. 5B). O restante do material triado e limpo foi utilizado nos experimentos (ver item 4.3).

Figura 3: Visão geral do Rio Una e o ponto de coleta (P1) na Estação Ecológica Juréia-Itatins, Peruíbe-SP (local não impactado).

Figura 4: Visão geral do Município de Cubatão e o ponto de coleta (P2) no Canal de Piaçaguera (local impactado)

Figura 5: Exsicatas depositadas no Herbário do Instituto de Biociências SPF. (A) SPF57887 do Município de Peruíbe, local não impactado e (B) SPF57888 do Município de Cubatão, local impactado.

4.2 Identificação taxonômica por biologia molecular

O material acondicionado em sílica gel ($n = 2$), para cada local, foi utilizado para identificação taxonômica mediante técnicas de biologia molecular usando marcadores moleculares específicos. Amostras de 20 mg de algas foram trituradas em nitrogênio líquido em microtubo até a obtenção de um fino pó e a extração de DNA foi realizada utilizando o kit *NucleoSpin Plant II* (Macherey- Nagel, EUA), seguindo as instruções do fabricante. O material contendo o DNA genômico foi armazenado em freezer -20°C para então ser utilizado na amplificação por PCR das sequências de interesse.

Para a amplificação por PCR utilizou-se o kit *GoTaq G2 DNA Polymerase* (Promega, EUA), seguindo as instruções do fabricante. Foi utilizado o marcador codificante para a subunidade grande (*rbcL*) da enzima ribulose-1,5-bisfosfato carboxilase-oxigenase (Rubisco), presente no genoma do cloroplasto (Freshwater et al., 1994). Para a amplificação do marcador molecular *rbcL* foram adicionados 0,25 μL de DNA total, 0,5 μL dos respectivos iniciadores *forward* e *reverse*, acrescido de 16,37 μL de água ultrapura, 5 μL de 5X PCR tampão, 1,5 μL de MgCl_2 25 mM, 0,5 μL de dNTP

10 μ M e 0,125 μ L da enzima *Taq DNA Polymerase* (5 U/ μ L), perfazendo um volume de 25 μ L de reação. As condições da PCR foram modificadas de Zuccarello & West (2002): desnaturação inicial a 94°C por 4 min, seguido por 35 ciclos de 94°C por 1 min (desnaturação), 45°C por 1 min (anelamento) e 72°C por 2 min (extensão), com uma extensão final de 72°C por 7 min. Os pares de iniciadores utilizados foram FrbcL (*forward*) x R492 (*reverse*) para a amplificação da região inicial, F492 (*forward*) x R1150 (*reverse*) para amplificação da região do meio e F993 (*forward*) e Rrbcs (*reverse*) para a região final. As sequências e especificações de cada um dos iniciadores estão resumidas na Tabela 1.

Tabela 1: Iniciadores para a subunidade grande (*rbcl*) para a PCR e sequência para os diferentes marcadores moleculares usados no presente estudo.

Marcador	Iniciador	Sequência 5'-3'	Referência
<i>rbcl</i>	FrbcL start	5'-ATG TCT AAC TCT GTA GAA G-3'	Freshwater & Rueness (1994)
<i>rbcl</i>	R492	5'-CGA CAA AAT TTA TCC ATA CG-3'	Freshwater & Rueness (1994)
<i>rbcl</i>	F492	5'-CGT ATG GAT AAA TTT GGT CG-3'	Freshwater & Rueness (1994)
<i>rbcl</i>	R1150	5'-GCA TTT GTC CGC AGT GAA TAC C-3'	Freshwater & Rueness (1994)
<i>rbcl</i>	F993	5'-GGT ACT GTT GTA GGT AAA TTW GAA GG-3'	Freshwater & Rueness (1994)
<i>rbcl</i>	Rrbcs Start	5'-GTT CTT GTG TTA ATC TCA C-3'	Freshwater & Rueness (1994)

Os produtos da PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose 0,7% e tampão tris-borato-EDTA (TBE: tris-HCL 50 mM, borato 50 mM, EDTA 2 mM) e corados com *Gel Loading Buffer* (GelRedTM) para verificação do tamanho do DNA amplificado, utilizando como padrão o marcador 1 kb *DNA Ladder* (Invitrogen), através de um transluminador UV, acoplado a um sistema de fotografia digital (Kodak). Os produtos de PCR foram purificados em colunas *GFX Illustra PCR DNA and Gel Band Purification Kit* (GE Healthcare, Buckinghamshire, Inglaterra). A quantificação do produto da PCR foi realizada no NanoDrop 2000-Spectrophotometer (Thermo Scientific, EUA), para então passar para etapa da reação do sequenciamento.

O sequenciamento dos produtos da PCR foi realizado utilizando 10 a 40 ng de amostra purificada, usando-se o kit de sequenciamento *BigDyeTM Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction* (Applied Biosystems, EUA), seguindo as instruções do fornecedor e os iniciadores descritos na Tabela 1. O ciclo da reação de sequenciamento foi realizado na seguinte condição: 40 ciclos a 96°C por 10 seg, 54°C por 20 seg e 60°C

por 4 min, e realizados nos sequenciadores automáticos ABI PRISM™ 3100 ou ABI PRISM™ 3730 Genetic Analyzer (Applied Biosystems).

As sequências obtidas nas direções direta e reversa para cada marcador foram alinhadas manualmente usando o programa *BioEdit Sequence Alignment Editor* 7.0.4.1 (Hall, 1999). Nucleotídeos divergentes foram verificados manualmente com a análise dos cromatogramas de sequenciamento. As sequências-consenso obtidas de todas as amostras foram alinhadas em uma matriz através do programa *ClustalX* ver. 2.1 (Larkin et al., 2007) e verificadas manualmente usando o programa *BioEdit* (Hall, 1999). Cada sequência foi comparada com as sequências do GenBank. As sequências do marcador *rbcL* de todas as amostras e das amostras do GenBank foram alinhadas em uma matriz no programa MEGA 7 e realizada uma árvore de filogenética por máxima verossimilhança.

4.3 Delineamento experimental

O material triado e limpo foi previamente aclimatado durante sete dias sob condições controladas de laboratório em água do mar filtrada e esterilizada de salinidade de 32 ups, diluída com água ultrapura até chegar à salinidade de 25 ups, enriquecida com solução nutritiva de von Stosch 100% (VS; Ursi & Plastino (2001) modificada de Edward (1970)) e cultivado sob densidade de fluxo fotônico de $40 \pm 5 \mu\text{mol f\u00f3tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, temperatura constante de $25 \pm 1^\circ\text{C}$, fotoper\u00edodo de 14 horas de luz e 10 horas de escuro e aera\u00e7\u00e3o em per\u00edodos intermitentes de 30 minutos ligado e 30 minutos desligado. As condi\u00e7\u00f5es de cultivo foram baseadas no estudo de Wilson et al. (2002) para o mesmo g\u00eanero, no entanto, estas foram modificadas segundo se descreve no Anexo I.

Ap\u00f3s o per\u00edodo de aclima\u00e7\u00e3o, as algas das duas localidades seguiram para as condi\u00e7\u00f5es experimentais. Para cada tratamento, com cinco repeti\u00e7\u00f5es cada, 1 g de massa fresca (MF) foi cultivada em frascos Erlenmeyer de 1 L para serem tratados com cloreto de c\u00e1dmio (CdCl_2) em seis concentra\u00e7\u00f5es: 0 (controle), 6, 12, 18, 37 e 55 mg.L^{-1} . As concentra\u00e7\u00f5es de Cd foram escolhidas de acordo com as concentra\u00e7\u00f5es estudadas por Talarico (2002) e Xia et al. (2004) para algas vermelhas. As plantas tratadas foram submetidas \u00e0s mesmas condi\u00e7\u00f5es de cultivo descritas acima no procedimento de aclima\u00e7\u00e3o, durante o per\u00edodo experimental de 11 dias, sendo estas estudadas na

bioabsorção de Cd, taxa de crescimento, desempenho fotossintetizante, pigmentos e proteínas solúveis, potencial antioxidante e variações histoquímicas.

4.4 Bioabsorção de cádmio

A bioabsorção de Cd de *B. radicans* foi estudada em amostras coletadas ao final do experimento e calculada a partir da quantificação de Cd na alga mediante análise de espectrometria de absorção atômica. As análises foram realizadas no Centro de Reator de Pesquisas do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares da USP (IPEN-USP) com a colaboração do Prof. Dr. Paulo Sergio Cardoso da Silva. A partir dos valores de Cd encontrados nos talos de *B. radicans* foram estimadas a bioabsorção de Cd para cada um dos tratamentos, sendo estes expressos em porcentagem de absorção.

Para esta análise, aproximadamente 70 mg de alga seca e triturada foram pesadas com o auxílio de balança semianalítica (OHAUS modelo Adventure I) e transferidas para tubos Teflon®. Adicionou-se, em seguida, 4 mL de HNO₃ concentrado e 2 mL de H₂O₂, incubado durante 3 h a temperatura de 90°C. Após a digestão e o resfriamento dos tubos, as amostras e os materiais de referências foram filtrados em papel filtro Vetec (filtração média), com auxílio de funil de vidro, diretamente em balão volumétrico de 25 mL e o volume do balão foi completado com água ultrapura. As amostras digeridas juntamente com os materiais de referência foram analisados em espectrometria de absorção atômica com atomização por forno de grafite (GFAAS) modelo Analyst 800 da Pelkir Elmer no Laboratório de Absorção Atômica do IPEN-USP.

Antes da determinação da concentração de Cd nas amostras, foi preparada uma solução de Cd a partir da solução estoque diluída em HNO₃ 2%, usado também como diluente, para construção da curva de calibração do equipamento. As concentrações da solução utilizada na curva de calibração (0-6,99 µg.L⁻¹ Cd; $y = 0,0553x - 0,008$; $R^2 = 0,995$). A bioabsorção total de Cd foi expressa em %, calculado considerando a concentração de Cd adicionado no tratamento e o teor presente na amostra de alga.

4.5 Taxa de crescimento

A taxa de crescimento (TC) de *B. radicans* foi avaliada através de medidas de peso da massa fresca (MF), nos dias 0, 3, 5, 8 e 11, durante os onze dias de tratamento. As taxas de crescimento foram apresentadas como porcentagem de crescimento diário, sendo calculadas segundo a equação em Penniman et al. (1986):

$$TC (\%.\text{dia}^{-1}) = [(Mf / Mi)^{(1/t)} - 1] \times 100$$

onde Mi = massa inicial em gramas, Mf = massa final em gramas, t = tempo experimental em dias.

4.6 Desempenho fotossintetizante

A fotossíntese foi avaliada mediante análises do desempenho fotossintetizante medindo a fluorescência *in vivo* da clorofila *a* do PSII, utilizando um fluorômetro de pulso de amplitude modulada PAM-2500 (Walz, Alemanha), nos dias 0, 3, 5, 8 e 11, durante os onze dias de tratamento. O rendimento quântico máximo (Fv/Fm) foi avaliado em amostra pré-aclimatadas ao escuro por 10 min e calculado segundo Schreiber et al. (1986). O rendimento quântico efetivo [Y(II)] foi medido em algas aclimatadas à luz e calculado seguindo Schreiber & Neubaer (1990). A taxa de transporte de elétrons (ETR) foi estimada mediante curvas P-I (fotossíntese-irradiância; ETR-PAR) sob oito intensidades crescentes de PAR (radiação fotossinteticamente ativa: 0, 24, 61, 108, 186, 456, 752 e 1.024 $\mu\text{mol f\acute{o}tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) e calculado como $ETR = Y(II) \times PAR \times A \times 0,15$; sendo A a absorptância dos talos medida seguindo Mercado et al. (1996) e 0,15 a fração de clorofila associada ao PSII para algas vermelhas (Grymski et al., 1997; Figueroa et al., 2003). A partir das curvas de ETR-PAR foram determinados o ETR máximo (ETR_{máx} em intensidade PAR de saturação), eficiência fotossintetizante (α) e intensidade de saturação fotossintetizante (Ik) (Maxwell & Johnson, 2000), segundo o ajuste de Jassby & Platt (1976).

4.7 Pigmentos fotossintetizantes e proteínas solúveis totais

Análises dos teores de ficobiliproteínas, proteínas solúveis totais, clorofila *a* e carotenoides totais foram realizadas a partir de amostras de 70 mg MF, congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas em ultrafreezer (-80°C) até sua análise. As análises foram feitas de acordo com o descrito por Wanderley (2009). Cada amostra foi triturada em nitrogênio líquido até obter-se pó fino. O material foi suspenso em 1 mL de tampão fosfato de sódio (50 mM), gelado (4°C) com pH 5,5. Após suspensão, o homogeneizado foi preservado da fotodegradação e acondicionado em gelo para reduzir a deterioração dos pigmentos. O homogeneizado foi centrifugado a 14.000 rpm, 4°C por 20 min e o sobrenadante foi recolhido e mantido no escuro a 4°C até análise das ficobiliproteínas e proteínas solúveis totais, este extrato foi denominado de extrato tamponado.

As ficobiliproteínas foram analisadas em espectrofotômetro de microplacas UV-visível (Epoch Biotek, EUA), com varredura entre 400-700 nm e usando microplaca de 96 poços. A calibragem e zeragem do equipamento foram feitas com o mesmo tampão fosfato de extração. Os dados de ficobiliproteínas foram padronizados pela massa fresca e a concentração determinada de acordo com as fórmulas de Kursar et al. (1983):

$$FE (\mu\text{g.g MF}^{-1}) = (155,8 \times A_{498}) - (40 \times A_{614}) - (10,5 \times A_{652})$$

$$FC (\mu\text{g.g MF}^{-1}) = (151,1 \times A_{614}) - (99,1 \times A_{652})$$

$$Alo (\mu\text{g.g MF}^{-1}) = (181,3 \times A_{652}) - (22,3 \times A_{614})$$

onde, FE corresponde ao pigmento ficoeritrina, FC a ficocianina, Alo a aloficocianina e A à absorbância no respectivo comprimento de onda assinalado.

O teor de proteínas solúveis totais foi mensurado a partir de uma alíquota de 40 µL do extrato tamponado, baseando-se no método de Bradford (1976). Para isso foi utilizado o reagente para ensaio proteico da Bio-Rad (Bio-Rad, EUA) em concentração de 25%, diluído em água ultrapura. A curva padrão foi construída com albumina de soro de bovino (BSA). As proteínas foram analisadas em espectrofotômetro UV-visível de microplacas (Epoch Biotek, EUA) sob comprimento de onda de 595 nm. A calibragem e zeragem do equipamento foram feitas com uma mistura entre o reagente Bio-Rad diluído em 25% e água ultrapura.

O material sedimentado (pellet) do extrato tamponado foi ressuspensionado em 1,5 mL de metanol, homogeneizado e extraído por 3 h no escuro e 4°C para estimar o teor de clorofila *a* e carotenoides totais. Os extratos foram centrifugados a 14.000 rpm e 4°C pelo período de 15 min. A absorbância do sobrenadante foi lida em espectrofotômetro de microplaca UV-visível (Epoch Biotek, EUA), com varredura entre 400-700 nm. A calibragem e zeragem do equipamento foram realizadas com metanol. Os resultados de clorofila *a* e carotenoides totais foram padronizados pela massa fresca (MF) e as concentrações destes pigmentos determinadas de acordo com as fórmulas modificadas segundo Chow & Wanderley (com. pess.):

$$\text{Clorofila } a \text{ (}\mu\text{g.g MF}^{-1}\text{)} = 11,0607 \times \text{Abs664}$$

$$\text{Carotenoides (}\mu\text{g.g MF}^{-1}\text{)} = (1000 \times \text{Abs480}) - (0,89 \times \text{clorofila } a) / 245$$

onde, Abs664 e Abs480 correspondem às absorbâncias registradas em 664 nm e 480 nm.

Os protocolos originais de pigmentos, ficobiliproteínas, clorofila e carotenoides totais, descrevem a quantificação das absorbâncias em cubeta de quartzo com percurso óptico de 1 cm. A fim de transpor a metodologia para espectrofotômetro de microplacas de 96 poços foi necessário realizar alguns testes para equiparar o percurso óptico de 1 cm utilizando uma microplaca de 96 poços. Para tal, diferentes volumes de amostra na microplaca foram analisados e comparados com as absorbâncias obtidas na cubeta de 1 cm de percurso óptico, resultados descritos no Anexo II.

4.8 Potencial antioxidante

O potencial antioxidante foi avaliado mediante cinco ensaios diferentes. Para tal, amostras de 200 mg MF foram trituradas em nitrogênio líquido até um fino pó. A extração foi realizada em 1 mL de metanol por 3 h a temperatura ambiente e protegida da incidência da luz. Os extratos foram centrifugados a 14.000 rpm por 15 min e temperatura ambiente. Os sobrenadantes foram testados em cinco concentrações de extrato bruto: 0, 6, 8, 10, 12 e 13,3 mg.mL⁻¹. Os resultados foram expressos em porcentagem de atividade antioxidante, equivalente padrão usando os padrões ácido gálico e trolox e EC50 (concentração efetiva que induz metade do efeito máximo). Para realização dos cálculos de EC50 foi utilizado o programa GraphPad Prism 6. Os cinco

ensaios do potencial antioxidante foram sequestro do radical DPPH, sequestro do radical ABTS, poder redutor pelo reagente de Folin-Ciocalteu, quelante de metais e poder de redução de ferro (FRAP).

O ensaio de sequestro do radical DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) é baseado na captura do radical DPPH por antioxidantes, produzindo um decréscimo da absorbância a 515/517 nm. No ensaio ocorre uma reação de oxi-redução, onde o DPPH, que apresenta coloração violeta, é reduzido (o elétron desemparelhado do N se emparelha com o elétron cedido pelo radical H de um oxidante), tornando a reação amarelada e ocorrendo a formação de DPPH-H, reduzido e estável. Este ensaio foi baseado segundo descrito em Pires et al. (em preparação), modificado de Brand-Williams et al. (1995) e Rufino et al. (2007).

