

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA**

**“Marcadores de estresse oxidativo
em *Minutocellus polymorphus*
(Heterokontophyta) sob exposição ao
oxifluorfenol e ao benzo[a]pireno”**

**Moacir Aluisio Torres
Tese de Doutorado**

**Prof. Dr. Pio Colepicolo Neto
Orientador**

São Paulo, 24 de outubro de 2008

Nome: Moacir Aluisio Torres

Tese: Marcadores de Estresse Oxidativo em *Minutocellus polymorphus* (Heterokontophyta) sob exposição ao oxifluorfenol e ao benzo[a]pireno.

Tese apresentada ao Instituto de Química da Universidade de São Paulo para obtenção do Título de Doutor em Ciências (Bioquímica)

Aprovado em: _____

Banca Examinadora:

Prof.(a) Dr.(a): _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof.(a) Dr.(a): _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof.(a) Dr.(a): _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof.(a) Dr.(a): _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof.(a) Dr.(a): _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

À Camila,

Abrigo meu, dos vendavais da vida.

Sublime, apaixonante... Minha.

AGRADECIMENTOS

É indubitável a dificuldade da tarefa de nomear as pessoas que colaboraram, não só para o término de um trabalho, mas principalmente para que nos mantivéssemos lúcidos e com nossos objetivos vivos. Minha tentativa aqui e, nada, além disso, será relembrar alguns nomes que dentre muitos, tem grande significado.

Agradeço imensamente, a meu orientador Pio Colepicolo, por seu estilo singular, pela oportunidade e notória confiança.

Agradeço aos meus amigos de laboratório Sara, Karina, Ângela, Patrícia e Thaís pelos experimentos, convivências e reflexões que me fizeram ter. Agradeço também a minha amiga Vanessa por nossa época na Universidade de Ohio. Aos novos amigos de laboratório, Aline, João, Renato e Diego pelo bom nível de relacionamento. Aos meus alunos de iniciação científica Lúgia e Erica pela confiança e dedicação. As atividades no laboratório não seriam tão enriquecedoras não fossem a dedicação dos técnicos Sandra e Ednaíson, pessoas extraordinárias.

Os meus sinceros agradecimentos aos professores, meus amigos, Marcelo Paes de Barros e Ernani Pinto, pelas infindáveis conversas, planejamentos e discussões científicas.

Um agradecimento especial ao meu amigo professor Cassius Stevani pela leitura atenta do manuscrito, pelas inúmeras contribuições ao meu texto. Entre fungos e algas, apesar da distância evolutiva, sempre arranjamos tempo para uma aproximação saudável.

Não poderia deixar de mencionar o apoio, mesmo que distante, de meus familiares, especialmente à minha mãe e ao meu pai e meus irmãos, protagonistas verdadeiros de toda a minha saga. Também à minha segunda família, Seu Antônio e Dona Zizene que me deram grande apoio, juntamente Thiago e Cássia, nos últimos momentos da redação da tese.

As agências CNPq, FAPESP e ao PRONEX/FINEP pelas bolsas e auxílios concedidos.

A todas as pessoas que eventualmente não foram aqui nominalmente declinadas e que, de uma maneira ou de outra, colaboraram para execução desse trabalho, meus mais sinceros agradecimentos.



Já começo a me sentir melhor depois de sair do ar poluído de Roma!

Sêneca, 61 A.D., em uma carta ao seu amigo Lucílio, se referindo um momento delicado da política romana.*

Uma alusão ao fato de que nem sempre são os poluentes nossos maiores agressores.

* Ad Lucilium Epistulae Morales de *Lucius Annaeus Seneca*, 61 A.D.

RESUMO

Torres, M.A. (2008) Marcadores Bioquímicos de estresse oxidativo em *Minutocellus polymorphus* (Heterokontophyta) sob exposição ao oxiflurfeno e ao benzo[a]pireno. 188pp. Tese de Doutorado – Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Bioquímica). Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Nesse trabalho enfatizamos o uso de marcadores bioquímicos de estresse oxidativo em microalgas como sinalizadores precoces de exposição a agentes xenobióticos. A curva de crescimento e a taxa de crescimento diário (μ) foram determinadas através do monitoramento *in vivo* da fluorescência da clorofila. Baseado nos protocolos de testes toxicológicos *in vitro*, usando microalgas expostas por 48h, determinou-se a concentração efetiva que inibiu 50% de μ (IC_{50}). Culturas de *M. polymorphus*, com concentração inicial de 1×10^6 células.mL⁻¹, foram submetidas separadamente ao IC_{50} de oxiflurfeno (OxF) e benzo[a]pireno (BaP) por 48h sendo, posteriormente, coletadas para a análise de cinética enzimática em espectrofotômetro. As análises tanto dos níveis de MDA como dos níveis de GSH/GSSG e Asc⁻ foram feitas em HPLC usando detectores de fluorescência e detectores coulométricos *flow-through* respectivamente. Além disso, os ensaios sobre a excreção/liberação de H₂O₂ *in vivo* foram feitos em um luminômetro usando-se a técnica do luminol. Os valores de IC_{50} para o OxF e BaP foram de 0,24 μ g.L⁻¹ e 0,99 μ g.L⁻¹ respectivamente. Os resultados das análises enzimáticas, obtidos nos ensaios com OxF, ao serem comparadas com controles, mostram aumentos para SOD (150 ± 7 e 32 ± 6 USOD.mg.prot.⁻¹), seguidos por aumentos menores para CAT ($6,5 \pm 0,7$ e $3,9 \pm 0,5$ U.mg.prot.⁻¹) e APx ($1,01 \pm 0,06$ e $0,82 \pm 0,05$ U.mg.prot.⁻¹) respectivamente. Nas culturas expostas ao BaP os resultados, comparados ao controle, mostraram maior atividade de CAT ($35,7 \pm 1,3$ e $4,0 \pm 0,9$ U.mg.prot.⁻¹) e APx ($4,95 \pm 0,06$ e $0,86 \pm 0,03$ U.mg.prot.⁻¹) enquanto a SOD foi menos pronunciada (105 ± 6 e 35 ± 5 USOD.mg.prot.⁻¹). As análises das enzimas GR e DHAR quando comparadas ao controle ($0,78 \pm 0,07$ e $0,43 \pm 0,08$ U.mg.prot.⁻¹ respectivamente) apresentaram-se inibidas em quase 50% quando sob a ação de OxF e não apresentaram variações na presença de BaP. As análises de GST comparadas aos controles, tiveram menor atividade nos grupos sob OxF (176 ± 28 e 73 ± 18) frente ao BaP (402 ± 67 e 71 ± 24). Os resultados em HPLC revelaram níveis de MDA elevados nos dois grupos, especificamente 9 e 5 vezes o valor dos controles para as amostras expostas ao OxF e ao BaP respectivamente. Os resultados de GSH mostram diminuição de GSH_{total} frente aos controles, em quase 40% sob ação do OxF e mais de 50% nas culturas com BaP. Além disso, a percentagem de GSH na forma de GSSG comparada ao GSH_{total} (%IR – Índice redox) foi de 60 e 75% nos grupos com OxF e BaP respectivamente. Nos valores obtidos nas análises de Asc⁻ os resultados apontam diminuição em 45% sob OxF e pouco mais de 15% na presença de BaP. As análises de excreção/liberação *in vivo* de H₂O₂ mostram acentuada liberação nas células expostas ao OxF quando comparadas ao tratamento com BaP. A observação dos valores de IC_{50} , mostra uma maior toxicidade de OxF quando comparada ao BaP e os resultados das análises das enzimas antioxidantes nos revelam que *M. polymorphus* usa diferentes estratégias frente aos agentes tóxicos. Tendo em vista a inibição de CAT e APx, as células sob exposição ao OxF utilizam a eliminação direta de H₂O₂ no meio e, eliminação *via* ação da GST. No entanto, tal situação parece não diminuir os níveis de lipoperoxidação, mesmo com consumo excessivo de Asc. As culturas expostas ao BaP evitam a evolução de H₂O₂ *via* atividade enzimática preferencial e os níveis baixos de GSH denotam a utilização de GST em processos de conjugação de xenobióticos.

Palavras chave: poluição, ecotoxicologia, bioindicadores, algas, biomarcadores, estresse oxidativo, H₂O₂.

ABSTRACT

Torres, M.A. (2008) Oxidative stress markers in *Minutocellus polymorphus* (Heterokontophyta) under oxyfluorfen and benzo[a]pyrene exposure. 188pp. Tese de Doutorado – Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Bioquímica). Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

The use of biochemical oxidative stress biomarkers in microalgae, as early watches during xenobiotic exposure are emphasized. The growth curve and the diary cells population increase rate (μ) were determined by chlorophyll fluorescence *in vivo* monitoring. Applying toxicological *in vitro* tests protocols and using microalgae exposed for 48h, we have determined the effective concentration that provoked 50% of μ inhibition (IC_{50}). *M. polymorphus* cultures in an initial cellular concentration of 1×10^6 cell.mL⁻¹ were separately submitted to IC_{50} oxyfluorfen (OxF) and benzo[a]pyrene (BaP) during 48h and, after that, they were gathered to the kinetics enzymatic assay using spectrophotometer. The levels of MDA and the levels of GSH/GSSG plus Asc⁻ were determined in the HPLC system coupling to the fluorescence and coulometric *flow-through* detectors, respectively. Additionally, *in vivo* H₂O₂ excretion/releasing assays were done using a luminometer associated to the luminol technique. The IC_{50} obtained in the OxF and BaP tests brought out the values $0.24 \mu\text{L}^{-1}$ and $0.99 \mu\text{g.L}^{-1}$ respectively. The results from the enzymatic analyses in the culture under OxF exposure, when compared to the controls, have shown increases in the SOD activities (150 ± 7 and 32 ± 6 USOD.mg.prot⁻¹) followed by minor results to CAT (6.5 ± 0.7 and 3.9 ± 0.5 U.mg.prot⁻¹) and APx activities (1.01 ± 0.06 and 0.82 ± 0.05 U.mg.prot⁻¹), respectively. On the other hand, in cultures under BaP treatment, the results compared to the control have shown an increase of CAT (35.7 ± 1.3 and 4.0 ± 0.9 U.mg.prot⁻¹) and APx activities (4.95 ± 0.06 and 0.86 ± 0.03 U.mg.prot⁻¹) followed by minor SOD activities (105 ± 6 and 35 ± 5 USOD.mg.prot⁻¹). The results from enzymatic analyses of GR and DHAR under OxF exposure presented around 50% of controls value (0.78 ± 0.07 and 0.43 ± 0.08 U.mg.prot⁻¹ respectively). Contrarily, the culture under BaP treatment didn't show any variation compared to the controls. Instead, GST analyses - in the culture under OxF treatment - have shown minor activity (176 ± 28 and 73 ± 18) facing the cell cultures under BaP exposure (402 ± 67 and 71 ± 24), when compared to the controls. In the cultures under OxF and BaP treatment, HPLC analyses displayed an increase of 9 and 5 fold, respectively, in the MDA levels. The results of GSH in cultures under OxF have shown a decrease of 40% GSH_{total} when compared to the control, and more than 50% in cultures under BaP treatment. In addition, the percentage of GSH in the GSSG form compared to GSH_{total} (%RI – Redox index) was 60 and 75% in the OxF and BaP groups, respectively. In the results obtained in analyses of Asc⁻ there are a decrease of 45% in cultures under OxF and a little bit more than 15% in cultures under BaP treatment. The analyses of *in vivo* H₂O₂ excretion/releasing have shown pronounced freeing in the cell under OxF exposure when compared with BaP cultures. The results of IC_{50} value point to an increased toxicity in cells under OxF treatment in comparison to BaP cultures. On the other hand the results of antioxidant enzymes have shown us different strategies used by *M. polymorphus* facing the toxic agents. Having in mind the inhibition of CAT and APx, the cells under OxF exposure adopt the direct elimination of H₂O₂ in the culture medium and *via* GST activity. However, this situation seems not reduce the lipoperoxidation levels, not even, under the exceedingly Asc⁻ consuming. Cultures exposed to BaP avoid H₂O₂ evolution de mainly *via* enzymatic activity and the lower levels of GSH pointing to the activity of GST during xenobiotic conjugation process.

Key words: Pollution, ecotoxicology, bioindicators, algae, biomarkers, oxidative stress, H₂O₂.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 – DIAGRAMA ESQUEMÁTICO DOS PROCESSOS DE INTERAÇÃO ENTRE AR-ÁGUA-FITOPLANCTON.....	22
FIGURA 2 – ESQUEMA GERAL DA AÇÃO DO OXIFLUORFENO	28
FIGURA 3 – ESQUEMA GERAL DA AÇÃO DO BENZO[A]PIRENO.....	34
FIGURA 4 – CICLO BIOGEOQUÍMICO DE POLUENTES E SUAS IMPLICAÇÕES NO AMBIENTE AQUÁTICO.....	38
FIGURA 5 – DISTRIBUIÇÃO ELETRÔNICA π^*2P DO OXIGÊNIO.....	43
FIGURA 6 – ESQUEMA DAS REAÇÕES DE REDUÇÃO MONOELETRÔNICA DO O_2 E A FORMAÇÃO DE INTERMEDIÁRIOS REATIVOS.	44
FIGURA 7 – REAÇÕES FOTOQUÍMICAS E A FORMAÇÃO DE OXIGÊNIO SINGLETE	45
FIGURA 8 – ESQUEMA GERAL DE INTEGRAÇÃO ENTRE GSH E ASC^-	49
FIGURA 9 – ESQUEMA GERAL DA INTEGRAÇÃO DAS DEFESAS ANTIOXIDANTES ENZIMÁTICAS E NÃO-ENZIMÁTICAS EM ALGAS	51
FIGURA 10 – ESQUEMA GERAL DOS TRÊS ESTÁGIOS DAS REAÇÕES ENVOLVIDAS EM PROCESSO DE PEROXIDAÇÃO DE LIPÍDEOS.....	54
FIGURA 11 – INTEGRAÇÃO DAS FASES QUE COMPÕE O SISTEMA DE DESINTOXICAÇÃO DE XENOBIÓTICOS	55
FIGURA 12 – ESQUEMA SIMPLIFICADO DA ATIVIDADE MONOOXIGENÁSICA CATALISADA PELO SISTEMA MICROSSOMAL CITOCROMO P450.....	57
FIGURA 13 – REAÇÕES TÍPICAS CATALISADAS PELA GST	59
FIGURA 14 – FOTO DAS CULTURAS AXÊNICAS DE <i>M. POLYMORPHUS</i> E FOTO DAS AMOSTRAS DE <i>K. ALVAREZII</i>	67
FIGURA 15 – PROCEDIMENTO DE COLETA DE AMOSTRAS PARA CONSTRUÇÃO DA CURVA DE CRESCIMENTO DE <i>M. POLYMORPHUS</i> COM BASE NA FLUORESCÊNCIA <i>IN VIVO</i> DA CLOROFILA.	68