O potencial de sequestro do radical ABTS (2,2-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) é um dos métodos mais utilizados e o seu fundamento é baseado na captura do ABTS. Com essa metodologia pode-se medir a atividade antioxidante de substâncias de natureza hidrofílica e lipofílica. Este ensaio foi baseado em Torres et al. (em preparação), modificado de Rufino & Alves (2007) e Yang et. al. (2011).

A capacidade redutora do Folin Ciocalteu baseia-se na propriedade redutora das substâncias fenólicas que reage com o reagente de Folin-Ciocalteu em condições alcalinas. As substâncias fenólicas reagem com o reagente de Folin-Ciocalteu, uma mistura de ácido fosfotúngstico-fosfomolibdico, apenas em condições alcalinas alcançadas com a adição de carbonato de sódio (Na_2CO_3), ocorrendo dissociação de um próton fenólico e levando à formação do ânion fenolato. O ânion mais propenso a doar elétrons e capaz de reduzir o reagente, ou seja, tem maior capacidade redutora, formando assim um complexo azul de molibdênio. Este método não apenas reage com compostos fenólicos, senão que também com outros compostos redutores como ácido ascórbico e açúcares redutores. Este protocolo é descrito em Pires et al. (em preparação), modificado de Singleton & Rossi (1965) e Waterman & Mole (1994).

O potencial quelante de metais foi realizado seguindo o método descrito em Harb et al. (em preparação), modificado de Min et al. (2011). Este ensaio é baseado na utilização do reagente ferrozina que é um composto amplamente utilizado na determinação de Fe^{2+} . Na presença de Fe^{2+} , a ferrozina forma um complexo de cor rosácea, cuja absorbância pode ser medida no comprimento de onda de 562 nm. O

método determina a quantidade remanescente de íons ferro não quelados na mistura de reação, ou seja, aqueles que os agentes quelantes presentes no extrato testado não conseguiram quelar.

O ensaio do potencial de redução do ferro (FRAP) foi baseado em Urrea-Victoria et al. (em preparação), modificado de Brito et al. (2006). Este método surgiu como uma alternativa para determinar a redução do ferro em fluidos biológicos e soluções aquosas de compostos puros. Em pH ácido, o complexo tripiridil hidrazina férrica (Fe^{3+} TPTZ) se reduz (produzindo intensa cor azul), o que pode ser monitorada pela medida da absorbância no comprimento de onda de 595 nm. A reação é não específica e qualquer reação com baixo poder redutor, sob as condições de reação estabelecida, irá formar o íon ferroso (Fe^{2+}) a partir do íon férrico (Fe^{3+}). A mudança na absorbância está diretamente relacionada com o poder redutor total dos antioxidantes doadores de elétrons, presentes na mistura de reação.

Maiores detalhes dos protocolos de potencial antioxidante e das respectivas curvas padrões são descritos no Capítulo II.

4.9 Processamento para análise em microscopia de luz **(ML)**

Cerca de 5 mm de amostra foram fixadas em solução de paraformaldeído 2,5% em tampão fosfato 0,2 M, pH 7,2, por 12 h a temperatura de 4°C. Após a fixação, o material foi lavado no mesmo tampão fosfato, duas vezes, por 30 min em cada lavagem (Bouzon, 1993). Os procedimentos de desidratação e posteriores a este foram realizados em colaboração com a Dra. Zenilda L. Bouzon e o Dr. Éder C. Schmidt da Universidade Federal de Santa Catarina. Após a fixação, as amostras foram desidratadas em uma série de soluções aquosas de etanol em concentrações crescentes (30, 50, 70, 90 e 100%), a cada 30 min à temperatura ambiente. Após a desidratação, as amostras foram pré-infiltradas com etanol a 100% em historesina glicolmetacrilato (GMA) na proporção 1:1, durante 4 h. Posteriormente, o material foi infiltrado em resina pura por 24 h. A inclusão foi feita em histomoldes, adicionando-se polimerizador à mesma resina, à temperatura ambiente por 2-3 h (Arnold et al. (1975), modificado). Ao término do processo de inclusão, as amostras foram seccionadas em micrótomo manual de parafina

modelo LEICA RM 2135, com navalhas de tungstênio. Secções longitudinais foram feitas com espessura de 4 µm, coletadas com pinça e distendidas em lâminas de vidro com gotas de água destilada e secas a 37°C em placa quente por 30 min. As amostras foram processadas para análises histoquímicas com as técnicas de azul de toluidina (ATO), ácido periódico de Schiff (PAS) e azul brilhante de Coomassie (CCB).

O azul de toluidina (ATO) foi utilizado para identificar polissacarídeos ácidos através da reação de metacromasia. As lâminas contendo as secções foram tratadas com solução aquosa de AT-O 0,5%, acidificadas com HCl 1 N para pH 3,0 por 30 seg, lavadas em água destilada e secas ao ar (Gordon & McCandless, 1973). As lâminas foram montadas em bálsamo do Canadá. Os cortes foram observados e fotografados em microscópio de luz Olympus com sistema de captura de imagem, câmara digital (Olympus Q-Color-3C América ind.). Através deste sistema de captura foram observadas as espessuras das paredes celulares e o citoplasma de todos os tratamentos.

A técnica de ácido periódico de Schiff (PAS) foi utilizada para identificar a presença de polissacarídeos neutros (amido e celulose). As secções foram oxidadas com solução aquosa de ácido periódico a 1% durante 30 min., lavadas em água corrente e coradas com reativo de Schiff por 30 min. Foram então, lavados em água corrente, secos ao ar e montados com bálsamo do Canadá (Gahan, 1984). Os cortes foram observados e fotografados em microscópio de luz Olympus com sistema de captura de imagem, câmara digital (Olympus Q-Color-3C America ind.).

Para marcar a presença de proteínas foi utilizado o azul brilhante de Coomassie (CCB). As lâminas contendo as secções foram coradas por 45 min em CCB 4% diluída em solução etanólica acidificada de Clark. Posteriormente, foram lavadas na mesma solução, seguido de água destilada e secas ao ar (Gahan, 1984). Os cortes foram observados e fotografados em microscópio de luz Olympus com sistema de captura de imagem, câmara digital (Olympus Q-Color-3C America ind.).

4.10 *Análises estatísticas*

Cada experimento foi realizado com cinco repetições para cada tratamento. Os resultados foram avaliados a partir de análise de variância (ANOVA) bifatorial, exceto para os resultados de taxa de crescimento e desempenho fotossintetizante, e testes *a posteriori* de Newman-Keuls foram aplicados de acordo com a significância das

análises ($p < 0,05$). Os resultados de taxa de crescimento e desempenho fotossintetizante foram analisados com ANOVA de medidas repetidas e teste *a posteriori* de Newman-Keuls ($p < 0,05$). Antes da execução de cada análise foram avaliadas as distribuições normais (teste de Kolmogorov-Smirnov) e a homocedasticidade das variâncias (teste de Bartlett). Todas as análises foram realizadas dentro de um intervalo de confiança de 95% ($p < 0,05$). Análises estatísticas foram avaliadas com o programa STATISTICA v. 10.0, segundo descrição de Zar (1999). Com o conjunto dos dados de cada capítulo foi realizada uma análise de componentes principais (PCA) com o auxílio do programa Past.

5 Referências

- AlgaeBase. 2016a. *Bostrychia* Montagne, 1842, nom. et typ. Cons. Disponível em: http://www.algaebase.org/search/genus/detail/?genus_id=J87d2b89a36520a4d&-session=abv4:AC1F074113ae822E39JkD0FFE6E5/. Acesso em: 7/08/2016.
- AlgaeBase. 2016b. *Bostrychia radicans* (Montagne) Montagne. Disponível em: http://www.algaebase.org/search/species/detail/?species_id=A4adddf2ec5b650f1/. Acesso em: 7/08/2016.
- Andrade, L.R.D.E., Farina, M. & Filho, G.M.A. 2002. Role of (Dictyotales, Phaeophyceae) cell walls in cadmium accumulation. *Phycologia*, 41: 39–48.
- Arnold, W., Mitrenga, D. & Mayresbach, H. 1975. Gefriertrocknung und einbettung in glycolmethacrylat (GMA). Ergebnisse Histochemischer Reaktionen. *Acta Histochem.*, 14: 271-277.
- Benavides, M.P., Gallego, S.M. & Tomaro, M.L. 2005. Cadmium toxicity in plants. *Brazilian Journal Plant Physiology*, 17(1): 21–34.
- Bouzon, Z. L., Ferreira, E. C., dos Santos, R., Scherner, F., Horta, P. A., Maraschin, M., & Schmidt, E. C. 2012. Influences of cadmium on fine structure and metabolism of *Hypnea musciformis* (Rhodophyta, Gigartinales) cultivated in vitro. *Protoplasma*, 249(3): 637–50
- Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 11: 248-254
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E. & Berset, C. 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Food Science and Technology*, 28: 25-30.
- BRASIL. 1981. LEI No 6.938, DE 31 DE AGOSTO DE 1981. Available at: http://www.oas.org/dsd/fida/laws/legislation/brazil/brazil_6938.pdf. Acesso em: 20/01/2016.
- Brinza, L., Nygård, C. A., Dring, M. J., Gavrilescu, M., & Benning, L. G. 2009. Cadmium tolerance and adsorption by the marine brown alga *Fucus vesiculosus* from the Irish Sea and the Bothnian Sea. *Bioresource Technology*, 100(5):1727–1733.
- Cardoso, L.M.N. & Chasin, A.A.M. 2001. Ecotoxicologia do cádmio e seus compostos. *Caderno de referência ambiental*, 6: 1-122.
- CETESB. 1990. Ação da CETESB em Cubatão: situação em janeiro de 1990. *CETESB, Relatório Técnico, São Paulo*. 1-33.
- CETESB. 2001. Sistema Estuarino de Santos e São Vicente. *CETESB:Relatório Técnico, São Paulo*. 1-141.

- Chen, S.L. & Kao, C.H. 1995. Glutathione reduces the inhibition of rice seedlings root growth caused by cadmium. *Journal of Plant Growth Regulation*, 16: 249-252.
- Collen, J., Pinto, E., Pedersen, 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.
- Creed, M., Fujii, M. T., Barreto, M. B. de B., Guimarães, S. M. P. de B., Cassano, V., Pereira, S. M. B. & Khader, S. 2010. Rhodophyceae. In: *Catálogo de plantas e fungos do Brasil*. Forzza, R.C. Eds, 1: 416-436.
- Cunha, S. & Costa, C., 2002. Gradientes de salinidade e frequência de alagamento como determinantes da distribuição e biomassa de macroalgas associadas a troncos de manguezais na Baía. *Notas técnicas Facimar*, 6: 93-102.
- Cunha, S. R. & Duarte, N.R. 2002. Taxas fotossintéticas e respiratórias de macroalgas do gênero *Bostrychia*. *Notas técnicas Facimar*, 6: 103-110.
- Diannelidis, B. & Delivopoulos, S.G. 1997. The effects of zinc, copper and cadmium on the fine structure of *Ceramium ciliatum* (Rhodophyceae, Ceramiales). *Marine Environmental Research*, 44(2): 127-134.
- Edwards P. 1970. Illustrated guide to the seaweeds and sea grasses in the vicinity of Porto Aransas. *Texas. Contr. Mar.*, 15: 1-228.
- Eston, V. R., Yokoya, N. S., Fujii, M. T., Braga, M. T., Plastino, E. M. & Cordeiro-Marino, M. 1991. Mangrove macroalgae in southeastern Brazil: spatial and temporal patterns. *Revista Brasileira Biologia*, 1(4): 829-837.
- Eisenbud, M. 1987. Environmental Radioactivity. *Orlando, Academic Press*.
- Figueroa, F. L., Conde-Alvarez, R., & Gomez, I. 2003. Relations between electron transport rates determined by pulse amplitude modulated chlorophyll fluorescence and oxygen evolution in macroalgae under different light conditions. *Photosynthesis Res.*, 75: 259-275.
- Fontes, K.A. de A., Pereira, S.M.B. & Zickel, C.S. 2007. Macroalgas do “bostrychietum” aderido em pneumatóforos de duas áreas de manguezal do Estado de Pernambuco, Brasil. *Iheringia - Serie Botanica*, 62(1-2): 31-38.
- Freshwater, D.W. & Rueness, J. 1994. Phylogenetic relationships of some European *Gelidium* (Gelidiales, Rhodophyta) species, based on *rbcL* nucleotide sequence analysis. *Phycologia*, 33: 187-194.
- Gahan, P. B 1984. Plant histochemistry and cytochemistry: an introduction. Academic, London
- García-Ríos, V., Robledo, D., Mendoza-Cózatl, D., Moreno-Sánchez, R. & Gold-Bouchot, G. 2007. Cell wall composition affects Cd²⁺ accumulation and intracellular thiol peptides in marine red algae. *Aquatic Toxicology*, 81(1): 65-72.
- Garnier, J., Billen, G., Némery, J. & Sebilo, M. 2010. Estuarine, coastal and shelf science transformations of nutrients (N, P, Si) in the turbidity maximum zone of

- the Seine estuary and export to the sea. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 90(3): 129–141.
- Gordon, E.M. & Mccandless, E.L. 1973. Ultrastructure and histochemistry of *Chondrus crispus* Stackhouse. In: Harvey, M.J., McLachlan, J. (ed.): *Chondrus Crispus*. 111-133. *Nova Scotian Institute Science, Halifax*.
- Grzyski, J., Johnsen, G. & Sakshug, E. 1997 The significance of intracellular self-shading on the bio-optical properties of brown, red and green macroalgae. *Journal Applied Phycology*, 33: 408–414.
- Harbison, P. 1986. Mangrove muds a sink and a source for trace metals. *Marine Pollution Bulletin*, 17: 246–50.
- Hortellani, M. A., Sarkis, J. E. S., Abessa, D. M. S., & Sousa, E. C. P. M. 2008. Avaliação da contaminação por elementos metálicos dos sedimentos do estuário Santos-São Vicente. *Química Nova*, 31(1): 10–19.
- Jassby, A.D., & Platt, T. 1976. Mathematical formulation of the relationship between photosynthesis and light for phytoplankton. *Limnology and Oceanography*, 21: 540-547.
- Jesus, T.B. de, Aguiar, W.M. de & Aleluia, F.T.F. 2015. Distribuição e biomassa de macroalgas associadas a troncos e raízes de manguezais na baía de todos os santos, BA. *Revista Brasileira de Ciências Ambientais*, 38: 12–20.
- Joly, A. 1954. The genus *Bostrychia* Montagne, 1838 in Southern Brazil. Taxonomic and Ecological Data. *Boletim da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras da Universidade de São Paulo*. 11: 55-74.
- Karsten, U., Koch, S., West, J. A. & Kirst, G. O. 1994. The intertidal red alga *Bostrychia simpliciuscula*. Harvey ex J. Agardh from a mangrove swamp in Singapore: Acclimation to light and salinity. *Aquatic Botany*, 48: 313-323.
- Krämer, U. & Clemens, S. 2005. Molecular biology of metal homeostasis and detoxification. In: Topics in Current Genetics, M. Tamás, Martinoia, E., (Eds.): 216- 271, Springer Verlag,
- Kursar, T.A., van der Meer, J. & Alberte, R.S. 1983. Light-harvesting system of the red alga *Gracilaria tikvahiae*. Biochemical Analyses of Pigments Mutation. *Plant Physiology*, 353–360.
- Lee, M.Y. & Shin, H.W. 2003. Cadmium-induced changes in antioxidant enzymes from the marine alga *Nannochloropsis oculata*. *Journal Applied Phycology*, :13–20.
- Machado, G.E.M. & Nassar, C.A.G., 2007. Assembléia de macroalgas de dois manguezais do núcleo picinguaba – parque estadual da serra do mar, São Paulo, Brasil. *Rodriguésia*, 58(4): 835–846.
- Marchiol, L., Leita, L., Martin, M., Peressotti, A., & Zerbi G. 1996. Physiological responses of two soybean cultivars to cadmium. *Journal of Environmental Quality*, 25: 562-566.

- McClusky, D. S. & Elliot, M. 2004. The estuarine ecosystem: ecology, threats and management. New York: Oxford University.
- Melville, F. & Pulkownik, A. 2007. Investigation of mangrove macroalgae as biomonitors of estuarine metal contamination. *The Science of the Total Environment*, 387(1-3): 301–309.
- Moreira, A. da S. 2007. Biossorção utilizando alga marinha. Tese de Doutorado. Universidade Federal do Rio Grande do Norte, *Engenharia Química*, 1-115.
- Murray, K. S. 1996. Statistical comparisons of heavy metal concentrations in river sediments. *Environmenta. Geology*, 27: 54–8.
- Narasimha Rao, G.M. 1995. Seasonal growth, biomass and reproductive behavior of three species of red algae in Godavari Estuary, India. *Journal of Phycology*, 31: 209-214.
- Odum, H.T. & Pigeon, R.F. 1970. A tropical rain forest—A study in irradiation and ecology at El Verde, Puerto Rico: National Technical Information Service, Springfield, 1678.
- Okpiliya, F. I., Effiong, E. B., Imoke, E., Eja, & Eja, I. 2013. Mangrove forest ecosystem utilization and depletion: implication for occupational changes in Calabar South, Nigeria. *European Journal of Sustainable Development*, 2: 149–162.
- Oliveira, E. C. 1984. Brazilian mangal vegetation with special emphasis on the seaweeds. In: Por, F. D & Dor, I. (org.) *Hyrobiology of the mangal*. Dr. W. Junk Publishers, The Hague.
- Penniman, C.A., Mathieson, A.C. & Penniman, C.E. 1986. Reproductive phenology and growth of *Gracilaria tikvahiae* McLachlan (Gigartinales, Rhodophyta) in the Great Bay Estuary, New Hampshire 1, XXIX, pp.147–154.
- Rodriguez, C. & Stoner, A.W. 1990. The epiphyte community of mangrove roots in a tropical estuary: Distribution and biomass. *Aquatic Botany*, 36: 117-126.
- Rufino, M. de S. M., Ricardo Elesbão Alves, R.E., Brito, E.S. de, Mancini Filho, J. & Moreira, A.V. B. 2006. Metodologia Científica: Determinação da atividade antioxidante total em frutas no sistema β -caroteno/ácido linoléico. *Comunicado Técnico on line*. ISSN 1679-6535.
- Santos, R.W. dos. 2011. A avaliação dos efeitos de cádmio na fisiologia e morfologia de *Gracilaria domingensis*, *Dissertação de Mestrado Universidade Federal de Santa Catarina. Departamento Biologia celular*. 50p
- Schaeffer-Novelli, Y. 1995. Manguezal: ecossistema entre a terra e o mar. São Paulo: *Caribbean Ecological Research*, 64 p.
- Schreiber, U. & Neubauer, C. 1990. O₂-dependent electron flow, membrane energization and the mechanism of non-photochemical quenching of chlorophyll fluorescence. *Photosynthesis Res.*, 25: 279-293.