FIGURA 16 – ESQUEMA ILUSTRATIVO QUE MOSTRA OS CRITÉRIOS PARA OBTENÇÃO DOS PONTOS (Δ FL) PARA CONSTRUÇÃO DA CURVA DOSE-RESPOSTA.....	71
FIGURA 17 – ILUSTRAÇÃO DO PROTOCOLO DA 1ª. ETAPA - COLETA.....	72
FIGURA 18 – ILUSTRAÇÃO DO PROTOCOLO DA 2ª. ATAPA - ARMAZENAGEM.....	74
FIGURA 19 – ESQUEMA ILUSTRATIVO DO PROTOCOLO DE OBTENÇÃO DO EXTRATO PARA OS ENSAIOS ENZIMÁTICOS.....	75
FIGURA 20 – DESENHO EXPERIMENTAL DO ENSAIO PARA AVALIAR OS NÍVEIS DE LIBERAÇÃO DE H_2O_2	92
FIGURA 21 – ESQUEMA ILUSTRATIVO DO PROTOCOLO DE OBTENÇÃO DA FRAÇÃO MICROSSOMAL EM <i>K. ALVAREZII</i>	96

LISTA DE ABREVIATURAS

α-Toc – Alfa tocoferol	GST – Glutaciona s-transferase
α-Toc[•] – Radical alfa-tocoferoxila	HPAs – Hidrocarbonetos policiclicos aromáticos
γ-L-Glu-Cys – Gama-glutamyl-cisteína	HV – Voltamograma hidrodinâmico
¹ΔgO₂ – Oxigênio singlete	H⁺ – Proton
μ – Taxa de crescimento diário	H₂O₂ – Peróxido de hidrogênio
%inb.μ – Porcentagem de inibição de μ	IC₅₀ – Inibição de μ em 50%
hν – Radiação eletromagnética	IR – Índice redox
AOS – Ácido octanosulfônico	L-Cys – L-cisteína
APx – Ascorbato peroxidase	L-Glu – L-ácido glutâmico
Asc⁻ – Ascorbato	L-Gly – L-glicina
BaP – Benzo[a]pireno	LHGPx – GPx específica a hidroperóxidos
BHT – Butilhidroxitolueno	LOH – Molécula hidroxilada
CAT – Catalase	LOOH – Hidroperóxido
CCM – Mecanismo concentrador de carbono	LOO[•] – Radical peroxila
CDNB – 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno	L[•] – Radical alila
CE – Concentração efetiva	LPO – Lipoperoxidação
CE₅₀ – CE que inibe um parâmetro em 50%	K_{ow} – Constante de partição octanol-água
CYP450 – Citocromo P450	Log K_{ow} – Logaritmo de K _{ow}
Cit b6/f – Citocromo b6/f	M⁽ⁿ⁻¹⁾⁺ – Metal na forma reduzida
Cit c – Citocromo C	Mn⁺ – Metal na forma oxidada
DD – Dihidrodiol desidrogenase	MDA – Malondialdeído
DFE – Difenil éter	MDAR – Monodehidroascorbato redutase
DHAR – Dehidroascorbato redutase	MDA-TBA₂ – Aduto do MDA com TBA
DHAsc – Dehidroascorbato	MDHAsc^{••} – Monodehidro ascorbato radical
DTE – Ditioeritritol	MMO – Monooxigenase
DTT – Ditiotreitól	MOPS – Ácido 3-(N-morfolino) propano sulfônico
ECOD – Etoxicumarina-o-desetilase	MAP – Ácido metafosfórico
EDTA – Ácido etilenodiaminotetraacético	NADPH – Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida
EH – Epoxihidrolase microsomal	NADP⁺ – Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidada
EROD – Etoxirosorufina-o-desetilase	n-DTA – n-dodeciltrimetilamônio
EROs – Espécies reativas de oxigênio	OxF – Oxifluorfenol
e⁻ – Eletron	O₂^{•-} – Radical ânion superóxido
FL – Fluorescência	•OH – Radical hidroxila
GPx – Glutaciona peroxidase	PAR – Radiação fotossinteticamente ativa
GR – Glutaciona redutase	PCBs – Bifenilas policloradas
GS[•] – Radical glutacionila	PCS – Fitoquelatina sintase
GSH – Glutaciona reduzida	
GSSG – Glutaciona oxidada	

PMSF – Fluoreto de fenilmetilsulfonila
POPs – Poluentes orgânicos persistentes
PpIX – Protoporfirina IX
PpnIX – Protoporfirinogênio IX
Proteína-SH – Proteína reduzida
Proteína-S-S – Proteína oxidada
PROTOX – Protoporfirinogênio IX oxidase
PSI – Fotossistema I
PSII – Fotossistema II
PVP – Polivinilpirrolidona
Px_(n.e.) – Peroxidases não específicas
R[•] – Radical
RH – Molécula protonada
RO[•] – Radical alcoxila
R-SG – Substrato glutatiolado
RX – Co-substrato para GST

SOD – Superoóxido dismutase
S₀ – Estado singlete fundamental
S₁ – Estado singlete excitado
T₀ – Estado triplete fundamental
T₁ – Estado triplete excitado
TBA – Ácido tiobarbitúrico
t-BOOH – t-butilhidroperóxido
TEP – 1,1,3,3-tetraetoxipropano
TRIZMA – Tris (hidroximetil) aminometano
UV – radiação ultravioleta
XO – Xantina oxidase