- Schreiber, U., Schliwa, U. & Bilger, W. 1986. Continuous recording of photochemical and non-photochemical chlorophyll fluorescence quenching with a new type of modulation fluorometer. *Photosynthesis*, 10: 51-62.
- Sena, F.S., Menghini, R. P., Cassano, V. & Sebastiani, R. 2012. Macroalgal community of pneumatophores in a mangrove of Barnabé Island (Baixada Santista), SP, Brazil: preliminary analysis. *Communications in Plant Sciences*, 2(3-4): 149–151.
- Steinke, T.D. & Naidoo, Y. 1990. Biomass of algae epiphytic on pneumatophores of the mangrove, *Avicennia marina*, in the St. Lucia estuary. *S. Afr. J. Bot. S. Afr. Tydskr. Plantkd.*, 56(2): 226-232.
- Talarico, L. 2002. Fine structure and X-ray microanalysis of a red macrophyte cultured under cadmium stress. *Environmental Pollution*, 120(3): 813–821.
- Taylor, W.R. 1960. Marine algae of the Eastern Tropical and Subtropical Coasts of the Americas. Ann. Arbor: *University of Michigan Press*. 1-870.
- Vasconcelos, M.T.D. & Leal, M.F.C. 2001. Seasonal variability in the kinetics of Cu, Pb, Cd and Hg accumulation by macroalgae. *Marine Chemistry*, 74(1): 65–85.
- Visviki, I. & Rachlin, J.W. 1992. Ultrastructural changes in *Dunaliella minuta* following acute and chronic exposure to copper and cadmium. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 23: 420–425.
- Vonshak, A. & Maske, H. 1980. Algas: técnicas de crescimento e produção de biomassa, p.131-154. In: Coombs, J. & Hall, D. O. (Eds.), *Técnicas de Bioprodutividade e Fotossíntese*. 131-154.
- Wanderley, A. 2009. Influência da disponibilidade de nitrato sobre crescimento, atividade do nitrato redutase, composição química e captação de nitrato e fosfato em *Gracilariopsis tenuifrons* (Gracilariales, Rhodophyta). Dissertação de mestrado. Instituto de Biociências. Universidade de São Paulo, São Paulo. 140 p.
- Wilson, S.M., Pickett-Heaps, J.D. & West, J. A. 2002. Fertilization and the cytoskeleton in the red alga *Bostrychia moritziana* (Rhodomelaceae, Rhodophyta). *European Journal of Phycology*, 37(4): 509–522.
- Xia, J.R., Li, Y.J., Lu, J. & Chen, B. 2004. Effects of copper and cadmium on growth, photosynthesis, and pigment content in *Gracilaria lemaneiformis*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 73(6): 979–986.
- Yang, Z. & Chu, C. 2011. Towards understanding plant response to heavy metal stress. In: *Abiotic Stress in Plants - Mechanisms and Adaptations*. 59–78.
- Yokoya, N. S., Plastino, E. M., Braga, R. M. A., Fujii, M. T., Cordeiro-Marino, M., Eston, V.R. & Hararu, J. 1999. Temporal and spatial variations in the structure macroalgae associated with mangrove trees of Ilha do Cardoso, São Paulo State, Brazil. *Revista Brasileira de Botânica*, 22 (2): 195-204.
- Zuccarello, G.C. & West, J. A. 2003. Multiple cryptic species: molecular diversity and reproductive isolation in the *Bostrychia radicans*/*B. moritziana* complex

- (Rhodomelaceae, Rhodophyta) with focus on North American isolates. *Journal of Phycology*, 39: 948–959.
- Zuccarello, G.C. & West, J.A. 2006. Molecular phylogeny of the subfamily Bostrychioideae (Ceramiales, Rhodophyta): subsuming *Stictosiphonia* and highlighting polyphyly in species of *Bostrychia*. *Phycologia*, 45: 24–36.
- Zuccarello, G.C., Buchanan, J. & West, J.A. 2006. Increased sampling for inferring phylogeographic patterns in *Bostrychia radicans*/*Bostrychia moritziana* in the eastern USA. *Journal of Phycology*, 42: 1349–1352.

6 Anexos

6.1 Anexo I: Cultivo em laboratório de *B. radicans*

Inicialmente, o cultivo de *B. radicans* foi baseado nas condições descritas em Wilson et al. (2002) que trabalhou com o mesmo gênero.

A fim de verificar as condições de cultivo em laboratório foi utilizado *B. radicans* (Montagne) Montagne provindo do Canal da Piaçaguera (Cubatão, São Paulo) (Fig. A1). O material coletado foi triado e lavado com água da torneira para retirada do excesso de sedimento e epífitas. Em seguida, com água do mar filtrada e cultivada em água do mar filtrada e esterilizada de salinidade de 30 ups (obtida pela diluição com água ultrapura) acrescida com meio de cultura de von Stosch 50% (VS), $20 \pm 5 \mu\text{mol}$ fótons. $\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, $24 \pm 1^\circ\text{C}$, fotoperíodo de 14 h e aeração de 30 em 30 minutos. A cultura foi realizada na proporção de 1 g de massa de alga fresca em 1 L de meio de cultivo.

Figura A1: Exemplar de *Bostrychia radicans* (Montagne) Montagne.

O cultivo foi realizado durante 21 dias, sendo medida semanalmente a taxa de crescimento. Após os 21 dias, os resultados não foram satisfatórios, pois a alga teve decréscimo de crescimento e estava perdendo pigmentação.

Através destes dados decidimos modificar alguns parâmetros de cultivo. O primeiro fator a ser alterado foi a salinidade, porque no momento da coleta a salinidade medida foi de 20 ups, sendo este inferior ao fornecido pela literatura. Simultaneamente, decidimos mudar a incidência de luz, pois no ambiente onde as algas foram coletadas apresenta características de local exposto. Assim sendo, a salinidade de 30 ups foi reduzida para 25 ups e a incidência da luz de $20 \pm 5 \mu\text{mol f\acute{o}tons.m}^{-2}.s^{-1}$ passou a ser $40 \pm 5 \mu\text{mol f\acute{o}tons.m}^{-2}.s^{-1}$. Com esses novos parâmetros as algas foram cultivadas por mais 21 dias e os resultados mostraram que a alga não estava crescendo, porém não estava perdendo pigmentação e a biomassa se manteve estável, sem variação. Após esses resultados, foi realizado um novo experimento em que foi modificamos o meio de cultura, de 50% de VS as algas foram cultivadas em 100% de VS. Finalmente, nas condições de água do mar filtrada e esterilizada de salinidade de 25 ups, com meio de cultura de VS 100%, $40 \pm 5 \mu\text{mol f\acute{o}tons.m}^{-2}.s^{-1}$, $24 \pm 1^{\circ}\text{C}$, fotoperíodo de 14 h e aeração de 30 em 30 minutos, na proporção de 1 g.L^{-1} de cultivo, as algas começaram a apresentar boas condições de cultivo.

6.2 Anexo II: Adaptação do protocolo de pigmentos para microplaca de 96 poços

Os protocolos originais de pigmentos, ficobiliproteínas, clorofila e carotenoides totais, descrevem a quantificação das absorvâncias em cubeta de quartzo com percurso óptico de 1 cm. A fim de transpor a metodologia para espectrofotômetro de microplacas de 96 poços foi necessário realizar alguns testes para equiparar o percurso ótico de 1 cm utilizando uma microplaca de 96 poços. Para tal, diferentes volumes de amostra na microplaca foram analisados e comparados com as absorvâncias obtidas na cubeta de 1 cm de percurso óptico.

O protocolo original de análise de pigmentos fotossintetizantes utilizado pelo grupo de pesquisa utiliza leitura das absorvâncias em cubeta de quartzo de 1 cm de percurso óptico, condição essencial para utilizar as fórmulas descritas na literatura, visto que as fórmulas seguem o princípio da lei de Lambert-Beer. Além disso, para tal é utilizado o volume de 1 mL de amostra e uma leitura por vez. Assim, a fim de adaptar o protocolo para leitura em microplaca de 96 poços e otimizar a quantidade de material utilizado para análise e o tempo de leitura, diferentes volumes de amostra na microplaca foram avaliados a fim de obter a equivalência de 1 cm de percurso óptico.

Na tentativa de otimizar tempo e economizar materiais (material biológico e reagentes), verificamos que para o protocolo se manter precisaríamos de um percussor óptico de 1 cm. Com um paquímetro medimos a profundidade do poço da microplaca, onde verificamos que para alcançarmos um percussor óptico de 1 cm precisaríamos de 400 μ L de amostra na microplaca.

Realizamos os testes e obtivemos o seguinte gráfico (Fig. A2), onde podemos concluir que obtivemos a mesma tendência.

Figura A2: Espectro de absorbância padronizado por massa de alga fresca nos comprimentos de onda de 400 a 700 nm. A amostra Cubeta representa a cubeta de quartzo com volume de 1 mL de amostra e percurso óptico de 1 cm, a amostra Elisa corresponde à microplaca de 96 poços e volume de 400 μ L de amostra.

CAPÍTULO I

7 Estudos sobre o desempenho fisiológico de *Bostrychia radicans* (Montagne) Montagne sob o efeito de cádmio: crescimento, fotossíntese, pigmentos e proteínas.

Studies on physiological performance of *Bostrychia radicans* (Montagne) Montagne under cadmium effect: growth, photosynthesis, pigments and proteins.

7.1 Resumo

A contaminação das regiões costeiras por metais poluentes está diretamente relacionada ao desenvolvimento populacional e as atividades industriais. Dentre os metais tóxicos o cádmio tem sido identificado disponível no ambiente e por ser um metal não essencial, mas de fácil absorção pelos organismos, causa diversas alterações nas algas como: alterações celulares, redução na taxa de crescimento, nas concentrações de ficobiliproteínas e no desempenho fotossintetizante. Este estudo examinou o efeito do cádmio em *Bostrychia radicans*, provenientes de dois locais (não impactado e impactado). Ao longo de um período de 11 dias, as algas foram cultivadas em concentrações de 0, 6, 12, 18, 37 e 55 mg.L⁻¹ Cd, em condições laboratoriais. Foram avaliadas as taxas de crescimento, desempenho fotossintetizante (Fv/Fm e ETR), níveis de pigmentos fotossintetizantes e proteínas totais. A partir do terceiro dia de exposição ao Cd, a taxa de crescimento teve decréscimo em relação ao controle. Além disso, o Cd levou a uma mudança nos parâmetros de desempenho da fotossíntese, demonstrando uma redução no seu desempenho em relação ao controle para ambos locais, com uma diminuição no teor de pigmentos e proteínas totais. A PCA, considerando todos os parâmetros analisados neste estudo, mostrou que a exposição ao Cd afetou negativamente vários processos fisiológicos e bioquímicos em *B. radicans*.

7.2 Abstract

The contamination of coastal regions by pollutant metals is directly related to population growth and industrial activities. Among the toxic metals cadmium has been identified available in the environment and because it is a nonessential metal, but easily absorbed by the organisms, causes several changes in algae as cellular changes, reduction on growth rate, phycobiliprotein concentrations and photosynthetic performance. This study examined the effect of cadmium on *Bostrychia radicans* from two locations (not impacted and impacted). Over a period of 11 days, the algae were cultured in concentrations of 0, 6, 12, 18, 37 and 55 mg.L⁻¹ Cd under laboratory conditions. Growth rates, photosynthetic performance (Fv/Fm and ETR), photosynthetic pigment levels and total protein were evaluated. From the third day of exposure to Cd, the growth rate decreased related with the control treatment. Moreover, Cd led to changes in photosynthetic performance parameters demonstrating a reduction in performance compared to the control for both locations, with loss in pigment and total protein concentrations. The PCA, considering all the parameters analyzed in this study, showed that Cd exposition adversely affected multiple physiological and biochemical processes in *B. radicans*.

7.3 Introdução

Os manguezais desempenham inúmeras funções ecológicas, sendo considerados berçários de diversas espécies. Antigamente, os manguezais eram considerados áreas inóspitas, pois seriam fontes de numerosas doenças transmitidas por insetos. Economicamente, eram tidos como áreas inúteis, pois não serviam para a agricultura e não eram fontes de matéria prima de exploração. Porém, esses ambientes cumprem um importante papel ecológico, visto que servem de proteção natural de ambientes costeiros, formando uma barreira que reduz o impacto das inundações e evitando a erosão dessas áreas. Os sedimentos, predominantemente lodosos dos manguezais, devido às suas características físico-químicas, retêm grande quantidade de matéria orgânica e poluentes como metais (Menezes, 1999), servindo como sistema natural de barragem.

Com o crescente desenvolvimento populacional e das atividades industriais, aliado à falta de tratamento de resíduos, diversos rejeitos têm sido indevidamente despejados nos corpos d'água, causando contaminação em regiões costeiras e afetando de forma imensurável diversos organismos que ali habitam. O Pólo Industrial de Cubatão, em São Paulo (23°53'57,53"S e 46°22'49,76"O), foi conhecido internacionalmente nos anos 80 pela grande quantidade de poluentes químicos lançados sem controle no meio ambiente, provocando sérios problemas no sistema estuarino da Baixada Santista (Hortellani et al., 2008). Dentre os poluentes, um alto potencial de cádmio (Cd) tem sido identificado no ambiente, um metal não essencial, mas de fácil absorção pelos organismos.

No sistema estuarino da Baixada Santista, os manguezais são produtivos ecossistemas, pois hospedam abundantes macroalgas epífitas que ocorrem nas superfícies de troncos e raízes dos mangues. As macroalgas representam uma fonte significativa de produção primária nos manguezais e constituem importantes fontes de energia e elementos minerais para as redes tróficas estuarino-lagunares (Rodriguez & Stoner, 1990; Steinke & Naidoo, 1990; Karsten et al., 1994; Narasimha Rao, 1995). Diversos estudos têm mostrado significativas alterações nas algas devido à exposição de Cd, incluindo alterações na organização ultraestrutural (Talarico, 2002; Andrade et al., 2002; Santos et al., 2013), decréscimo na taxa de crescimento (Collen et al., 2003; Xia et al., 2004; Bouzon et al., 2012) e diminuição na concentração de ficobiliproteínas, interferindo na absorção de energia luminosa e sua consequente transferência para os centros de reação dos PSI e PSII (Xia et al., 2004; Felix et al., 2014).

A macroalga vermelha *Bostrychia radicans* (Montagne) Montagne é uma espécie cosmopolita, com ocorrência em todo o litoral brasileiro nas zonas de manguezais (Joly, 1954; Taylor, 1960; Oliveira, 1984; Oliveira, 2009). Apesar de ser uma alga de grande importância ecológica nos manguezais, não há nenhum dado ecotoxicológico na literatura envolvendo este organismo ao estresse por Cd. Portanto, este estudo tem por objetivo analisar os potenciais efeitos nocivos do Cd nas taxas de crescimento, desempenho fotossintetizante, pigmentos e teor de proteínas de *B. radicans*.

7.4 Material e métodos

Amostras de *Bostrychia radicans* foram coletadas no Rio Una, situado na Estação Ecológica Juréia-Itatins, Peruíbe, SP (24°26'8,52"S e 47°4'45,85"O), caracterizado por ser um local com pouca interferência antrópica, portanto, neste estudo foi considerado como local não impactado (local controle), e no Canal de Piaçaguera, Cubatão, SP (23°53'57,53"S e 46°22'49,76"O), local reportado na literatura como sendo uma área impactada (Hortellani et al., 2008). O material foi transportado até o Laboratório de Algas Marinhas Edison José de Paula da Universidade de São Paulo, onde foi triado, lavado com abundante água do mar filtrada e limpo de macroepífitas e fauna acompanhante. As algas limpas foram aclimatadas durante sete dias sob condições controladas de laboratório: água do mar esterilizada e diluída em água ultrapura para obter salinidade de 25 ups, densidade de fluxo fotônico de $40 \pm 5 \mu\text{mol f\acute{o}tons.m}^{-2}.s^{-1}$, fotoperíodo de 14 horas de luz, temperatura de $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$ e aeração em períodos intermitentes de 30 min ligado 30 min desligado. Após o período de aclimação, o material foi dividido em conjuntos de 1 g de alga e cultivado em 1 L de meio de cultivo em frascos Erlenmeyer contendo: 0 (controle), 6, 12, 18, 37 e 55 mg.L^{-1} de cádmio ($n = 5$). As concentrações de Cd foram escolhidas baseadas no estudo de Talarico (2002) e Xia et al. (2004). O experimento teve duração de 11 dias, na qual a taxa de crescimento e o desempenho fotossintetizante foram analisados nos dias 0, 3, 5, 8 e 11 e os teores de pigmentos e de proteínas foram avaliados antes do início do experimento e após 11 dias.