LISTA DAS ESPÉCIES REFERIDAS

<i>Ulva rigida</i>	Chlorophyta	Alga verde
Nome científico	Divisão	Grupo
<i>Anabaena flos-aquae</i>	Cyanophyta	Cianobactéria
<i>Ankistrodesmus braunii</i>	Chlorophyta	Microalga verde
<i>Chlamydomonas eugametos</i>	Chlorophyta	Microalga verde
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	Chlorophyta	Microalga verde
<i>Chlorella fusca</i>	Chlorophyta	Microalga verde
<i>Chlorella kessleri</i>	Chlorophyta	Microalga verde
<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	Chlorophyta	Microalga verde
<i>Chlorella sorokiniana</i>	Chlorophyta	Microalga verde
<i>Chlorella vulgaris</i>	Chlorophyta	Microalga verde
<i>Cladophora glomerata</i>	Chlorophyta	Microalga verde
<i>Cucumis sativus</i>	Magnoliophyta	Planta (agricul)
<i>Cyclotella ocellata</i>	Heterokontophyta	Diatomácea
<i>Ditylum brightwellii</i>	Heterokontophyta	Diatomácea
<i>Enteromorpha ahneriana</i>	Chlorophyta	Microalga verde
<i>Enteromorpha intestinalis</i>	Chlorophyta	Microalga verde
<i>Fucus vesiculosus</i>	Heterokontophyta	Alga marrom
<i>Kappaphycus alvarezii</i>	Rhodophyta	Alga vermelha
<i>Laminaria saccharina</i>	Heterokontophyta	Alga marrom
<i>Laminaria sp.</i>	Heterokontophyta	Diatomácea
<i>Lingulodinium polyedrum (Gonyaulax polyedra)</i>	Dinophyta	Dinoflagelado
<i>Lemna minor</i>	Magnoliophyta	Planta (aquática)
<i>Lemna gibba</i>	Magnoliophyta	Planta (aquática)
<i>Melosira islandica</i>	Heterokontophyta	Diatomácea
<i>Microcystis aeruginosa</i>	Cyanophyta	Cianobactéria
<i>Minutocellus polymorphus</i>	Heterokontophyta	Diatomácea
<i>Nitzschia sigma</i>	Heterokontophyta	Diatomácea
<i>Ochromonas malhamensis</i>	Heterokontophyta	Microalga dourada
<i>Peridinium gatunense</i>	Dinophyta	Dinoflagelado
<i>Scenedesmus armatus</i>	Chlorophyta	Microalga verde
<i>Scenedesmus acutus</i>	Chlorophyta	Microalga verde
<i>Scenedesmus bijugatus</i>	Chlorophyta	Microalga verde
<i>Scenedesmus obliquus</i>	Chlorophyta	Microalga verde
<i>Scenedesmus quadricauda</i>	Chlorophyta	Microalga verde
<i>Scenedesmus subspicatus</i>	Chlorophyta	Microalga verde
<i>Selenastrum capricornutum</i>	Chlorophyta	Microalga verde
<i>Skeletonema costatum</i>	Heterokontophyta	Diatomácea
<i>Synechococcus leopoliensis</i>	Cyanophyta	Cianobactéria
<i>Stichococcus bacillaris</i>	Chlorophyta	Microalga verde
<i>Tetraselmis gracilis</i>	Chlorophyta	Microalga verde
<i>Thalassiosira pseudomona</i>	Heterokontophyta	Diatomácea
<i>Ulva lactuca</i>	Chlorophyta	Alga verde

SUMÁRIO

1.INTRODUÇÃO	17
1.1 A ATIVIDADE HUMANA E A INTEGRIDADE OCEÂNICA	19
1.2 DINÂMICA COMPORTAMENTAL DE POLUENTES NO AMBIENTE AQUÁTICO	21
1.3 NOVAS MOLÉCULAS PARA UM ANTIGO PROBLEMA.....	23
1.3.1 Praguicidas	23
1.3.1.1 Ação do herbicida oxifluorfenol (OxF).....	25
1.3.2 Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos.....	29
1.3.2.1 Ação do benzo[a]pireno (BaP).....	31
1.4 TOXICOLOGIA AQUÁTICA E BIOMONITORAMENTO.....	37
1.5 ALGAS COMO BIOINDICADORES.....	40
1.6 BIOMARCADORES DE POLUIÇÃO AQUÁTICA.....	41
1.6.1 Espécies reativas de oxigênio	42
1.6.1.1 Defesas antioxidantes não enzimáticas	46
a) Glutationa:	46
b) Ascorbato:.....	47
1.6.1.2 Defesas antioxidantes enzimáticas.....	49
a) Superóxido dismutase:	49
b) Catalase:.....	50
c) Ascorbato peroxidase:.....	50
d) Redutases:	52
e) Mecanismos alternativos:.....	52
1.6.1.3 Lipoperoxidação.....	53
1.6.2 Sistemas de biotransformação de xenobióticos.....	55
1.6.2.1 Citocromo P450 (Transformação – Fase I)	56
1.6.2.2 Glutationa s-transferase (Conjugação – Fase II)	58
1.6.2.3 Excreção e/ou compartimentalização e estoque (Fase III)	59
2.OBJETIVOS	60

3. MATERIAIS E MÉTODOS	63
3.1 MANIPULAÇÃO DAS CULTURAS	65
a) Equipamentos utilizados	65
b) Reagentes utilizados	65
c) Soluções utilizadas	65
d) Materiais utilizados	65
3.1.1 Culturas	66
3.1.2 Determinação da curva de crescimento por fluorescência <i>in vivo</i> da clorofila	67
3.1.3 Teste toxicológico em <i>M. polymorphus</i> (determinação do IC ₅₀)	69
3.1.4 Delineamento experimental.....	72
3.1.4.1 Coleta do material e armazenagem.....	72
3.2 ENSAIOS ENZIMÁTICOS	74
a) Equipamentos utilizados	74
b) Reagentes utilizados	74
c) Soluções utilizadas	74
d) Materiais utilizados	75
3.2.1 Obtenção dos extratos.....	75
3.2.2 Estresse Oxidativo	76
3.2.2.1 Catalase (E.C.: 1.11.1.6)	76
3.2.2.2 Glutathiona Peroxidase (E.C.: 1.11.1.9).....	76
3.2.2.3 Glutathiona Redutase (E.C.: 1.6.4.2).....	77
3.2.2.4 Ascorbato peroxidase (E.C.:1.11.1.11).....	78
3.2.2.5 Dehidroascorbato redutase (E.C.: 1.8.5.1)	79
3.2.2.6 Superóxido dismutase (E.C.: 1.15.1.1)	79
3.2.3 Biotransformação - Fase II	81
3.2.3.1 Glutathiona s-transferase (E.C.: 2.5.1.18 - GST).....	81
3.3 ENSAIOS CROMATOGRÁFICOS	82
a) Equipamentos utilizados	82
b) Reagentes utilizados	82
c) Soluções utilizadas	83
d) Materiais utilizados	83
3.3.1 Avaliação dos níveis de malondialdeído (MDA - (TBA) ₂)	84
3.3.1.1 Preparação da curva de calibração.....	84
3.3.1.2 Preparação das amostras	84
3.3.1.3 Análises.....	85
3.3.2 Avaliação dos níveis de GSH e GSSG.....	85
3.3.2.1 Construção do voltamograma hidrodinâmico	86

3.3.2.2	Preparação da curva de calibração.....	86
3.3.2.3	Preparação das amostras	86
3.3.2.4	Análises.....	87
3.3.3	Avaliação dos níveis de Asc ⁻	87
3.3.3.1	Construção do Voltamograma hidrodinâmico.....	88
3.3.3.2	Preparação da curva de calibração.....	88
3.3.3.3	Preparação das amostras	88
	Para determinação de Asc ⁻ :	88
	Para determinação de Asc ⁻ _{total} (Asc ⁻ + DHAsc)	89
3.3.3.4	Análises.....	89
3.4	DETERMINAÇÃO DE H ₂ O ₂ E PROTEÍNAS	89
a)	Equipamentos utilizados	90
b)	Reagentes utilizados.....	90
c)	Soluções utilizadas	90
d)	Materiais utilizados	90
3.4.1	Níveis de liberação <i>in vivo</i> de H ₂ O ₂	90
3.4.1.1	Descrição do ensaio	91
3.4.1.2	Desenho experimental.....	91
3.4.1.3	Preparação da curva de calibração.....	92
3.4.2	Quantificação de proteínas	92
3.5	ANÁLISE ESTATÍSTICA	93
3.6	ENSAIOS COM <i>K. ALVAREZII</i>	93
a)	Equipamentos utilizados	94
b)	Reagentes utilizados.....	94
c)	Materiais utilizados.....	94
3.6.1	Extração e obtenção da fração microssomal	94
3.6.2	Caracterização e quantificação de CYP450	96
4.	RESULTADOS	96
4.1	CULTURAS	99
4.2	CURVA DE CRESCIMENTO	100
4.2.1	Estudo da fluorescência <i>in vivo</i>	100
4.2.2	Monitoramento do crescimento das culturas.....	100
4.2.3	Ajuste dos pontos a uma equação de desenvolvimento exponencial	101
4.3	DETERMINAÇÃO DO IC ₅₀	102

4.3.1 Coleta e tratamento dos dados	102
4.3.2 Ajuste dos pontos a uma equação dose-resposta	104
4.4 ENZIMAS ANTIOXIDANTES	105
4.4.1 Catalase	105
4.4.2 Glutaciona peroxidase	106
4.4.3 Glutaciona redutase	106
4.4.4 Ascorbato peroxidase	107
4.4.5 Dehidroascorbato redutase	108
4.4.6 Superóxido dismutase	109
4.4.7 Resumo geral	109
4.5 ENZIMAS BIOTRANSFORMAÇÃO (FASE - II)	110
4.5.1 Glutaciona s-transferase	110
4.6 NÍVEIS DE MDA – (TBA) ₂	111
4.6.1 Curva de calibração	111
4.6.2 Resultados obtidos nas amostras	112
4.7 NÍVEIS DE GSH E GSSG	113
4.7.1 Voltamograma hidrodinâmico	114
4.7.2 Curva de calibração	115
4.7.3 Determinação do índice redox IR (%) nas amostras.....	116
4.7.4 Resumo geral	117
4.8 NÍVEIS DE Asc ⁻	119
4.8.1 Voltamograma hidrodinâmico	119
4.8.2 Curva de calibração	120
4.8.3 Resultados obtidos nas amostras	120
4.9 NÍVEIS DE LIBERAÇÃO <i>IN VIVO</i> DE H ₂ O ₂	122
4.10 EXPERIMENTOS COM <i>K. ALVAREZII</i>	123
5. DISCUSSÃO	123
5.1 CULTURAS E CURVAS DE CRESCIMENTO	125
5.1.1 Utilização de <i>M. polymorphus</i> e meio f/2	125
5.1.2 Curva de crescimento: fluorescência da clorofila <i>versus</i> contagem celular.....	125
5.2 TESTE TOXICOLÓGICO E CONCENTRAÇÃO EFETIVA - IC ₅₀	127
5.2.1 Tempo de exposição	127
5.2.2 Concentração do inóculo	128
5.2.3 Indicador de toxicidade (μ).....	128
5.2.3.1 Toxicidade de OxF	129
a) Influência de OxF no parâmetro fluorescência da clorofila	130

b) Influência da irradiância luminosa na ação de OxF	131
5.2.3.2 Toxicidade de BaP	132
a) Influências da foto/bioativação espécie-específica de BaP	133
b) Influências da disponibilidade de carbono na toxicidade de BaP em culturas não aeradas.....	134
5.3 ESTRESSE OXIDATIVO	135
5.3.1 A Ação do OxF	135
5.3.2 A Ação do BaP	142
5.4 EXPERIMENTOS <i>K. ALVAREZII</i>	147
5.5 ALGAS COMO INDICADORES UNIVERSAIS	148
6. CONCLUSÕES	148
6.1 ENSAIO TOXICOLÓGICO.....	151
6.2 MARCADORES DE ESTRESSE OXIDATIVO	152
7.BIBLIOGRAFIA.....	151
8. APÊNDICE.....	178
ANEXOS	

1. INTRODUÇÃO

“It is unrealistic to expect that complex ecosystem-level assessments will ever become a part of routine ecotoxicological procedures ... for the foreseeable future, the prediction of ecosystem stress must rely heavily on bioassays and monitoring at simpler scales.”

Schindler, D.W. ¹

1.1 A atividade humana e a integridade oceânica

O ambiente aquático é altamente complexo, e por essa razão escultura - se como um dos mais distintos e variados ecossistemas, abrangendo tanto os biomas de água doce como os grandes ecossistemas marinhos.²⁻⁴ Em todo o planeta, mais de 3 bilhões de pessoas vivem nas proximidades litorâneas movidos pela expansão das atividades econômicas e/ou pelas características físicas e condições de vida locais.⁵ Situação essa que faz com que os dejetos produzidos, tanto de origem industrial como doméstico, e a destruição de habitats naturais tenham impactos substanciais nos ambientes costeiros.⁶

Apesar das evidências acima citadas, não é nova a ação poluidora do homem, fato esse, que remonta ao início das atividades da civilização humana.⁷ Entretanto, o problema da poluição foi negligenciado, até aproximadamente dois séculos atrás,⁸ onde os efeitos da industrialização, da agricultura intensiva e da exploração dos estuários decorrentes da ocupação urbana ou mesmo turística, atingiram limiares com graves reflexos e conseqüências, as mais adversas, para todos os ecossistemas. Particularmente, ao bioma marinho, gerando uma ameaça direta ao futuro da humanidade.⁹