A indentificação taxonômica por biologia molecular foi realizada com material acondicionado em sílica gel ($n = 2$ para cada local). Amostras de 20 mg de algas foram extraídos o DNA utilizando o kit *NucleoSpin Plant II* (Macherey- Nagel, EUA). Após a extração foi feita a reação em cadeia da polimerase (PCR) do marcador codificante para

a subunidade grande (*rbcL*). O produto do PCR foi purificado e sequenciado usando-se o kit *BigDyeTM Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction* (Applied Biosystems, EUA). As sequências obtidas foram alinhadas usando o programa *BioEdit Sequence Alignment Editor* 7.0.4.1. Cada sequência foi comparada com as sequências do GenBank. As sequências do marcador *rbcL* de todas as amostras e das amostras do GenBank foram alinhadas em uma matriz no programa MEGA 7 e realizada uma árvore filogenética por máxima verossimilhança.

A taxa de crescimento foi calculada a partir da massa fresca (MF) da alga segundo a equação de Penniman et al. (1986): $TC (\% \cdot \text{dia}^{-1}) = [(Mf / Mi)^{(1/t)} - 1] \times 100$; onde Mf = massa fresca após t dias, Mi = massa fresca inicial, t = tempo experimental em dias. Os valores das taxas de crescimento foram todos representados em relação ao tratamento controle, concentração 0 mg.L⁻¹.

O desempenho fotossintetizante foi avaliado mediante análises da fluorescência *in vivo* da clorofila *a* do PSII utilizando um fluorímetro de amplitude de pulso modulado PAM-2500 (Walz, Alemanha). O rendimento quântico máximo (Fv/Fm) foi avaliado em amostra pré-aclimatadas ao escuro por 15 min e calculado segundo Schreiber et al. (1986). Curvas de fotossíntese-irradiância (P-I) foram estimadas a partir de curvas de taxa de transporte de elétrons (ETR) sob oito intensidades crescentes de radiação fotossinteticamente ativa (PAR: 0, 24, 61, 81, 108, 186, 301, 456, 752 e 901 μmol fótons.m⁻².s⁻¹). O ETR foi calculado como $ETR = Y(II) \times PAR \times A \times 0,15$; sendo Y(II) o rendimento quântico efetivo (Schreiber & Neubaer, 1990), A a absorptância dos talos medida segundo Mercado et al. (1996) e 0,15 a fração de clorofila associada ao PSII para algas vermelhas (Grymski et al., 1997; Figueroa et al., 2003). A partir das curvas P-I foram determinados o ETR máximo (ETR_{max} em intensidade PAR de saturação), a eficiência fotossintetizante (α) e a intensidade de saturação fotossintetizante (Ik), segundo os ajustes de Jassby & Platt (1976). Adicionalmente, para cada curva P-I foram calculadas as áreas sob a curva.

Análises dos teores de ficobiliproteínas, proteínas solúveis totais, clorofila *a* e carotenoides totais foram realizadas a partir de amostras de 70 mg MF. As amostras foram extraídas em 1 mL de tampão fosfato de sódio 0,05 M e pH 5,5 e os sobrenadantes analisados em espectrofotômetro de microplacas UV-visível (Epoch Biotek, EUA) para ficobiliproteínas segundo as fórmulas de (Kursar et al., 1983) e para proteínas solúveis totais pelo método de Bradford (1976). Para proteínas foi usando soro

de albumina de bovino (BSA) como padrão (0-16 µg BSA; $y = 0,0419x - 0,04406$; $R^2 = 0,8998$). Logo, o material sedimentado (pellet) do extrato acima foi extraído em metanol por 3 h no escuro e 4°C. A partir do sobrenadante foi estimado o teor de clorofila *a* e de carotenoides totais seguindo os procedimentos descritos em Wanderley (2009) e as fórmulas de Wanderley (2009) modificadas de Lichtenthaler & Buschmann (2001).

Os resultados de cada parâmetro foram analisados com cinco repetições para cada tratamento e avaliados estatisticamente através do programa Statistica 10, utilizando análise de variância (ANOVA) unifatorial com medidas repetidas para os resultados de taxa de crescimento e desempenho fotossintetizante e ANOVA unifatorial para os resultados de conteúdo pigmentar e proteínas. Testes *a posteriori* de Newman-Keuls ($p < 0,05$) foram aplicados às análises que mostraram diferenças significativas. Cada conjunto de dados foi previamente avaliado na sua normalidade (teste de Kolmogorov-Smirnov) e homocedasticidade das variâncias (teste de Bartlett) sob a significância de $p < 0,05$. Com o conjunto dos dados foi realizada uma análise de componentes principais (PCA) com o auxílio do programa Past.

7.5 Resultados

7.5.1 Identificação taxonômica por biologia molecular

A identidade taxonômica do material foi verificada mediante técnicas de biológica molecular, usando o marcador *rbcL*. A Figura 6 apresenta a árvore filogenética de *B. radicans* por máxima verossimilhança para o marcador *rbcL* que gerou uma matriz com 25 sequências, sendo 11 sequências obtidas da base de dados do GenBank com as iniciais (AF, AY e GQ), 10 procedentes de Sena (2016), com as iniciais (IB) e as quatro sequências alvo deste estudo, duas sequências para o local não impactado (NI-1 e NI-2) e duas sequências para o local impactado (I-1 e I2). A amostra *Centroceras clavulatum* (GQ252450) foi utilizado como grupo externo. A árvore filogenética mostra que as sequências de *B. radicans* do local não impactado (NI) agruparam com *B. radicans* IB72, com uma divergência de 2,6%, as sequências do local impactado (I) agruparam com *B. radicans* (AY920823), com uma divergência de 1,3%, e entre os dois locais houve uma divergência de 7,5-12,6%, com esta divergência intraespecífica alta é possível dizer que se trata de duas espécies diferentes. No entanto,

como o complexo *B. radicans*/*B. moritziana* ainda não está bem definido, as sequências deste estudo serão denominadas de *B. radicans* 1 para o local não impactado (NI) e *B. radicans* 2 para o local impactado (I).

Figura 6: Árvore filogenética molecular construída pelo método da máxima verossimilhança para o marcador molecular *rbcL*. A porcentagem da taxa de grupos associados é mostrada ao lado dos ramos da árvore. A árvore foi desenhada em escala, com comprimentos dos ramos medidos com base no número de substituições por sítio. Os dados em vermelho representam às sequências obtidas pela espécie-alvo do presente estudo.

7.5.2 Taxa de crescimento (TC)

Os resultados comparando as taxas de crescimento entre as diferentes concentrações de Cd para o local não impactado e o local impactado são mostrados nas Figuras 7A e 7B, respectivamente.

As taxas de crescimento para os tratamentos nas concentrações mais altas de Cd (37 e 55 mg.L⁻¹) foram avaliadas até o quinto dia de experimentação, tanto para o local não

impactado quanto para o local impactado, devido à deterioração do material. A taxa de crescimento para o local não impactado (Fig. 7A) mostra que os tratamentos 6 e 12 mg.L⁻¹ de Cd não apresentaram diferença significativa ao longo do período experimental. O tratamento 18 mg.L⁻¹ teve no terceiro dia a maior queda na taxa de crescimento em comparação aos outros tratamentos de Cd e em relação a todos os tempos do experimento, ocorrendo uma recuperação no quinto e oitavo dia. A concentração de 37 mg.L⁻¹ de Cd teve diminuição na taxa de crescimento a partir do terceiro dia, mantendo na mesma taxa até o quinto dia (Fig. 7A). Na concentração de 55 mg.L⁻¹ houve queda no terceiro dia e uma queda maior no seu quinto dia, mantendo diferença estatística significativa com as outras concentrações estudadas.

Os resultados de taxa de crescimento para o local impactado (Fig. 7B) mostram que a concentração de 6 mg.L⁻¹ de Cd apresentou variação significativa apenas no 11º dia. A concentração de 18 mg.L⁻¹ apresentou queda na taxa de crescimento no oitavo dia, exibindo não ter diferença estatística com o dia 11 da mesma concentração de Cd e com o terceiro dia nas concentrações de 18 mg.L⁻¹ e 37 mg.L⁻¹. A concentração de 55 mg.L⁻¹ foi o que mostrou a maior queda na taxa de crescimento em relação a todas as outras concentrações (Fig. 7B).

De forma geral, para ambos os locais estudados é possível verificar que a taxa de crescimento foi influenciada na medida em que aumenta a concentração de Cd (Fig. 7), a influência para concentrações menores é observada com o avanço do tempo de experimento, enquanto que sob maiores concentrações uma redução na taxa de crescimento é observada em tempos menores de exposição ao Cd.

Figura 7 Taxa de crescimento (%.dia⁻¹) ao longo dos 11 dias de experimento, calculadas em relação à concentração controle (0 mg.mL⁻¹) para (A) algas do local não impactado e (B) algas do local impactado submetidas a diferentes concentrações de Cd: 6, 12, 18, 37 e 55 mg.mL⁻¹. Os valores representam média ± desvio padrão (n = 5). Letras distintas representam diferenças significativas (p < 0,05).

Análises separadas da taxa de crescimento para cada uma das concentrações de Cd, comparando ambos locais de estudo, foram realizadas e representadas na Figura 8. Na maioria das concentrações de Cd, algas procedentes de locais não impactados apresentaram maior redução na sua taxa de crescimento quando comparadas com as algas do local impactado (Fig. 8A-D), exceto para a concentração de 55 mg.L⁻¹ (Fig. 8E). Uma tendência diferente foi verificada para algas tratadas com 55 mg.L⁻¹, na qual algas procedentes de local não impactado tiveram uma queda menor na taxa de crescimento do que algas de local impactado (Fig. 8E). Como verificado na Figura 7, maiores quedas nas taxas de crescimento foram verificadas em concentrações maiores de Cd.

Figura 8 Taxa de crescimento (%.dia⁻¹) ao longo dos 11 dias de experimento, calculadas em relação à concentração controle (0 mg.mL⁻¹) para algas do local não impactado e algas do local impactado submetidas a diferentes concentrações de Cd: (A) 6 mg.mL⁻¹, (B) 12 mg.mL⁻¹, (C) 18 mg.mL⁻¹, (D) 37 mg.mL⁻¹ e (E) 55 mg.mL⁻¹. Os valores representam média $\pm$ desvio padrão (n = 5). Letras distintas representam diferenças significativas (p < 0,05).

7.5.3 Desempenho fotossintetizante

O rendimento quântico máximo (Fv/Fm; Fig. 9) mostra que no tratamento controle (0 mg.L⁻¹) não houve variação estatística significativa ao longo do tempo experimental, tanto para o local não impactado (Fig. 9A) quanto para o local impactado (Fig. 9B). Diferente dos tratamentos com Cd que mostram que quanto maior a concentração menor foi o desempenho fotossintetizante do organismo para ambos os locais. As maiores quedas no Fv/Fm foram observadas nos tratamentos de 12, 18, 37 e 55 mg.L⁻¹. As tendências no rendimento foram semelhantes para ambos os locais (Fig. 9A e 9B).

Figura 9 Rendimento quântico máximo (Fv/Fm) ao longo dos 11 dias de experimento para (A) algas do local não impactado e (B) algas do local impactado submetidas a diferentes concentrações de Cd: 0, 6, 12, 18, 37 e 55 mg.L⁻¹. Os valores representam média $\pm$ desvio padrão (n = 5). Letras distintas representam diferenças significativas (p < 0,05).

Análises separadas do Fv/Fm para cada uma das concentrações de Cd, comparando ambos locais de estudo, foram realizadas e representadas na Figura 10. Na concentração de 6 mg.L⁻¹ (Fig. 10A), foi observada queda no rendimento quântico de ambos os locais em comparação com o tratamento controle 0 mg.L⁻¹ a partir do terceiro dia de experimento. No entanto, de todas as concentrações de Cd avaliadas, esta foi a que menor efeito teve no Fv/Fm. Na Figura 10B, para o tratamento de 12 mg.L⁻¹, observa-se que a partir do terceiro dia os organismos dos dois locais apresentaram respostas iguais em relação ao rendimento quântico máximo, com queda significativa em relação ao controle e maior redução a partir do quinto dia. Na concentração de 18 mg.L⁻¹ (Fig. 10C) houve uma queda significativa a partir do terceiro dia em relação à concentração controle, tendo queda mais drástica a partir do quinto dia. Nas concentrações de 37 e 55 mg.L⁻¹ (Fig. 10D-E, respectivamente) pode-se verificar que ambos locais tiveram o rendimento quântico significativamente diminuído, no entanto, as amostras do local impacto tiveram maior queda no rendimento do que o local não impactado.

Figura 10: Rendimento quântico máximo (F_v/F_m) ao longo dos 11 dias de experimento para algas do local não impactado e algas do local impactado submetidas a diferentes concentrações de Cd: (A) 6 mg.L⁻¹, (B) 12 mg.L⁻¹, (C) 18 mg.L⁻¹, (D) 37 mg.L⁻¹ e (E) 55 mg.L⁻¹. Em cada um dos gráficos foi incluída a concentração de 0 mg Cd.L⁻¹ (concentração controle). Os valores representam média $\pm$ desvio padrão (n = 5). Letras distintas representam diferenças significativas (p < 0,05).

Os resultados das curvas P-I de taxa de transporte de elétrons (Fig. 11) indicam que o Cd interferiu no transporte de elétrons através do PSII. A taxa de transporte de elétrons (ETR) do tratamento 0 mg.L⁻¹ mostrou valores maiores em ambos os locais estudados (Fig. 11). Conforme aumento na concentração de Cd, a dinâmica da curva P-I foi diminuindo na sua magnitude, mostrando menores curvaturas para as maiores concentrações de Cd. Através do cálculo das áreas sob a curva de cada uma das curvas P-I é possível verificar a diminuição na taxa de transporte global entre os tratamentos

(Fig. 11C-D; gráfico de bolas), apresentando menores áreas para as maiores concentrações de Cd. No local não impactado as porcentagens de redução na área em relação ao controle 0 mg.L⁻¹ foram 38,11% para 6 mg.L⁻¹, 54,36% para 12 mg.L⁻¹, 68,97 para 18 mg.L⁻¹, 67,97% para 37 mg.L⁻¹ e 74,64% para 55 mg.L⁻¹. No local impactado as porcentagens de redução foram 24,72% para 6 mg.L⁻¹, 42,77% para 12 mg.L⁻¹, 38,56% para 18 mg.L⁻¹, 71,74% para 37 mg.L⁻¹ e 78,85% para 55 mg.L⁻¹.

Figura 11: Curva P-I de transporte de elétrons (ETR) versus PAR após três dias de experimento para algas do (A) local não impactado e (B) local impactado submetidas a diferentes concentrações de Cd: 0, 6, 12, 18, 37 e 55 mg.L⁻¹, e os respectivos valores de área sob a curva para algas do (C) local não impactado e (D) local impactado.

A taxa máxima de transporte de elétrons (ETR_{máx}) apresentou diferença significativa entre as concentrações de 0 mg.L⁻¹ para ambos os locais (Fig. 12A) e em relação aos outros tratamentos de Cd. As demais concentrações de Cd não apresentaram diferenças significativas entre os locais estudados e nem entre as concentrações, salvo algumas exceções. No entanto, é possível observar uma tendência de redução no ETR_{máx} na medida que a concentração de Cd aumenta.

A eficiência fotossintetizante (alfa; α) não apresentou diferença significativa entre as concentrações nem entre os locais (Fig. 12B), salvo para alguns tratamentos de maior concentração de Cd. Apesar desses resultados estatísticos, é possível observar uma

tendência de maior valor na eficiência fotossintetizante na concentração de 18 mg.L⁻¹ Cd do local não impactado.

A saturação luminosa (Ik) mostrou diferença significativa (Fig. 12C) entre as concentrações, com os maiores valores nas concentrações de 0 mg.L⁻¹ Cd para ambos os locais e os menores valores nas concentrações de 18, 37 e 55 mg.L⁻¹ Cd do local não impactado.

Figura 12: A) Taxa máxima de transporte de elétrons (ETR_{máx.}), (B) eficiência fotossintetizante (alfa) e (C) saturação luminosa (Ik) de *Bostrychia radicans* no período de três dias de experimento nas concentrações de 0, 6, 12, 18, 37 e 55 mg.L⁻¹ Cd, para os locais não impactado e impactado.

7.5.4 Pigmentos e proteínas totais

Os resultados do conteúdo pigmentar de *B. radicans* mostram que as ficobiliproteínas ficoeritrina (Fig. 13A e 13B), ficocianina (Fig. 13C e 13D) e a aloficocianina (Fig. 13E e 13F) apresentaram tendências similares para cada um dos dois locais estudados. Independentemente do local estudado, todas as concentrações de Cd apresentaram diferença significativa comparada com a concentração 0 mg.L⁻¹ (Fig. 13A-F). De forma geral, na medida em que aumenta a concentração de Cd, o teor de ficobiliproteínas foi diminuindo.

Em relação à clorofila *a*, no local não impactado (Fig. 13G) houve redução significativa em relação à concentração controle apenas nos tratamentos de 37 e 55 mg.L⁻¹. No local impactado (Fig. 13H), as maiores quedas na clorofila *a* foram nas concentrações de 6 e 12 mg.L⁻¹, seguido das concentrações de 37 e 55 mg.L⁻¹.

O teor de carotenoides também apresentou variação significativa entre os tratamentos. No local não impactado (Fig. 13I) as concentrações de 6 e 18 mg.L⁻¹ não apresentaram diferenças significativa comparada com a concentração 0 mg.L⁻¹. A concentração de 12 mg.L⁻¹ apresentou um aumento significativo comparado com a concentração controle e as concentrações de 37 e 55 mg.L⁻¹ foram significativamente menores que a concentração de 0 mg.L⁻¹. No local impactado (Fig. 13J), as concentrações de 6 e 12 mg.L⁻¹ não apresentaram diferenças significativas dentre elas, mas foram significativamente menores que as observadas na concentração de 0 mg.L⁻¹. As maiores diminuições no teor de carotenoides do local impactado foram observadas nos tratamentos de 18 mg.L⁻¹ e 37 mg.L⁻¹ (Fig. 13J). A concentração de 55 mg.L⁻¹ não apresentou diferença significativa quando comparada com a concentração de 0 mg.L⁻¹.