Atrelado ao fato de que o avanço do desenvolvimento tecnológico é o responsável pelo impacto do uso indiscriminado dos recursos naturais,¹⁰ assumiu-se, além disso, os oceanos como vastos reservatórios e sistemas diluidores infindáveis.^{11,12} Como decorrência de tais prerrogativas, muitos contaminantes

químicos, incluindo organoclorados, herbicidas, efluentes (domésticos e industriais), derivados de petróleo e metais pesados são agora reconhecidos por seus efeitos adversos em ambientes oceânicos, os mais remotos, mesmo quando em baixas concentrações.¹³

Segundo a mesma tendência, as regiões costeiras brasileiras, em sua maior parte, sofrem um impacto antropogênico crescente, decorrente do crescimento desordenado, favorecido pela especulação imobiliária e, de um sistema de tratamento de efluentes, quando não inexistente, altamente deficitário.¹⁴ Considerando os estados brasileiros, as regiões Sul e Sudeste apresentam 45% e 43%, respectivamente, de seus municípios vitimados por poluição freqüente da água (nascentes, águas subterrâneas, rios, lagos, lagoas, enseadas, represas, açudes, baías, mares, etc.). Ainda, a poluição da água é verificada com maior freqüência nos municípios mais populosos, atingindo 94% dos municípios brasileiros com mais de 500 mil habitantes.¹⁵ Não obstante, aproximadamente 5,5% dos habitantes do Estado de São Paulo vivem nos municípios costeiros totalizando aproximadamente dois milhões de habitantes podendo chegar a cinco milhões na época de verão associado ao período de férias. Observa-se, *via de regra*, que a expansão da população urbana no litoral de São Paulo, não tem sido acompanhada pela extensão dos serviços básicos de infra-estrutura especialmente coleta e tratamento de esgotos.¹⁶

Segundo Lovejoy,¹⁷ a atividade humana foi e continua sendo responsável pelo maior declínio da diversidade biológica e o problema fica ainda mais acentuado ao somarem-se todos os impactos causados pela ação do homem. Essa ação em conjunto, poderia acelerar as taxas de extinções naturais do planeta a uma ordem de 1000 a 10000 vezes.¹⁸ Embora tenha havido importantes tentativas

acerca de uma consciência global sobre poluição aquática,¹⁹ muitas nações desenvolvidas e em desenvolvimento ainda produzem grande quantidade de poluentes. Infelizmente, o problema da poluição é caracterizado por complexas interconexões, incertezas, conflitos e constrangimentos que o torna algo de difícil solução.²⁰

Não obstante, a evidência de que os oceanos cobrem mais de 70% da superfície da Terra, os torna suscetíveis ao contato com a maioria das substâncias químicas produzidas pelo homem. O problema se agrava quando consideramos a existência de uma vasta diversidade de vida vegetal e animal, presentes nas regiões estuarinas, e não menos pródiga em mar aberto. Dada a problemática, suscita-se então, a necessidade imperativa de avaliações toxicológicas dos efeitos desses agentes químicos em organismos marinhos.

1.2 Dinâmica comportamental de poluentes no ambiente aquático

Parece incrível, *prima facie*, que poluentes relativamente não voláteis, eventualmente viajem milhares de quilômetros pelo ar a partir de seu ponto de origem (*Long-Range Transport of Atmospheric Pollutants*),²¹ e terminem contaminando áreas até então imaculadas.²² Esse aspecto extremamente importante da ação poluidora de xenobióticos, transcende fronteiras e passa com isso a ser um problema pertencente a todas as nações.²³

Poluentes com características hidrofóbicas com tempo considerável de persistência no ambiente, os chamados Poluentes Orgânicos Persistentes (POPs), constituem um grupo de compostos químicos (às vezes com heteroátomos) com elevada capacidade de acumulação. Normalmente emanam de fontes antropogênicas e acessam o ambiente através da atividade industrial e/ou de

insumos agrícolas¹³ e estão sob crescente interesse devido ao seu impacto no ambiente.^{24,25} Além de fatores físico-químicos, parâmetros como a biomassa planctônica e taxa de crescimento, influenciam no dinamismo desses compostos no ar, na água, no sedimento e a acumulação dos mesmos em organismos marinhos (Fig. 1).²⁶ Poluentes com baixo coeficiente de partição octanol-água ($\log K_{ow} < 5$) podem ser acumulados e metabolizados por microrganismos aquáticos *via* ingestão/filtração. Enquanto que, compostos mais hidrofóbicos ($\log K_{ow} > 5$) podem sofrer partição para as membranas lipídicas causando sua biomagnificação.²⁷ Assim, dependendo da interação que poluentes possam ter sobre a comunidade planctônica, poderá haver uma redução da exposição de macro organismos aos poluentes, ou, particularmente microalgas, na zona eufótica, podem facilitar a biodisposição de contaminantes funcionando como importantes reservatórios de xenobióticos para organismos de níveis tróficos superiores.^{5,28}

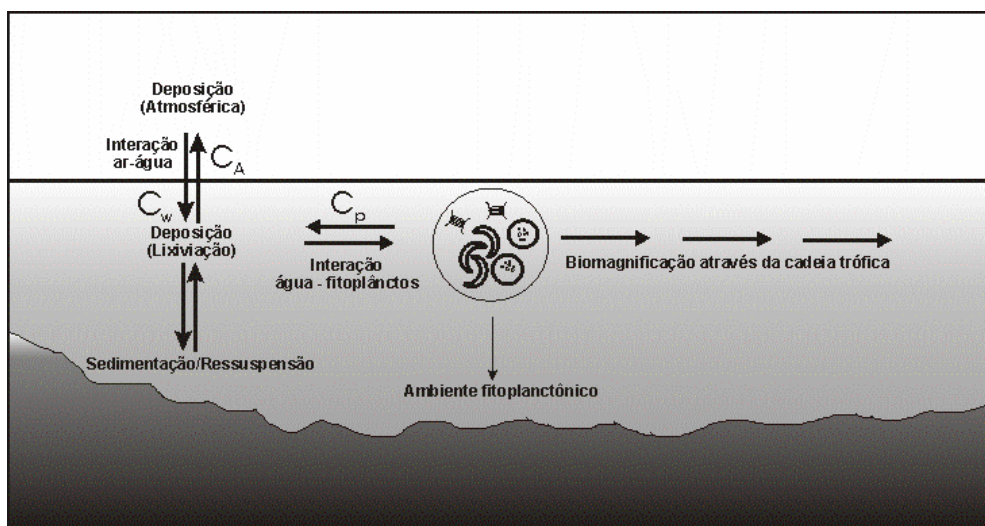


Figura 1 – Diagrama esquemático dos processos de interação entre ar-água-fitoplâncton. A biodisponibilidade e direcionamento de poluentes em corpos aquáticos dependem, além das propriedades físico-químicas dos compostos, das interações dos mesmos com a população planctônica. C_A , concentração do poluente no ar; C_W , na água e C_P , nos fitoplânctons. Adaptado a partir dos trabalhos de Torres e Dachs.