O conteúdo de proteínas solúveis totais (Fig. 14), independentemente do local de estudo, foi significativamente maior na concentração de 0 mg.L⁻¹ quando comparado com os teores de proteínas presentes nos demais tratamentos de Cd. Em termos gerais, as concentrações de proteínas foram maiores nos tratamentos do local impactado quando comparados com os tratamentos do local não impactado. Todos os tratamentos com Cd apresentaram menores teores de proteínas em relação ao respectivo controle 0 mg.L⁻¹.

Figura 13: Conteúdo pigmentar de *Bostrychia radicans* após 11 dias de experimento para algas submetidas a diferentes concentrações de Cd: 0, 6, 12, 18, 37 e 55 mg.L⁻¹ para o local não impactado (A) ficoeritrina, (C) ficocianina, (E) aloficocianina, (G) clorofila *a* e (I) carotenoides e para o local impactado (B) ficoeritrina, (D) ficocianina, (F) aloficocianina, (H) clorofila *a* e (J) carotenoides. Em cada um dos gráficos foi incluída o teor do respectivo pigmento antes de iniciar o experimento (Inicial). Os valores representam média ± desvio padrão (n = 5). Letras distintas representam diferenças significativas (p < 0,05).

Figura 14: Conteúdo de proteína solúveis totais de *Bostrychia radicans* após 11 dias de experimento para algas do local não impactado e algas do local impactado submetidas a diferentes concentrações de Cd: 0, 6, 12, 18, 37 e 55 mg.L⁻¹. Os valores representam média $\pm$ desvio padrão (n = 5). Letras distintas representam diferenças significativas (p < 0,05).

7.5.5 Análise de componentes principais (PCA)

A fim de analisar de forma integrada o efeito das diferentes concentrações de Cd nos dois locais estudados mediante os parâmetros avaliados (taxa de crescimento, desempenho fotossintetizante, pigmentos e proteínas) foi realizada uma análise multivariada PCA (Fig. 15). A PCA formada pelos componentes 1 e 2 permite explicar 81% das tendências dos resultados apresentados, com autovalores (*eigenvalue*) de 62% para a componente 1 e 19% para a componente 2 (Fig. 15). Adicionalmente, no Anexo no final deste capítulo são apresentados os autovalores para as componentes da PCA (Tabela A1) e os coeficientes de correlação de Pearson (r) e as probabilidades (Tabela A2).

Na Figura 15 os autovalores dos vetores da PCA-1 se correlacionam positivamente com todos os parâmetros estudados (Carot (carotenoides), Chl *a* (clorofila *a*), Proteínas, ALO (aloficocianina), FE (ficoeritrina), FC (ficocianina), ETR (taxa de transporte de elétrons), Fv/Fm (rendimento quântico máximo) e TC (taxa de crescimento). Unificando a PCA (Fig. 15) e o dendrograma de agrupamento (Fig. 16) é possível distinguir quatro agrupamentos entre os tratamentos, dois grupos isolados dos tratamentos I-0 (em vermelho) e I-55 (em marrom), um agrupamento incluindo os tratamentos I-6, NI-0 e I-12 (em laranja) e um grande agrupamento incluindo os

tratamentos NI-6, NI-12, NI-18, I-18, I-37, NI-37 e NI-55 (em azul). Em termos gerais, os tratamentos do local não impactado (6 a 55 mg.L⁻¹) se agruparam com as concentrações intermediárias do local não impactado (12 a 37 mg.L⁻¹), indicando a maior sensibilidade das amostras do local não impactado.

Figura 15: Ordenação biplot dos componentes 1 e 2 de *B. radicans* para os locais não impactado (NI) e impactado (I) nos diferentes tratamentos de concentração de Cd (0, 6 18, 37 e 55 mg.L⁻¹) em função das variáveis métricas de Carot (carotenoides), chl *a* (clorofila *a*), ALO (aloficocianina), FE (ficoeritrina), FC (ficocianina), ETR (área), Fv/Fm (rendimento quântico máximo) e TC (taxa de crescimento). A PCA identifica quatro agrupamentos: um grupo isolado do tratamento I-0 (em vermelho), outro grupo isolado do tratamento I-55 (em marrom), um agrupamento incluindo I-6, NI-0 e I-12 (em laranja) e um grande agrupamento incluindo NI-6, NI-12, NI-18, I-18, I-37, NI-37 e NI-55 (em azul).

Figura 16: Dendrograma obtido da análise de agrupamento hierárquico de *B. radicans* utilizando os locais não impactado (NI) e impactado (I) nos diferentes tratamentos de concentração de Cd (0, 6 18, 37 e 55 mg.L⁻¹).

7.6 Discussão

O aprofundamento nos estudos dos conjuntos de parâmetros fisiológicos (taxa de crescimento, desempenho fotossintetizante) e químicos (conteúdo pigmentar, proteínas solúveis totais) aqui apresentados tende a esclarecer o entendimento sobre o estresse causado pela exposição de Cd em *B. radicans* de dois locais diferentes um impactado com Cd e um local não impactado com Cd segundo a literatura.

Os resultados apresentados neste estudo mostram que *B. radicans* apresenta diferentes níveis de resposta dependendo do local de procedência das algas e a concentração de Cd. Mesmo apresentando uma alta divergência filogenética entre os locais, os parâmetros de taxa de crescimento e desempenho da fotossíntese apresenta ambos os controles iguais e se modificam com a indução do Cd. A taxa de crescimento é um dos principais parâmetros avaliados em estudos de ecotoxicidade, pois evidencia respostas fisiológicas do organismo teste. As concentrações de Cd aplicadas neste estudo causaram impacto negativo no crescimento de *B. radicans*, na qual concentrações maiores tiveram efeito mais rápido do que concentrações menores. Estes

resultados também têm sido observados para outras algas vermelhas como *Hypnea musciformes* (Wulfen) J. V. Lamouroux, na qual Bouzon et al. (2012) mostram redução das taxas de crescimento nas concentrações de 9, 18, 37 e 55 mg.L⁻¹ após sete dias de experimento. Para *Gracilaria lemaneiformis* (Bory) Greville (Xia et al., 2004) foi reportado decréscimo da taxa de crescimento de 46,3% para algas expostas a concentração de 18 mg.L⁻¹ e 89,4% na concentração de 37 mg.L⁻¹. Simonetti et al. (2016) em um estudo com *Palisada flagellifera* (J. Agardh) K. W. Nam observaram um decréscimo gradual no crescimento, quanto maior foi a concentração de Cd maior foi o decréscimo em relação à taxa de crescimento nesta alga. No caso de *B. radicans*, foi possível identificar que algas do local não impactado foram mais sensíveis em relação às respostas das taxas de crescimento que algas de local impactado. Estas variações na capacidade de tolerância podem estar ligadas aos mecanismos de aclimação e reparo dos danos causados pelo estresse ocasionado pela exposição ao Cd. Nesse sentido, algas que ocorrem em ambientes expostos a Cd apresentam maior tolerância ao metal do que algas que habitam ambientes que não apresenta este poluente no meio.

A fotossíntese é um processo metabólico fundamental nas algas, pois dela depende a sobrevivência e o desenvolvimento do organismo. Dessa forma, alterações no desempenho fotossintetizante podem refletir diferentes respostas ecofisiológicas. Neste estudo, as análises de desempenho da fotossíntese, mensurados através de parâmetros de rendimento quântico máximo, taxa de transporte de elétrons e pigmentos fotossintetizantes, demonstraram que houve redução gradativa em relação à concentração e ao tempo de exposição, quanto maior a concentração de Cd maior foi o decréscimo nestes parâmetros. Essas alterações podem estar associadas ao efeito do Cd na organização dos complexos fotossintetizantes, sabendo-se que as ficobiliproteínas estão localizadas nos ficobilissomos associados à porção externa dos tilacoides nos cloroplastos, a exposição ao Cd pode induzir a diminuição dos pigmentos acessórios causando uma menor absorção na energia luminosa, inibindo assim a fotossíntese.

Trabalhando com *Fucus vesiculosus* Linnaeus, Brinza et al. (2009) expuseram o material a concentrações de Cd de 0, 2, 18, 185 e 1.830 mg.L⁻¹ e observaram sensibilidade ao Cd em todas as concentrações estudadas, com decréscimo no Fv/Fm, com a maior queda na concentração de 1.830 mg.L⁻¹ (43,8%) em algas procedentes do mar de Bótnia. Já *F. vesiculosus* do mar da Irlanda mostrou maior tolerância ao Cd, pois

apresentou diferença significativa apenas na maior concentração de Cd (1.830 mg.L^{-1}), com decréscimo de 17% no Fv/Fm.

Esses trabalhos coincidem com os resultados observados neste estudo para *B. radicans*. Resultados semelhantes foram registrados no estudo de Santos (2011), na qual o autor encontrou decréscimo na quantidade de ficobiliproteínas e ETR ao tratar *Gracilaria domingensis* (Kutzing) Sonder ex Dickie com Cd nas concentrações de 18, 37 e 55 mg.L^{-1} . Nesse estudo, o autor atribuiu correlação entre o decréscimo de ficobiliproteínas e ETR e a concentração de Cd, pois ficobiliproteínas são pigmentos acessórios e quanto menor é o seu conteúdo, menor é a energia transferida para o PSII, causando assim um decréscimo no desempenho fotossintetizante.

Finalmente, este estudo demonstra que o Cd tem ações nocivas para *B. radicans*. Através dos parâmetros estudados de taxa de crescimento, desempenho fotossintetizante, teores de pigmentos e proteínas totais é possível evidenciar que esta espécie procedente de locais impactados apresenta elevada tolerância ao Cd em relação a algas de locais com menor impacto. A sensibilidade das respostas dos parâmetros estudados indica também que *B. radicans* seria uma espécie potencial como bioindicadora deste poluente, e os descritores fotossíntese e teor de pigmentos podem servir como avaliadores de toxicidade. Com estes resultados é possível recomendar que *B. radicans* seja usado como organismo bioindicador pelo fato de ser uma espécie cosmopolita e ter uma maior tolerância a ambientes impactados, demonstrado pelas suas maiores respostas em relação às respostas do material de local não impactado.

7.7 Referências

- Andrade, L.R.D.E., Farina, M. & Filho, G.M.A. 2002. Role of (Dictyotales, Phaeophyceae) cell walls in cadmium accumulation. *Phycologia*, 41:39–48.
- Bouzon, Z. L., Ferreira, E. C., dos Santos, R., Scherner, F., Horta, P. A., Maraschin, M., & Schmidt, E. C. 2012. Influences of cadmium on fine structure and metabolism of *Hypnea musciformis* (Rhodophyta, Gigartinales) cultivated in vitro. *Protoplasma*, 249(3): 637–50
- Bradford M. 1976. A rapid sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem*, 72: 248-254.
- Brinza, L., Nygård, C. A., Dring, M. J., Gavrilescu, M., & Benning, L. G. 2009. Cadmium tolerance and adsorption by the marine brown alga *Fucus vesiculosus* from the Irish Sea and the Bothnian Sea. *Bioresource Technology*, 100(5): 1727–1733.
- CETESB, 2001. Sistema Estuarino de Santos e São Vicente. *CETESB: Relatório técnico*, 1-141.
- Collen, J., Pinto, E., Pedersen, 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.
- Felix, M. R. de L., Osorio, L. K. P., Ouriques, L. C., Farias-Soares, F. L., Steiner, N., Kreusch, M., Pereira, D. T., Simioni, C., Costa, G. B., Horta, P. A., Chow, F., Ramlov, F., Maraschin, M., Bouzon, Z. L., Schmidt, É. C. 2014. The effect of cadmium under different salinity conditions on the cellular architecture and metabolism in the red alga *Pterocladia capillacea* (Rhodophyta, Gelidiales). *Microscopy and Microanalysis*, 20(05): 1411–1424
- Figueroa, F. L., Conde-Alvarez, R. & Gomez, I. 2003. Relations between electron transport rates determined by pulse amplitude modulated chlorophyll fluorescence and oxygen evolution in macroalgae under different light conditions. *Photosynthesis*, 75: 259–75.
- Grzymiski J., Johnsen G. & Sakshug E. 1997 The significance of intracellular self-shading on the bio-optical properties of brown, red and green macroalgae. *Jornaul. Phycology*. 33: 408–414.
- Hortellani, M. A., Sarkis, J. E. S., Abessa, D. M. S., & Sousa, E. C. P. M. 2008. Avaliação da contaminação por elementos metálicos dos sedimentos do estuario Santos-São Vicente. *Quimica Nova*, 31(1): 10–19

- Jassby A.D. & Platt, T. 1976. Mathematical formulation of the relationship between photosynthesis and light for phytoplankton. *Limnology and Oceanography*, 21: 540-547.
- Joly, A., 1954. The Genus *Bostrychia* Montagne, 1838 in Southern Brazil. Taxonomic and Ecological Data. *Boletim da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras da Universidade de São Paulo*, 11: 55-74.
- Karsten, U., Koch, S., West, J. A. & Kirst, G. O. 1994. The intertidal red alga *Bostrychia simpliciuscula*. Harvey ex J. Agardh from a mangrove swamp in Singapore: Acclimation to light and salinity. *Aquatic Botany*, 48: 313-323.
- Kursar, T.A., Meer, J.V.A.D. & Alberte, R.S. 1983. Light-harvesting system of the red alga *Gracilaria tikvahiae*. *Plant Physiology*, 73: 353-360.
- Menezes, G. V. 1999. Recuperação de manguezais: um estudo de caso na baixada santista, estado de São Paulo, Brasil. *Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo, Instituto Oceanográfico*, 164 p.
- Narasimha Rao, G.M. 1995. Seasonal growth, biomass and reproductive behavior of three species of red algae in Godavari Estuary, India. *Jornaul. Phycology*. 31:209-214, 1995.
- Oliveira, E. C. 1984. Brazilian mangal vegetation with special emphasis on the seaweeds. In: Por, I. D. & Dor, I. (eds.). *Hydrobiology of the mangal*. Dr. W. Junk Publishers, *The Hague*. 55- 65.
- Oliveira, A.L.L. de. 2009. Avaliação química e biológica de espécimens de *Bostrychia radicans* (Rhodomelaceae). *Dissertação mestrado. Universidade de São Paulo, Faculdade de ciências Farmacêutica*, 101p.
- Rodriguez, C. & Stoner, A.W. 1990. The epiphyte community of mangrove roots in a tropical estuary: Distribution and biomass. *Aquatic Botany*, 36:117-126.
- Santos, R.W. dos. 2011. A avaliação dos efeitos de cádmio na fisiologia e morfologia de *Gracilaria domingensis*. *Dissertação de Mestrado Universidade Federal de Santa Catarina. Departamento Biologia celular*. 50p
- Santos, R.W. dos, Schmidt, É.C. & Bouzon, Z.L. 2013. Changes in ultrastructure and cytochemistry of the agarophyte *Gracilaria domingensis* (Rhodophyta, Gracilariales) treated with cadmium. *Protoplasma*, 250(1):297-305.
- Schreiber, U. & Neubauer, C. 1990. O₂-dependent electron flow, membrane energization and the mechanism of non-photochemical quenching of chlorophyll fluorescence. *Photosynthesis*. 25: 279-293.
- Sena, F.S. de. 2016. Diversidade de espécies de macroalgas associadas ao manguezal da Ilha Barnabé, Baixada Santista, SP, Brasil, com base em “DNA Barcode”. *Dissertação de Mestrado Universidade de São Paulo. Departamento de Botânica*. 59p

- Simonetti, B., Schmidt, É.C., Pereira, D.T., Bouzon, Z.L. & Ouriques, L.C. 2016. Effects of cadmium on the morphology, pigments, and ultrastructure of *Palisada flagellifera* (Ceramiales, Rhodophyta) cultivated in vitro. *Brazilian Journal of Botany*, 39(2): 465–473.
- Steinke, T.D. & Naidoo, Y. 1990. Biomass of algae epiphytic on pneumatophores of the mangrove, *Avicennia marina*, in the St. Lucia estuary. *South African Journal of Botany*, 56(2):226-232.
- Talarico, L. 2002. Fine structure and X-ray microanalysis of a red macrophyte cultured under cadmium stress. *Environmental pollution*, 120(3): 813–821.
- Taylor, W.R. 1960. Marine algae of the eastern tropical and subtropical coasts of the Americas. *University of Michigan Press*. 1-870.
- Wanderley, A. 2009. Influência da disponibilidade de nitrato sobre crescimento, atividade da nitrato redutase, composição química e captação de nitrato e fosfato em *Gracilariopsis tenuifrons* (Gracilariales, Rhodophyta). *Dissertação de mestrado Instituto de Biociencias-Universidade de São Paulo*. 140 p.
- Xia, J.R., Li, Y.J., Lu. J. & Chen.B. 2004. Effects of copper and cadmium on growth, photosynthesis, and pigment content in *Gracilaria lemaneiformis*. *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, 73(6):979–86

7.8 Anexo – Dados complementares da análise de componentes principais (PCA).

Tabela A1: Autovalores para os componentes da análise de componentes principais (PCA).

Componentes	Autovalores (eigenvalues)	% variação
1	5,53	61,54
2	1,71	18,96
3	0,83	9,20
4	0,57	6,37
5	0,26	2,89
6	0,06	0,71
7	0,02	0,25
8	0,01	0,07
9	0,00	0,01

Tabela A2: Probabilidades ($p < 0,05$; em vermelho) e coeficientes de correlação de Pearson (r ; em preto) da análise de componentes principais (PCA) para os diferentes parâmetros estudados. As probabilidades destacadas em negrito indicam significância estatística ($p < 0,05$).

Parâmetros	TC	ETR(área)	Fv/Fm	FE	FC	ALO	Chl <i>a</i>	Carot	Prot
TC	---	0,0163	0,0025	0,1212	0,0364	0,1270	0,7784	0,9923	0,8710
ETR(área)	0,6739	---	0,0003	0,0793	0,0254	0,3030	0,6074	0,2053	0,0452
Fv/Fm	0,7845	0,8603	---	0,0137	0,0022	0,0108	0,7416	0,7565	0,6020
FE	0,4721	0,9354	0,6862	---	0,0009	0,0026	0,6930	0,0835	0,0074
FC	0,6069	0,9488	0,7910	0,9742	---	0,0076	0,8384	0,2157	0,0301
ALO	0,4657	0,9150	0,7027	0,9679	0,9600	---	0,4111	0,2072	0,0060
Chl <i>a</i>	-0,0911	0,1654	0,1066	0,1275	0,0698	0,2618	---	0,4015	0,1829
Carot	-0,0031	0,3938	0,1003	0,5195	0,3856	0,3923	0,2670	---	0,0977
Proteínas	0,0526	0,5862	0,1679	0,7270	0,6239	0,7394	0,4123	0,5002	---

CAPÍTULO II

8 Bioabsorção, potencial antioxidante e organização celular de *Bostrychia radicans* (Montagne) Montagne sob condições variáveis de cádmio.

Bioabsorption, antioxidant potential and cellular organization of *Bostrychia radicans* (Montagne) Montagne under variable conditions of cadmium.

8.1 Resumo

A poluição no ambiente aquático esta relacionada com o crescimento populacional e industrial, quando não há um devido tratamento para seus resíduos. Nos estuários do Brasil e do mundo há um índice alto de contaminação por metais poluentes e entre estes metais podemos encontrar o cádmio, um metal não essencial, mas de fácil absorção pelos organismos, que após seu acúmulo na célula pode causar diversas alterações fisiológicas e estruturais nos organismos. Este estudo visa caracterizar e entender respostas fisiológicas e histoquímicas através das análises de bioabsorção de Cd, variação da atividade antioxidante e as alterações histoquímicas da macroalga vermelha *Bostrychia radicans*, exposta a seis concentrações crescentes de Cd: 0, 6, 12, 18, 37 e 55 mg.L⁻¹. Os resultados mostram uma bioabsorção relacionada diretamente com a concentração de Cd. A atividade antioxidante nos diferentes ensaios variou conforme as concentrações de Cd. Nos testes histoquímicos apresentou espessamento de parede mais considerável nas amostras expostas as maiores concentrações de Cd e com presença de grão de amido em maior quantidade nas amostras tratadas nas concentrações de 6 e 12 mg.L⁻¹ Cd. Os dados evidenciam o potencial do uso deste organismo como bioindicador à poluição por Cd pela sua variação à exposição do metal.

8.2 *Abstract*

The pollution in aquatic environment is related to the population and industrial growths, which there is not appropriate wastewater treatment. In Brazilian and worldwide estuaries there are a high index of contamination by pollutant metals and within these metals it can find cadmium, a nonessential metal, but easily absorbed by organisms, which after its accumulation in the cells can cause diverse physiological and structural changes in organisms. This study aims to characterize and understand physiological and histochemical responses through the analysis of bioabsorption and variation of the antioxidant activity of the red seaweed *Bostrychia radicans* exposed to six increasing Cd concentrations: 0, 6, 12, 18, 37 and 55 mg.L⁻¹. The results showed a bioabsorption related directly to Cd concentration. The antioxidant activity from the different assays varied depending the Cd concentration. In histochemical tests showed more substantial wall thickening in samples exposed to higher concentrations of Cd and grain precense of starch in higher amounts in the samples treated at concentrations of 6 and 12 mg.L⁻¹ Cd. Data evidenced the potential use of this organism as Cd pollutant bioindicator due to its variation to metal exposure.

8.3 Introdução

No ambiente aquático, o aumento da poluição está diretamente relacionado com o crescimento populacional e industrial. Resíduos e efluentes gerados pelas residências e indústrias e lançados sem o devido tratamento tornam-se uma das principais fontes poluidoras dos sistemas aquáticos (Piotrowska-Niczyporuk et al., 2012). Entre os poluentes encontrados nos estuários do Brasil e em outros países, os mais comuns são os metais. Metais como zinco, ferro e cobre são essenciais para uma ampla gama de processos fisiológicos nos organismos fotossintetizantes, mas também podem se tornar tóxicos em concentrações elevadas. Já os metais arsênio, cádmio, chumbo e mercúrio são elementos não essenciais e altamente tóxicos (Kraemer & Clemens, 2005). O aumento na concentração de metais no interior de células e no organismo como um todo provoca fitotoxicidade, causando transtornos nos seus principais sistemas fisiológicos.

Nas algas é possível verificar diversas alterações devido à exposição a metais pesados, como aumento da espessura da parede celular, redução na taxa de crescimento, redução no conteúdo dos pigmentos fotossintetizantes, baixo desempenho na fotossíntese, acidificação do citoplasma, alterações na organização dos cloroplastos e redução na atividade mitocondrial, assim tendendo a tensões secundárias como estresse nutricional e estresse oxidativo, afetando o desenvolvimento e crescimento destes organismos (Andrade et al., 2002; Collen et al., 2003; Lee & Shin, 2003; Xia et al., 2004; Santos, 2011; Bouzon et al., 2012).

Quando ocorre a intoxicação por metais pesados acontece consequentemente a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), resultando em um desequilíbrio celular e no estado redox. Para reduzir o estresse oxidativo causado pela exposição de metais pesados, as algas utilizam diversos mecanismos de antioxição, incluindo enzimas tais como superóxido dismutase, catalase e glutational peroxidases, e substâncias antioxidantes como ascorbato, carotenoides, compostos fenólicos, flavonoides e tocoferóis (Pinto et al., 2003). As defesas contra estresse oxidativo são limitadas, pois quando expostas a concentrações elevadas de metais estes organismos apresentam baixa reação redox ao invés de aumento da atividade antioxidante (Schützendübel & Polle, 2002).

O Cd está se tornando um dos maiores contaminantes de ação antrópica (Chen & Kao, 1995), sendo propagado em nosso ambiente principalmente pelas atividades industriais, agroindustriais, metalúrgicas e incineração do lixo (Marchiol et al., 1996).

Ambientes com maior disponibilidade de cátions essenciais como Zn^{+2} e Ca^{+2} mostram um efeito protetor contra a toxicidade de Cd^{+2} (Antonovics, 1975). O Cd, por ele não ser um metal essencial, não existe uma via especializada para a absorção deste metal e sua absorção pelas células ocorre através de canais de Ca^{+2} (Perfus-Barbeoch et al., 2002). Essa via de transporte para dentro das células foi corroborada por Clemens (2006), que observou que em locais com baixas concentrações dissolvidas de Zn^{+2} e Ca^{+2} e com alta quantidade de íons de Cd^{2+} , os transportadores absorveram preferencialmente Cd^{2+} pois ele está em maior concentração no meio.

O Cd, após entrar nas células, começa um processo de armazenamento. Se a concentração deste metal excede um limiar, a célula, para evitar alcançar níveis tóxicos, ativa diferentes componentes celulares como compostos quelantes e peptídeos derivados de glutathione reduzido (GSH), como fitoquelatinas (PCs) e metalotioneínas (MTs) (Howe & Merchant, 1992; Hanikenne, 2003). As PCs podem ser consideradas como sensores diretos da presença de íons de metais ou metalóides, pois estas enzimas são diretamente ativadas na presença destes íons, e o Cd demonstrou ser o ativador mais potente (Grill et al., 1989; Suzuki et al., 2001).

A alga vermelha *Bostrychia radicans* (Montagne) Montagne é uma espécie cosmopolita de grande importância ecológica, encontrada em grande abundância nos manguezais do Brasil (Joly, 1954; Taylor, 1960). A região de Cubatão é considerada como uma das responsáveis pela poluição da região da baixada santista, em função da concentração do maior polo industrial do estado de São Paulo (Hortellani et al., 2008), constituída por extensas áreas estuarinas com ambientes de manguezais de extrema importância ecológica para a região. Dessa forma, este trabalho teve como objetivo verificar os efeitos do Cd em relação à sua absorção, variação da atividade antioxidante e alterações celulares em *B. radicans* submetida a diferentes concentrações do metal. Estudos com esta abordagem podem subsidiar e auxiliar relatórios e programas de monitoramento ambiental, utilizando *B. radicans* como uma espécie biorremediadora ou bioindicadora.

8.4 *Material e métodos*

8.4.1 **Coleta e cultivo**

Amostras de *Bostrychia radicans* foram coletadas no Rio Una, situado na Estação Ecológica Juréia-Itatins, Peruíbe, SP (24°26'8,52"S e 47°4'45,85"O), caracterizado por ser um local com pouca interferência antrópica e, portanto, considerado neste estudo como local controle (não impactado), e no Canal de Piaçaguera, Cubatão, SP (23°53'57,53"S e 46°22'49,76"O), local reportado na literatura como sendo uma área impactada (Hortellani et al., 2008) (local impactado). O material foi transportado até o Laboratório de Algas Marinhas Édison José de Paula da Universidade de São Paulo, onde foi triado, lavado com abundante água do mar filtrada e limpo de macroepífitas.

As algas limpas foram aclimatadas durante sete dias sob condições controladas de laboratório: água do mar esterilizada e diluída em água ultrapura para obter a salinidade de 25 ups, enriquecida com solução nutritiva de von Stosch 100% (VS; Ursi & Plastino (2001), modificada de Edward (1970)), proporção de cultivo de 1 g.L⁻¹, densidade de fluxo fotônico de 40 ± 5 μmol fótons.m⁻².s⁻¹, fotoperíodo de 14 horas, 25 ± 1°C e aeração em períodos intermitentes de 30 min.

Após o período de aclimação, as algas foram cultivadas durante 11 dias (período experimental) nas mesmas condições laboratoriais de aclimação e sob diferentes tratamentos (n = 5) na proporção de 1 g de alga por 1 L de meio de cultivo e seis concentrações de cádmio (Cd), adicionado como CdCl₂ (Sigma-Aldrich, Brasil): 0 (controle), 6, 12, 18, 37 e 55 mg.L⁻¹. As concentrações de Cd foram selecionadas a partir das concentrações estudadas por Talarico (2002) e Xia et al. (2004) para algas vermelhas. Após o período experimental as amostras foram analisadas quanto à capacidade de absorção de Cd, potencial antioxidante e variações ultraestruturais.

8.4.2 **Bioabsorção de cádmio**

A bioabsorção de Cd foi realizada a partir da quantificação do Cd retido na alga. Para tal, amostras de 70 mg de massa seca (MS) foram trituradas e digeridas adicionando 4 mL de HNO₃ concentrado e 2 mL de H₂O₂ durante 3 h e temperatura de 90°C. Após a digestão, adicionou-se água ultrapura até volume final de 25 mL e, em seguida, foram filtradas. As análises foram realizadas em espectrometria de absorção atômica com atomização por forno de grafite (GFAAS, modelo Analyst 800, Perkin Elmer) e as concentrações de Cd foram estimadas usando uma curva de calibração (0-

6,99 $\mu\text{g.L}^{-1}$ Cd; $y = 0,0553x - 0,008$; $R^2 = 0,995$). A bioabsorção de Cd foi expressa em %, calculado considerando a concentração de Cd adicionado no tratamento e o teor presente na amostra de alga.

8.4.3 Potencial antioxidante

O potencial antioxidante foi determinado a partir de amostras de 200 mg MF extraídas em 1 mL de metanol, mediante cinco diferentes ensaios: a) atividade sequestradora do radical DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) (Pires et al. (em preparação) modificado de Brand-Williams et al. (1995)), b) captura do radical livre ABTS (2,2-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) (Torres et al. (em preparação) modificado de Rufino & Alves (2007) e Yang et al. (2011)), c) capacidade redutora do Folin-Ciocalteu (Pires et al. (em preparação) adaptado de Singleton & Rossi (1965) e Waterman & Mole (1994)), d) potencial de quelar metais de ferro (Harb et al. (em preparação) modificado de Min et al. (2011)), e) poder de redução do ferro (FRAP; Urrea-Victoria et al. (em preparação) modificado de Brito et al. (2006)).

Todos os ensaios antioxidantes foram avaliados em seis concentrações de extrato bruto de alga: 0, 6, 8, 10, 12 e 13,3 mg.mL^{-1} . As atividades antioxidantes foram expressas através de porcentagem de atividade antioxidante, equivalente padrão de ácido gálico e Trolox (mg.g^{-1}) e EC50 (mg.mL^{-1} ; concentração efetiva do extrato que induz 50% da atividade antioxidante máxima). Para o cálculo de equivalentes padrão foram realizadas curvas padrões de ácido gálico (Sigma-Aldrich, Brasil) e Trolox (Sigma-Aldrich, Brasil) descritas na Tabela 2. Para os dados de atividade antioxidante sob as diferentes concentrações de Cd foram realizados ajustes polinomiais a fim de comparar as tendências dos resultados.

8.4.4 Microscopia de luz (ML)

As amostras dos diferentes tratamentos juntas com amostras diretamente do campo antes de ser submetidas ao experimento, denominadas neste trabalho como amostras “ambiente”, foram fixadas segundo Bouzon (1993), seccionadas em micrótomo manual de parafina modelo LEICA RM 2135(Alemanha) e processadas para análises histoquímicas com as técnicas de: (a) azul de toluidina (ATO), corante utilizado para identificar polissacarídeos ácidos através de reação de metacromasia, (b) ácido periódico de Schiff (PAS), técnica utilizada para corar polissacarídeos neutros (*e.g.* amido e celulose) e (c) azul brilhante de Coomassie (CCB), que marca a presença de

proteínas (Schmidt et al., 2010). Os cortes após os tratamentos histoquímicos foram observados e fotografados em microscópio de luz Olympus com sistema de captura de imagem, câmara digital (Olympus Q-Color-3C America ind.).

Tabela 2: Relação das concentrações dos padrões ácido gálico e Trolox (expressa em massa) para cada um dos ensaios antioxidantes com sua respectiva equação da reta e coeficiente de regressão (R^2).

Ensaio	Ácido gálico (AG) Equação da reta Correlação	Trolox Equação da reta Correlação
DPPH	0 – 1,8 mg AG $y = -0,7396x + 0,7458$ $R^2 = 0,99$	0 – 3,6 mg Trolox $y = -0,2799x + 0,7851$ $R^2 = 0,99$
ABTS	0 – 0,45 mg $y = -1,2151x + 0,5083$ $R^2 = 0,99$	0 – 1,5 mg $y = -0,2798x + 0,6359$ $R^2 = 0,99$
Quelante de metais	0 – 4,5 mg $y = -0,2176x + 1,4304$ $R^2 = 0,99$	-----
Folin-Ciocalteu	0 – 3,6 mg $y = 0,3015x + 0,1751$ $R^2 = 0,97$	0 – 30 mg $y = 0,0637x + 0,1758$ $R^2 = 0,99$
FRAP	0 – 1,5 mg $y = 1,3314x + 0,0059$ $R^2 = 0,99$	0 – 4,5 mg $y = 0,2774x - 0,0329$ $R^2 = 0,99$

8.4.5 Análise dos dados

Os resultados de cada parâmetro foram avaliados estatisticamente através do programa Statistica 10, utilizando análise de variância (ANOVA) bifatorial e teste *a posteriori* de Newman-Keuls ($p < 0,05$). Cada conjunto de dados foi previamente avaliado na sua normalidade (teste de Kolmogorov-Smirnov) e homocedasticidade das variâncias (teste de Bartlett) sob a significância de $p < 0,05$. Com o conjunto de dados foi realizada uma análise de componentes principais (PCA) com o auxílio do programa Past.

8.5 Resultados

8.5.1 Bioabsorção de cádmio

Os resultados de absorção de Cd (Tabela 3) apresentaram diferenças significativas entre os locais estudados (não impactado e impactado) e dentre os tratamentos (0, 6, 12, 18, 37 e 55 mg.L⁻¹). No local não impactado, o tratamento de 6 e 55 mg.L⁻¹ ($0,07 \pm 0\%$, $0,08 \pm 0,01\%$) não foi significativo em relação ao seu respectivo controle (0%), no local impactado, todos os tratamentos apresentaram diferença significativa em relação ao seu respectivo controle (0%). De forma geral, todas as algas procedentes de local impactado apresentaram maior bioabsorção de Cd que algas de local não impactado, exceto para a concentração de 12 mg.L⁻¹ (Tabela 2). A maioria dos tratamentos para ambos locais mostraram valores de bioabsorção entre 0,07 a 1,38%, destacando-se os tratamentos de 18 mg.L⁻¹ do local impactado, e 12 mg.L⁻¹ do local não impactado que apresentaram percentuais de $2,3 \pm 0,02\%$ e $1,51 \pm 0,09\%$, respectivamente.

Tabela 3: Percentual de bioabsorção de cádmio de algas de local não impactado e impactado submetidas a diferentes concentrações de Cd: 0, 6, 12, 18, 37 e 55 mg.mL⁻¹. Os valores representam média $\pm$ desvio padrão (n = 5). Letras distintas representam diferenças significativas entre os locais e entre os tratamentos (p < 0,05).

Tratamento Cd (mg Cd.L ⁻¹)	Bioabsorção de Cd (%)	
	Não impactado	Impactado
0 (Controle)	$0,00 \pm 0,00h$	$0,00 \pm 0,00h$
6	$0,07 \pm 0h$	$1,38 \pm 0,10c$
12	$1,51 \pm 0,09b$	$1,25 \pm 0,08d$
18	$0,43 \pm 0,01f$	$2,3 \pm 0,02a$
37	$0,19 \pm 0,00g$	$0,82 \pm 0,01e$
55	$0,08 \pm 0,01h$	$0,40 \pm 0f$

8.5.2 Potencial antioxidante: percentual de atividade

O potencial antioxidante de *B. radicans* exposta a diferentes níveis de Cd foi estudado em diferentes concentrações de extrato bruto: 6, 8, 10, 12 e 13,3 mg.mL⁻¹. A Figura 16 mostra o percentual de atividade antioxidante nos cinco diferentes ensaios antioxidantes incluindo local de estudo (não impactado e impactado), concentração de Cd (0, 6, 12, 18, 37 e 55 mg.L⁻¹) e concentração de extrato bruto algáceo.