1.3 Novas moléculas para um antigo problema

Um dos mais marcantes exemplos de ação de xenobióticos está relacionado com o acrônimo PCBs, ou bifenilas policloradas, que encontrou uma vasta aplicabilidade na sociedade moderna (e.g. fluido refrigerante em transformadores elétricos, motores, *etc.*)^{27,29} e causou grande preocupação ambiental.³⁰ Resquícios ainda são detectáveis na grande maioria dos oceanos do mundo (e.g. do Ártico ao continente Antártico e de regiões entre-marés às profundezas abissais).³¹⁻³³ Pesquisas com Arochlor 1254 (uma mistura de PCBs com 54% de cloração),³⁴ que é encontrado em todos os ecossistemas aquáticos,³⁵⁻³⁷ mostraram elevada toxicidade e ação deletéria quando na presença do dinoflagelado *Lingulodinium polyedrum*.³⁸

Com o aumento da demanda alimentar e do consumo de petróleo no mundo, duas novas classes de xenobióticos, os pesticidas e os policíclicos aromáticos, assumem um lugar preocupante na classificação das moléculas potencialmente lesivas ao ambiente.

1.3.1 Praguicidas

Durante os últimos anos, muitos trabalhos têm enfatizado os danos ecológicos decorrentes do amplo uso de defensivos agrícolas.³⁹⁻⁴³ Níveis residuais de tais compostos podem constituir, em alguns casos, agentes poluidores, particularmente quando usados por um longo período.⁴⁴ Assim, a despeito de sua importância capital, a atividade agrícola é considerada, por tais evidências, uma fonte importante de poluição.⁴⁵ Sobretudo no que concerne ao uso de praguicidas (herbicidas, inseticidas, raticidas, *etc.*), são os agentes mais devastadores dos ecossistemas aquáticos.^{22,46}

A classificação dos praguicidas é controversa, pois várias denominações têm sido empregadas para designar sua ação (e.g. defensivos agrícolas, biocidas, pesticidas, agrotóxicos, etc.).⁴⁷ Pela legislação brasileira, tais compostos são denominados de “agrotóxicos”.⁴⁸ E, ainda, são constituídos de uma classificação complementar, porém, não menos diversa (e.g. herbicidas, fungicidas, inseticidas, etc.) com variadas classes químicas (e.g. organofosforados, clorofenoxiácidos, triazínicos, difeniléteres, etc.) com diferentes propriedades físico-químicas (e.g. log K_{ow} , solubilidade, pressão de vapor, etc.). Entretanto, elaborados com características voltadas a aplicações bem específicas.^{49,50} O pesticida mais seguro deveria ser aquele que não afeta espécies *não-alvo* e tem uma baixa persistência no ambiente.⁵¹ No entanto, na prática, a maioria deles freqüentemente tem uma baixa taxa de degradação, pois substâncias muito biodegradáveis têm aplicabilidade reduzida.⁵² Portanto, é relativamente comum que consideráveis quantidades de pesticidas se acumulem no ambiente.⁵⁰ Paradoxalmente, é importante relatar que a persistência no ambiente, que aumenta a eficácia do composto, também aumenta seu potencial de impacto ambiental.^{9,51} Além disso, pesticidas nem sempre permanecem no solo, onde originalmente foram aplicados, ao contrário, podem ser depositados em lugares os mais diversos através de processo erosivos, lixiviação, evaporação, percolação, etc.⁵³

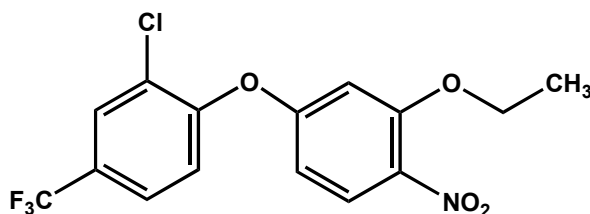
Um complexo conjunto de fatores determina o destino final de um pesticida após a aplicação no solo (metodologia utilizada, ingredientes ativos, condições da água, topografia do terreno, tipo de solo, etc.) tais fatores terão influência direta sobre a persistência e a extensão da contaminação em sítios *não-alvos*.⁵⁴ Além disso, abusos e utilização excessivos de agentes praguicidas aumentam a

probabilidade de efeitos negativos em organismos da biota aquática e terrícola, além de afetar microorganismos.⁵⁵

1.3.1.1 Ação do herbicida oxifluorfeno (OxF)

O herbicida oxifluorfeno (OxF), nome comercial GOAL™, (Tab. 1) é um difenil éter (DFE) nitrado, usado correntemente em mais de 50 diferentes tipos de cultivo ao redor do mundo, sendo chamado de “herbicida dos mil usos”.⁵⁶

Tabela 1 – Estrutura molecular, informações físico-químicas e propriedades espectrais do herbicida oxifluorfeno.^{57, 58}



Nome IUPAC:

2-cloro- α,α,α -trifluoro-*p*-tolil-3-etoxi-4-nitrofeniléter

Nome Comum	Oxifluorfeno
Família	difenil éter
CAS No.	42874-03-3
Formula Molecular	C ₁₅ H ₁₁ ClF ₃ NO ₄
Peso Molecular	361,72 g.mol ⁻¹
Densidade	1,49 g.mL ⁻¹
Pressão de Vapor	2,5 x 10 ⁻⁷ Torr a 25 °C
Log.K_{ow}	4,47
Solubilidade (H₂O)	100 µg.L ⁻¹
λ_{ex} e λ_{em}	323 e 350 nm

Está registrado em um grande número de países e tem grandes possibilidades de uso na América Latina e na região do Pacífico.⁵⁶ No Brasil, o OxF foi experimentado em diferentes cultivos desde 1975, onde obteve grandes perspectivas de consumo. O primeiro registro no Brasil foi em 1979 para seu uso em culturas de café, soja, algodão, plantação de pinheiros e eucaliptos, e em 1983, foram obtidos registros para a cultura do arroz.⁵⁹

A atividade pré-emergente de OxF é dependente de adequada umidade do solo durante a aplicação. Por essa razão, OxF tem se mostrado especialmente ativo em culturas irrigadas (e.g. arroz). OxF adere às partículas do solo, formando uma barreira química nos primeiros centímetros da superfície do solo contra as ervas daninhas que emergem.^{60,61} No entanto, dependendo do tipo de manejo de água adotado pelos produtores e, das condições de precipitação pluviométrica após as aplicações, existe o risco dos resíduos dos agrotóxicos serem carregados para fora da lavoura, afetando os organismos aquáticos em águas próximas.⁶² Além disso, em estados brasileiros como Santa Catarina e no Rio Grande do Sul, produtores de arroz irrigado adotam a prática da rizipiscicultura, atividade que poderia sofrer os efeitos diretos da ação desses produtos.^{59,61}