Na Figura 17A, potencial antioxidante perante o teste de DPPH, pode-se verificar que de forma geral entre as concentrações de extratos brutos, independente do local de estudo, quanto maior a concentração do extrato maior foi a atividade antioxidante, apresentando diferenças significativas. Em relação às concentrações de Cd, comparando sempre sob a mesma concentração de extrato bruto de alga, pode-se verificar que a concentração controle (0 mg.L^{-1}), independente do local de estudo, obteve as maiores atividades antioxidantes, chegando a valores médios de $51,00 \pm 4,65\%$ de atividade para o local não impactado e $95,00 \pm 1,49\%$ para o local impactado. Esse padrão geral de diminuição do potencial antioxidante sob concentrações maiores de Cd pode ser verificado na representação gráfica do ajuste polinomial para cada um dos locais (Fig. 16A; linha vermelha). No local não impactado, amostras na concentração de 6 mg.L^{-1} obtiveram em média $35,00 \pm 1,07\%$ de atividade antioxidante, sendo este reduzido para $17,00 \pm 0,81\%$ na concentração de 55 mg.L^{-1} . No local impactado, amostras na concentração de 6 mg.L^{-1} obtiveram percentual médio de $37,00 \pm 4,74\%$, apresentando a maior redução do potencial antioxidante na concentração de 12 mg.L^{-1} , com valor médio de $13,00 \pm 0,99\%$.

Na Figura 17B pode-se verificar que as porcentagens de sequestro do radical ABTS não apresentaram diferenças significativas entre as concentrações dos extratos brutos, exceto para as amostras dos tratamentos sob 12 , 18 e 55 mg.L^{-1} para o local não impactado e sob 12 e 55 mg.L^{-1} para o local impactado. De forma semelhante, diferenças significativas entre as concentrações de Cd foram pouco evidentes. A maior parte dos tratamentos mostraram percentuais próximos de $100,00 \pm 0,55\%$ de potencial antioxidante pelo método do sequestro do radical ABTS.

Na Figura 17C observa-se que as porcentagens de atividade antioxidante para o ensaio do Folin-Ciocalteu não apresentaram inúmeras diferenças significativas entre as concentrações de extrato dentro de cada uma das concentrações de Cd. A concentração de Cd, para ambos locais estudados, afetou significativamente a porcentagem de atividade antioxidante pelo ensaio do Folin-Ciocalteu, observando que sob maiores concentrações de Cd menores foram os percentuais de atividade.

Figura 17: Porcentagem de atividade antioxidante para os ensaios (A) DPPH, (B) ABTS, (C) Folin-Ciocalteu, (D) Quelante e (E) FRAP testados nas concentrações de 6, 8, 10, 12 e 13,3 mg.mL⁻¹ de extrato bruto para algas de local não impactado e impactado submetidas a diferentes concentrações de Cd: 0, 6, 12, 18, 37 e 55 mg.L⁻¹. Os valores representam média $\pm$ desvio padrão (n = 5). Letras distintas representam diferenças significativas entre os locais e entre os tratamentos (p < 0,05). Para cada local e ensaio é representado o ajuste polinomial e o coeficiente de regressão (R²).

Na Figura 17D pode-se verificar a porcentagem da atividade antioxidante mediante o ensaio quelante de metais de ferro, com variações significativas entre as concentrações do extrato bruto algáceo das amostras do local não impactado, sendo maiores para concentrações de extrato bruto de 6 a 10 mg.mL⁻¹ e menores nas concentrações de 12 a 13,3 mg.mL⁻¹. Para o local impactado, apresentou algumas diferenças significativas entre as concentrações de extrato bruto de algas. Comparando o percentual de potencial antioxidante entre as concentrações de Cd, não foi observado variação entre as concentrações de Cd para o local não impactado (Fig. 16D). Nos tratamentos de 6 e 12 mg.L⁻¹ do local impactado, houve baixa atividade antioxidante nas concentrações de 12 e 13,3 mg.mL⁻¹ de extrato bruto, quando comparada com as outras concentrações de Cd.

Na Figura 17E, as porcentagens de atividade antioxidante para o ensaio FRAP mostram que quanto maior a concentração de extrato bruto maior foi a porcentagem de atividade antioxidante, tanto para o local não impactado quanto para o local impactado. Para ambos locais, é observado que a atividade antioxidante é diminuída na medida em que aumenta a concentração de Cd, quanto maior a concentração de Cd à qual a alga ficou exposta, menor foi sua porcentagem de atividade antioxidante. Dentre as concentrações de Cd, a concentração controle (0 mg.L⁻¹) demonstrou maior atividade antioxidante, sem diferença significativa entre ambos os locais, com porcentagem de 100% na concentração de 13,3 mg.mL⁻¹ de extrato bruto.

8.5.3 Potencial antioxidante: equivalente padrão

Os valores de atividade antioxidante calculada em equivalentes de ácido gálico (EAG) e equivalentes Trolox (ET) são apresentados na Figura 18. Os equivalentes padrões foram calculados apenas para a concentração de 6 mg.mL⁻¹ de extrato bruto, visto que nessa concentração de extrato bruto de alga foi alcançada elevada atividade antioxidante. Para o ensaio do DPPH (Fig. 18A) pode-se observar que algas submetidas à concentração 0 mg.L⁻¹ apresentaram os maiores valores de equivalente padrão quando comparadas com os tratamentos de Cd dentre o respectivo local estudado. Nessa concentração (0 mg.L⁻¹), algas do local não impactado apresentaram valor de $0,27 \pm 0,02$ mg EAG.g⁻¹ e $0,53 \pm 0,01$ mg EAG.g⁻¹ para o local impactado, sendo equivalentes

a $0,91 \pm 0,05$ mg ET.g⁻¹ para o local não impactado e $1,68 \pm 0,03$ mg ET.g⁻¹ para o local impactado.

Figura 18: Potencial antioxidante expresso em equivalentes de ácido gálico (EAG) e equivalentes Trolox (ET) para os ensaios (A) DPPH, (B) ABTS, (C) Folin-Ciocalteu, (D) Quelante e (E) FRAP calculados para a concentração de 6 mg.mL⁻¹ de extrato bruto para algas do local não impactado e impactado submetidas a diferentes concentrações de Cd: 0, 6, 12, 18, 37 e 55 mg.L⁻¹. Os valores representam média $\pm$ desvio padrão (n = 5). Letras distintas representam diferenças significativas entre os locais e entre os tratamentos (p < 0,05).

Na Figura 18B pode-se observar que os valores de equivalentes padrão para o teste de ABTS não mostraram diferenças significativas entre as concentrações de Cd de 0, 6, 12 e 37 mg.L⁻¹ para o local não impactado, da mesma forma que nas concentrações de 0, 6, 18, 37 e 55 mg.L⁻¹ para o local impactado, apresentando médias de $0,23 \pm 0,00$ mg EAG.g⁻¹ e $1,25 \pm 0,00$ mg ET.g⁻¹. Os tratamentos de Cd nas concentrações de 18 e 55 mg.L⁻¹ do local não impactado e de 12 mg.L⁻¹ do local impactado apresentaram os menores valores de equivalentes padrão e redução significativa em relação ao respectivo controle.

Os resultados de equivalentes padrão para o teste de Folin-Ciocalteu são mostrados na Figura 18C. Não houve diferenças significativas entre as concentrações de Cd e tampouco entre os locais de estudo para este ensaio. O valor médio para todos os tratamentos foi $0,42 \pm 0,01$ mg EAG.g⁻¹ e $1,85 \pm 0,03$ mg ET.g⁻¹.

Os resultados de potencial antioxidante pelo ensaio quelante de metais para os equivalentes de ácido gálico e Trolox (Fig. 18D) mostram que não houve diferenças significativas entre as concentrações de Cd do mesmo local, porém os potenciais de antioxidante foram significativamente menores no local não impactado do que o local impactado. No local não impactado o valor médio foi $1,58 \pm 0,01$ mg EAG.g⁻¹ e no local impactado foi $3,5 \pm 0,01$ mg EAG.g⁻¹.

No teste de FRAP (Fig. 18E), verifica-se que não houve diferença significativa nem entre as concentrações de Cd e nem entre os locais, salvo umas poucas exceções. Os valores médios de todos os tratamentos foram $0,029 \pm 0$ mg EAG.g⁻¹ e $0,20 \pm 0,01$ mg ET.g⁻¹.

8.5.4 Potencial antioxidante: EC50

Os resultados de EC50 para os cinco ensaios antioxidantes estão apresentados na Tabela 3. Cabe ressaltar que menores valores de EC50 representam melhor eficiência antioxidativa.

As melhores eficiências antioxidativas registradas para o teste de DPPH foram, de forma geral, observadas para os tratamentos do local impactado em relação ao local não impactado (Tabela 4), com menores valores de EC50 nos tratamentos controle (0 mg.L⁻¹) para ambos os locais quando comparado com as demais concentrações de Cd, com valores de 8,35 mg.mL⁻¹ para o local não impactado e 0,60 mg.mL⁻¹ para o local impactado.

Para o teste de ABTS (Tabela 4) os valores de EC50 foram variáveis entre os dois locais, apresentando valores altos para alguns tratamentos de Cd e baixos em outros. O menor valor de EC50 para o local não impactado foi no tratamento de 37 mg.L⁻¹, com EC50 de 0,65 mg.mL⁻¹, e para o local impactado foi na concentração de 55 mg.L⁻¹, com EC50 de 1,09 mg.mL⁻¹.

No teste de Folin-Ciocalteu (Tabela 4), os menores valores de EC50 para ambos os locais foram na concentração controle de Cd, com EC50 de 0,76 mg.mL⁻¹ para o local não impactado e 1,08 para o local impactado.

O EC50 de melhor eficiência no teste de Quelante (Tabela 4) foi apresentado pelo tratamento controle (0 mg.L⁻¹), com valor 5,47 mg.mL⁻¹ para o local não impactado, e na concentração de Cd de 6 mg.L⁻¹ para o local impactado, com EC50 de 5,86 mg.mL⁻¹. Em geral, os menores valores de EC50 foram observados nos tratamentos do local não impactado.

Para o teste de FRAP (Tabela 4) obteve-se para ambos os locais o menor EC50 nas concentrações controle, para o local não impactado o valor foi de 6,05 mg.mL⁻¹ e para o local impactado 4,78 mg.mL⁻¹. De forma geral, para este ensaio poucos tratamentos apresentaram valores de EC50, tendo a maioria valores abaixo de 50% de concentração efetiva.

Tabela 4: Valores de EC50 (mg.mL⁻¹) para os ensaios DPPH, ABTS, Folin-Ciocalteu, Quelante e FRAP calculados para algas de local não impactado (Não imp.) e impactado (Imp.), submetidas a diferentes concentrações de Cd: 0, 6, 12, 18, 37 e 55 mg.L⁻¹. Os valores em porcentagem representam tratamentos nos quais não foi possível calcular o EC50, visto que as curvas de dose-resposta atingiram valores percentuais menores do que 50%.

Tratamento Cd (mg Cd.L ⁻¹)	DPPH		ABTS		Folin-Ciocalteu		Quelante		FRAP	
	Não imp.	Imp.	Não imp.	Imp.	Não imp.	Imp.	Não imp.	Imp.	Não imp.	Imp.
0 (Controle)	8,35	0,60	3,00	3,03	0,76	1,08	5,47	11,62	6,05	4,78
6	9,66	< 37%	3,00	3,14	1,16	5,31	6,56	5,86	9,82	< 38%
12	< 48%	< 14%	1,54	5,4	< 35%	< 34%	5,76	6,08	< 40%	< 39%
18	< 27%	3,83	5,86	3,09	< 18%	11,82	5,82	10,08	< 29%	< 38%
37	14,06	5,26	0,65	3,29	13,29	< 36%	< 31%	< 27%	< 42%	< 33%
55	< 41%	6,48	2,36	1,09	< 20%	< 26%	6,50	< 37%	< 32%	< 35,5%

8.5.5 Microscopia de luz

Os resultados de microscopia de luz estão apresentados nas Figuras 19-22. O ácido periódico de Schiff (PAS) cora polissacarídeos neutros como amido e celulose (Figs. 19-20) e o azul de toluidina (ATO) permite identificar polissacarídeos ácidos presentes na parede celular (Figs. 21-22). Adicionalmente, foi usada a técnica de azul brilhante de Coomassie (CCB) que evidencia a presença de proteínas; porém estes resultados são apresentados em Anexo no final deste capítulo, pois o material ficou muito corado e não foi possível analisar adequadamente as fotos.

Seções longitudinais de *B. radicans* do local não impactado corados com PAS (Fig. 19) indicam espessamento da parede celular em amostras sob maiores concentrações de Cd. Grãos de amido foram observados em maior densidade nas células corticais nos tratamentos de 6 e 12 mg.L⁻¹ (Fig. 19C e 19D, respectivamente). Seções longitudinais de amostras do local impactado coradas com PAS (Fig. 20) também mostram espessamento das paredes celulares. Grãos de amido ocorreram em menor densidade nas células centrais (Fig. 20) do que os tratamentos do local não impactado (Fig. 20).

No tratamento histoquímico com ATO, as seções longitudinais de *B. radicans* do local não impactado (Fig. 21), apresentaram espessamento em maior densidade nas células corticais do tratamento de 55 mg.L⁻¹ de Cd (Fig. 21G). Nas seções longitudinais de amostras do local impactado (Fig. 22) houve espessamento em maior densidade nas células corticais dos tratamentos de 6 e 55 mg.L⁻¹ de Cd (Fig. 22D e 22G, respectivamente).

Ambas análises histoquímicas mostram que existe um efeito do Cd na espessura da parede celular, independente do local de estudo, e na reorganização dos grãos de amido segundo o local.

Figura 19: Seções longitudinais de *B. radicans* do local não impactado, coradas com ácido periódico de Shiff (PAS) submetidas a diferentes concentrações de Cd: (A) Ambiente, amostra controle que representa a condição da alga antes de ser submetida ao experimento, (B) 0 mg.L⁻¹ (tratamento controle), (C) 6 mg.L⁻¹, (D) 12 mg.L⁻¹, (E) 18 mg.L⁻¹, (F) 37 mg.L⁻¹ e (G) 55 mg.L⁻¹. cc = células corticais, cw = parede celular, s = amido.

Figura 20: Seções longitudinais de *B. radicans* do local impactado, coradas com ácido periódico de Schiff (PAS) submetidas a diferentes concentrações de Cd: (A) Ambiente, amostra controle que representa a condição da alga antes de ser submetida ao experimento, (B) 0 mg.L⁻¹ (tratamento controle), (C) 6 mg.L⁻¹, (D) 12 mg.L⁻¹, (E) 18 mg.L⁻¹, (F) 37 mg.L⁻¹ e (G) 55 mg.L⁻¹. cc = células corticais, cw = parede celular, s = amido.

Figura 19: Seções longitudinais de *B. radicans* do local não impactado, coradas com azul de toluidina (AT-O) submetidas a diferentes concentrações de Cd: (A) Ambiente, amostra controle que representa a condição da alga antes de ser submetida ao experimento, (B) 0 mg.L⁻¹ (tratamento controle), (C) 6 mg.L⁻¹, (D) 12 mg.L⁻¹, (E) 18 mg.L⁻¹, (F) 37 mg.L⁻¹ e (G) 55 mg.L⁻¹. cc = células corticais, cw = parede celular.

Figura 20: Seções longitudinais de *B. radicans* do local não impactado, coradas com azul de toluidina (AT-O) submetidas a diferentes concentrações de Cd: (A) Ambiente, amostra controle que representa a condição da alga antes de ser submetida ao experimento, (B) 0 mg.L⁻¹ (tratamento controle), (C) 6 mg.L⁻¹, (D) 12 mg.L⁻¹, (E) 18 mg.L⁻¹, (F) 37 mg.L⁻¹ e (G) 55 mg.L⁻¹. cc = células corticais, cw = parede celular.

8.5.6 Análise de componentes principais (PCA)

A fim de analisar de forma integrada o efeito dos tratamentos de Cd nos parâmetros estudados em *B. radicans* procedente dos dois locais estudados (porcentagem de atividade antioxidante dos cinco ensaios e porcentagem de bioabsorção) foi realizada uma análise multivariada de PCA. As respostas do conjunto de dados são explicadas em 78% por dois componentes, com autovalores (*eigenvalue*) de 51% para a componente 1 e 27% para a componente 2 (Fig. 23). Adicionalmente, no Anexo no final deste capítulo são apresentados os autovalores para as componentes da PCA (Tabela A3) e os coeficientes de correlação de Pearson (*r*) e as probabilidades (Tabela A4).

Na Figura 23 é possível observar que os vetores dos parâmetros de Folin e FRAP se correlacionam positivamente com os tratamentos NI-0, NI-6, I-0 e I-6 para ambas componentes. Os vetores da PCA-1 para ABTS e DPPH estão correlacionados positivamente com os tratamentos I-18 e I-37. O vetor quelante se correlaciona negativamente na PCA-1 e positivamente na PCA-2 com os tratamentos NI-12, NI-18, NI-55 e I-12. O vetor de bioabsorção se correlaciona negativamente com a PCA-1 e PCA-2, não demonstrando influência nos agrupamentos. Considerando a distribuição dos pesos das variáveis resultantes da PCA, foram identificados três agrupamentos: local não impactado e impactado com concentrações baixas de Cd (0 e 6 mg.L⁻¹; em marrom), local impactado com concentração média de Cd (18 e 37 mg.L⁻¹; em azul) e um agrupamento misto entre 12 mg.L⁻¹ do local impactado e do local não impactado com 18 e 55 mg.L⁻¹ (em laranja).

Figura 21: Ordenação biplot dos componentes 1 e 2 de *B. radicans* para os locais não impactado (NI) e impactado (I) nos diferentes tratamentos de concentração de Cd (0, 6 18, 37 e 55 mg.L⁻¹) em função das variáveis métricas de bioabsorção de Cd e atividade antioxidante (DPPH, ABTS, Folin, Quelante e FRAP).

8.6 Discussão

O entendimento do conjunto de dados da capacidade de bioabsorção de cádmio, da performance bioquímica através de testes antioxidantes e das alterações histoquímicas mediante análises de microscopia de luz sob condições de estresse de exposição ao Cd fornecem importantes subsídios para identificar a sensibilidade e tolerância fisiológica de *B. radicans*. Estudos sobre poluição por metais são fundamentais, pois fornecem auxílios para fundamentar novas leis ambientais para conservação, além de conhecimento científico para melhor entendimento sobre o efeito dos metais sobre a biota.

A bioabsorção de Cd ocorreu em todos os tratamentos estudados de *B. radicans*, corroborando estudos que demonstra que o Cd, mesmo não sendo um metal essencial, é de fácil absorção, pois utiliza as mesmas vias transportadoras de Ca⁺² e Zn⁺² (Clemens, 2006; Verbruggen et al., 2009; Pinheiro et al., 2012). Ambientes de manguezais costumam apresentar baixos níveis de salinidade, portanto, menor disponibilidade de cátions bivalentes como Ca⁺² e Na⁺. Em situações em que o Cd se apresenta em maior concentração há um desbalanço no gradiente deste metal, portanto, os transportadores

de Zn^{+2} e Ca^{+2} captam este metal e o introduzem para dentro da célula, provocando toxicidade nas organelas. Estes transportadores são específicos de Zn^{+2} e Ca^{+2} , mas o Cd por ter a geometria molecular parecida com o íon Ca^{+2} tem seu transporte facilitado para o interior da célula, passando livre pelos transportadores de Ca^{+2} .

Cádmio demonstra ser influenciado também pela salinidade, pois seus efeitos tóxicos tendem a aumentar nos ambientes com baixa salinidade ou baixos níveis de Ca, pois o Cd livre no meio aumenta por não se complexar com íons de cloreto que não estão disponíveis em salinidades baixas. Os dados demonstram que *B. radicans* nos tratamentos do local impactado tiveram maior bioabsorção de Cd do que as do local não impactado. Essa situação pode se dever a que em locais impactados a alga esteja aclimatada a altas concentrações, o que reflete em maior absorção de Cd, o qual responde com menor sensibilidade e maior tolerância ao metal. Provavelmente, por estar aclimatada, os mecanismos de detoxificação são mais ativos. Mecanismos como quelantes, fitoquelatinas e metalotioneínas, glutatona e carotenoides, assim como mecanismos que coincidem com altas atividades antioxidantes observados em ambos os locais.

O potencial antioxidante de *B. radicans* demonstrou que quanto maior foi a concentração de exposição de Cd, menor foi sua atividade antioxidante, corroborando com dados obtidos em estudos com outros organismos fotossintetizantes (Schützendübel & Polle, 2002; Wu et al., 2009). No Trabalho de Wu et al. (2009) com *Ulva fasciata* S. F. Gray, foi observado que nas concentrações menores de Cd (5 – 3,6 mg.L^{-1}) não houve queda na enzima antioxidante glutatona (GSH). Mas na concentração de 9,2 mg.L^{-1} houve um decréscimo significativo, demonstrando que em concentrações menores de Cd a alga consegue ativar mecanismos de defesa antioxidante. Essa proteção pode atuar em favor de resguardar as organelas, diferente das concentrações mais altas onde os autores verificaram uma queda na enzima antioxidante. Podemos verificar nos resultados obtidos neste trabalho que algas do local impactado por estarem aclimatadas à presença de Cd demonstram uma maior resistência às concentrações expostas neste trabalho. Em contraposição, as algas do local não impactado apresentaram uma menor tolerância mesmo nas menores concentrações de Cd. Outro aspecto importante a destacar e que reforça as observações deste estudo é o fato das algas do tratamento controle (sem Cd) do local não impactado apresentar menores taxas de antioxidantes quando comparadas com as do local impactado.

Além dos mecanismos bioquímicos de defesa contra estresse à exposição de Cd, as algas possuem outros mecanismos físicos. *Bostrychia radicans* cultivadas nas diferentes concentrações de Cd mostraram aumento de espessura da parede celular. Essa resposta pode ser um mecanismo físico que atua como barreira para a entrada de Cd e que auxilia nos mecanismos de tolerância ao Cd, como visto por Felix et al. (2014). Os metais têm uma forte ligação com os polissacarídeos da parede celular, assim a porção amorfa da parede celular atuaria como barreira física na tentativa de imobilizar e impedir a entrada deste metal para o interior da célula. Neste trabalho não foi tão evidente o espessamento da parede celular, como tem sido identificado em outros trabalhos (Bouzon et al., 2012; Santos, 2011; Rodrigo et al., 2014), o que pode ser explicado pelo motivo de que *B. radicans* não apresenta uma parede celular tão espessa quando comparada com outras espécies de algas estudadas, como *Gracilaria domingensis* (Kutzing) Sonder ex Dickie e *Hypnea musciformes* (Wulfen) J. V. Lamouroux.

A maior intensidade da reação da parede celular com o AT-O indica uma maior deposição de polissacarídeos ácidos. A técnica de PAS permitiu verificar a presença de polissacarídeos neutros como celulose e amido, mostrando que nas maiores concentrações de Cd não houve a presença de grãos de amido, corroborando com as observações de Bouzon et al. (2012), Santos (2011) e Gouveia et al. (2013). O decréscimo de amido nas maiores concentrações de Cd pode estar ligado com alterações na via de biossíntese de amido e de enzimas do ciclo de Calvin, a fim de redirecionar as fontes orgânicas para ativar as vias de biossíntese de compostos de defesa da parede celular e outros metabólitos secundários de defesa.

Finalmente, este estudo demonstra que o Cd afeta negativamente *B. radicans*. Através dos parâmetros estudados como atividades antioxidantes, bioabsorção e aspectos histoquímicos, podemos afirmar que esta espécie mostrou uma aclimatação em ambientes considerados como impactados em relação a locais com menor impacto. Com estes resultados podemos recomendar a utilização de *B. radicans* como organismo bioremediador pelo fato de absorver Cd em todas as concentrações que foi submetido e bioindicador pelo fato de ter uma maior tolerância a ambientes impactados, apresentado pela sua maior atividade antioxidante.

8.7 Referências

- Andrade, L. R. D. E., Farina, M. & Filho, G. M. A. 2002. Role of (Dictyotales, Phaeopbyceae) cell walls in cadmium accumulation. *Phycologia*, 41: 39–48.
- Antonovics, J. 1975. Metal tolerance in plants: perfecting an evolutionary paradigm. *International Conference on Heavy Metals the Environment*, 169–186.
- Bouzon, Z. L. 1993. Aspectos histoquímicos e ultra-estruturais da porção vegetativa e reprodutiva de estiquídios de *Hypnea musciformis* (Gigartinales - Rhodophyta). *Dissertação mestrado. Universidade Federal do Paraná*. 66p.
- Bouzon, Z. L., Ferreira, E. C., dos Santos, R., Scherner, F., Horta, P. A., Maraschin, M. & Schmidt, E. C. 2012. Influences of cadmium on fine structure and metabolism of *Hypnea musciformis* (Rhodophyta, Gigartinales) cultivated in vitro. *Protoplasma*, 249(3): 637–50.
- Chen, S.L. & Kao, C.H. 1995. Glutathione reduces the inhibition of rice seedlings root growth caused by cadmium. *Journal of Plant Growth Regulation*, 16: 249-252.
- Clemens, S. 2006. Toxic metal accumulation, responses to exposure and mechanisms of tolerance in plants. *Biochimie*, 88(11): 1707–1719.
- Collen, J., Pinto, E., Pedersen, 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.
- Felix, M. R. de L., Osorio, L. K. P., Ouriques, L. C., Farias-Soares, F. L., Steiner, N., Kreusch, M. & Schmidt, É. C. 2014. The effect of cadmium under different salinity conditions on the cellular architecture and metabolism in the red alga *Pterocladia capillacea* (Rhodophyta, Gelidiales). *Microscopy and Microanalysis*, 20(05), 1411–1424.
- Gouveia, C., Kreusch, M., Schmidt, E. C., Felix, M. R. D. L., Osorio, L. K. P., Pereira, D. T. & Bouzon, Z. L. 2013. The effects of lead and copper on the cellular architecture and metabolism of the red alga *Gracilaria domingensis*. *Microscopy and Microanalysis*, 19(3): 513–524.
- Grill, E., Löffler, S., Winnacker, E. L. & Zenk, M. H. 1989. Phytochelatins, the heavy-metal-binding peptides of plants, are synthesized from glutathione by a specific gamma-glutamylcysteine dipeptidyl transpeptidase (phytochelatin synthase). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 86(18): 6838–6842.

- Hanikenne, M. 2003. *Chlamydomonas reinhardtii* as a eukaryotic photosynthetic model for studies of heavy metal homeostasis and tolerance. *New Phytologist*, 159(2): 331–340.
- Hortellani, M. A., Sarkis, J. E. S., Abessa, D. M. S. & Sousa, E. C. P. M. 2008. Avaliação da contaminação por elementos metálicos dos sedimentos do estuário Santos-São Vicente. *Química Nova*, 31(1):10–19.
- Howe, G. & Merchant, S. 1992. Heavy metal-activated synthesis of peptides in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiology*, 98, 127–136.
- Joly, A., 1954. The genus *Bostrychia* Montagne, 1838 in southern Brazil. taxonomic and ecological Data. *Boletim da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras da Universidade de São Paulo*, 11: 55-74
- Kraemer, U., & Clemens, S. 2005. Functions and homeostasis of zinc , copper and nickel in plants. *Topics in Current Genetics*, 14: 216–271.
- Lee, M. Y., & Shin, H. W. 2003. Cadmium-induced changes in antioxidant enzymes from the marine alga *Nannochloropsis oculata*. *Journal Applied Phycology*, 15: 13–20.
- Marchiol, L., Leita, L., Martin, M., Peressotti, A. & Zerbi G. 1996. Physiological responses of two soybean cultivars to cadmium. *Journal of Environmental Quality*, 25: 562-566..
- Perfus-Barbeoch, L., Leonhardt, N., Vavasseur, A. & Forestier, C. 2002. Heavy metal toxicity: cadmium permeates through calcium channels and disturbs the plant water status. *Plant Journal*, 32(4): 539–548.
- Pinheiro, M. A. A., Silva, P. P. G. e, Duarte, L. F. de A., Almeida, A. A. & Zanotto, F. P. 2012. Ecotoxicology and Environmental Safety Accumulation of six metals in the mangrove crab *Ucides cordatus* (Crustacea: Ucididae) and its food source, the red mangrove *Rhizophora mangle* (Angiosperma: Rhizophoraceae). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 81: 114–121.
- Pinto, E., Okamoto, O. K., Siigaud-kutner, T. C. S., Morse, D., Leitão, M. A. S. & Colepicolo, P. 2003. Review heavy metal induced oxidative stress in algae. *Journal of Phycology*, 39: 1008–1018.
- Piotrowska-Niczyporuk, A., Bajguz, A., Zambrzycka, E. & Godlewska-Zylkiewicz, B. 2012. Phytohormones as regulators of heavy metal biosorption and toxicity in green alga *Chlorella vulgaris* (Chlorophyceae). *Plant Physiology and Biochemistry*, 52: 52–65.
- Santos, R.W. dos, 2011. A avaliação dos efeitos de cádmio na fisiologia e morfologia de *Gracilaria domingensis*, *Dissertação de Mestrado Universidade Federal de Santa Catarina. Departamento Biologia celular*. 50p
- Santos. R, W., Schmidt, É. C., Felix, M. R. D. L., Polo, L. K., Ramlov, F., Maraschin, M. & Bouzon, Z. L. 2014. Bioabsorption of cadmium , copper and lead by the red

- macroalga *Gelidium floridanum*: Physiological responses and ultrastructure features. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 105: 80–89.
- Schmidt, E. C., Maraschin, M. & Bouzon, Z. L. 2010. Effects of UVB radiation on the carragenophyte *Kappaphycus alvarezii* (Rhodophyta, Gigartinales): Changes in ultrastructure, growth, and photosynthetic pigments. *Hydrobiologia*, 649(1): 171–182.
- Schützendübel, A. & Polle, A. 2002. Plant responses to abiotic stresses: heavy metal-induced oxidative stress and protection by mycorrhization. *Journal of Experimental Botany*, 53(372): 1351–65.
- Suzuki, N., Koizumi, N. & Sano, H. 2001. Screening of cadmium-responsive genes in *Arabidopsis thaliana*. *Plant, Cell and Environment*, 24(11): 1177–1188.
- Talarico, L. 2002. Fine structure and X-ray microanalysis of a red macrophyte cultured under cadmium stress. *Environmental Pollution*, 120(3): 813–21.
- Taylor, W. R. 1960. Marine algae of the eastern tropical and subtropical coasts of the Americas. *University of Michigan Press*, 870p.
- Verbruggen, N., Hermans, C. & Schat, H. 2009. Mechanisms to cope with arsenic or cadmium excess in plants. *Current Opinion in Plant Biology*, 12 364–372
- Wu, T., Hsu, Y., & Lee, T. 2009. Effects of cadmium on the regulation of antioxidant enzyme activity, gene expression, and antioxidant defenses in the marine macroalga *Ulva fasciata*. *Botanical studies*, 50: 25–34.
- Xia, J. R., Li, Y. J., Lu, J. & Chen, B. 2004. Effects of copper and cadmium on growth, photosynthesis, and pigment content in *Gracilaria lemaneiformis*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 73(6), 979–86.

8.8 Anexo - Dados complementares de análise histoquímica de azul brilhante de Coomassie (CCB) e análise de componentes principais (PCA)

Figura A3: Seções longitudinais de *B. radicans* do local não impactado, coradas com azul brilhante de Coomassie (CCB) submetidas a diferentes concentrações de Cd: (A) Ambiente, amostra controle que representa a condição da alga antes de ser submetida ao experimento, (B) 0 mg.L⁻¹ (tratamento controle), (C) 6 mg.L⁻¹, (D) 12 mg.L⁻¹, (E) 18 mg.L⁻¹, (F) 37 mg.L⁻¹ e (G) 55 mg.L⁻¹.

Figura A4: Seções longitudinais de *B. radicans* do local impactado, coradas com azul brilhante de Coomassie (CCB) submetidas a diferentes concentrações de Cd: (A) Ambiente, amostra controle que representa a condição da alga antes de ser submetida ao experimento, (B) 0 mg.L⁻¹ (tratamento controle), (C) 6 mg.L⁻¹, (D) 12 mg.L⁻¹, (E) 18 mg.L⁻¹, (F) 37 mg.L⁻¹ e (G) 55 mg.L⁻¹.

8.8.1 Anexo II- Autovalores dos componentes, coeficiente de correlação de Pearson e probabilidades da análise dos componentes principais (PCA).

Tabela A3: Autovalores para os componentes da análise de componentes principais (PCA).

Componentes	Autovalores (eigenvalues)	% variação
1	3,07	51,20
2	1,63	27,25
3	0,81	13,52
4	0,33	5,53
5	0,11	1,90
6	0,04	0,60

Tabela A4: Probabilidades ($p < 0,05$; em vermelho) e coeficientes de correlação de Pearson (r ; em preto) da análise de componentes principais (PCA) para os diferentes parâmetros estudados. As probabilidades destacadas em negrito indicam significância estatística ($p < 0,05$).

Parâmetros	Bioabsorção	DPPH	Quelante	FRAP	ABTS	FOLIN
Bioabsorção	---	0,9777	0,34909	0,17626	0,74352	0,52594
DPPH	0,0090	---	0,18793	0,0017	0,0102	0,1040
Quelante	-0,2966	-0,408	---	0,9970	0,4166	0,1782
FRAP	-0,4180	0,8005	0,0011	---	0,01296	0,0033
ABTS	-0,1057	0,7063	-0,2588	0,6902	---	0,08479
FOLIN	-0,2034	0,4921	0,4162	0,771	0,5175	---

9 Considerações finais

Estudos que correlacionam a poluição por metais e seus efeitos na biota são fundamentais, pois fornecem importantes subsídios para identificar a sensibilidade e tolerância fisiológica dos organismos teste. Neste estudo, utilizamos a alga vermelha *B. radicans*, uma macroalga cosmopolita e de grande abundância em manguezais. Os resultados obtidos nas diferentes análises nos permitem apontar às seguintes considerações:

- *Bostrychia radicans* foi capaz de absorver Cd disponível no meio de cultivo experimental. Algas de local impactado absorveram maiores níveis de Cd do que algas de local não impactado.
- Comparando as respostas fisiológicas de *B. radicans* dos dois ambientes (não impactado e impactado), algas do local impactado mostraram melhor tolerância do que algas do local não impactado. Estes dados corroboram a idéia inicial de que algas de ambientes impactados se aclimatariam e sofreriam um menor estresse ao metal quando comparada com algas de ambiente não impactado.
- *Bostrychia radicans* mostrou apresentar altos teores de potencial antioxidante antes de ser submetidas aos tratamentos com Cd, evidenciando uma maquinaria de defesa eficiente já no estado natural.
- A exposição ao Cd provocou alterações na organização celular de *B. radicans*, observando-se um espessamento da parede celular.

Podemos concluir que com os resultados obtidos, algas de ambientes impactados têm uma maior tolerância ao estresse de Cd em relação a algas de ambientes não impactados. Esses resultados fornecem informações sobre as tolerâncias e respostas ao estresse a Cd que podem ser utilizados como subsídios para monitoramento de áreas contaminadas, pois *B. radicans* apresentou respostas significativas e com isso podendo ser usada como espécie bioindicadora.