Apesar da crescente demanda dos herbicidas DFE, relativamente poucas informações estão disponíveis a respeito de como eles exercem seu efeito nas células vegetais.⁶⁰ Estudos com traçadores radioativos indicam que o OxF é metabolizado muito lentamente nas plantas, mostrando que provavelmente o herbicida, em si, seja o agente fitotóxico e não seus metabólitos.⁶³ Muito embora, se saiba, por estudos em simuladores solares e com fontes de radiação UV, que DFE são uma classe de compostos que requerem luz para ativar-se e, por reações fotoquímicas (fotoativação) no ambiente, derivados dessa molécula poderiam ter o

efeito tóxico.⁶⁴ A grande parte dos experimentos apontam para o mecanismo de ação de DFE (ou seus metabólitos) pela inibição da protoporfirinogênio IX oxidase (PROTOX),⁶⁵⁻⁶⁷ enzima responsável pela oxidação do protoporfirinogênio IX (PpnIX) à protoporfirina IX (PpIX), substrato comum na síntese do grupo heme e clorofila, na mitocôndria e cloroplasto respectivamente (Fig. 2). A síntese de clorofila inicialmente se dá a partir de precursores como ácido glutâmico (L-Glu) e ácido aminolevulínico (ALA) no estroma do cloroplasto (I) e finalmente termina na membrana tilacoidal com a formação de PpIX pela PROTOX (II) e, por uma série de reações posteriores indo até clorofila *a* (III).^{68,69} A síntese do grupo heme é feita na crista mitocondrial, a partir de PpnIX exportada do cloroplasto (IV).⁷⁰ Ou, como em mamíferos, onde a produção do grupo heme é iniciada na matriz mitocondrial, a partir de glicina (L-Gly) e ALA (V), com uma parte da via ocorrendo no citosol até a formação de PpnIX, que então, volta para mitocôndria (VI) e, finalmente, PpIX e o grupo heme são formados na crista mitocondrial pela PROTOX e reações posteriores respectivamente (VII).⁷¹ No entanto, essa via alternativa em plantas e algas ainda precisa de maiores estudos. Estando inibida a PROTOX, o PpnIX acumula-se no interior dos plastídios e posteriormente difunde-se para o citoplasma através da membrana plastidial (VIII).⁷² Uma vez no citosol, onde as enzimas de biossíntese da clorofila não são disponíveis, o PpnIX é oxidado à PpIX por reações radicalares ou oxidases extraorganelares resistentes a DFEs (IX). É portanto essa acumulação extraplastidial de PpIX, a responsável pelo caráter tóxico de herbicidas à base de DFEs.^{73,74} Além disso, a diminuição da síntese de PpIX pela inibição da PROTOX na membrana do cloroplasto pode prejudicar a sinalização celular entre cloroplasto e núcleo (X).

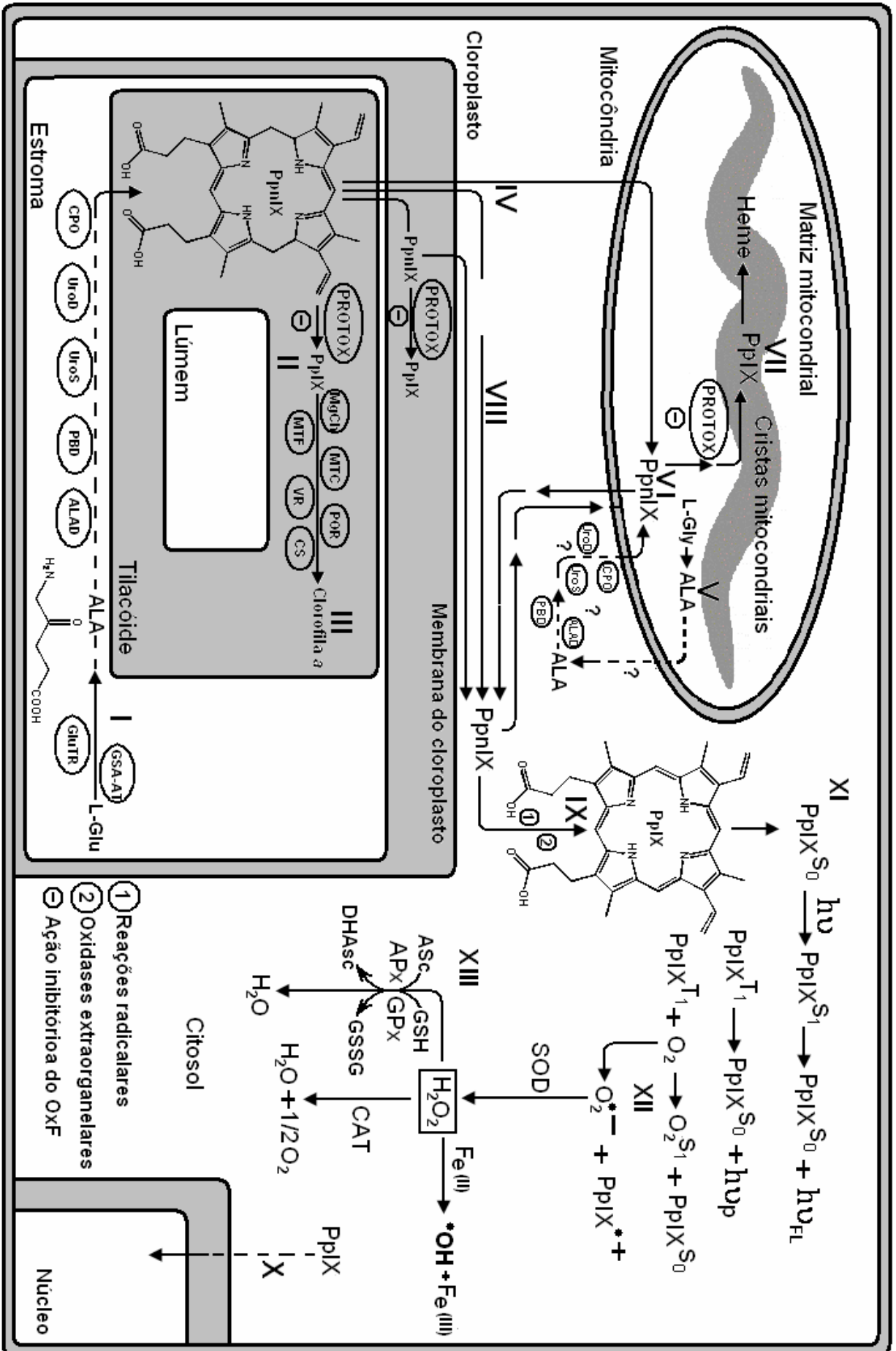


Figura 2 – Esquema geral dos precursores comuns na síntese de clorofila e do grupo heme no tilacóide e na crista mitocondrial respectivamente. PpIX, o fotosensibilizador, aumenta de concentração pela ação tóxica do herbicida. Ainda, reações fotoquímicas a partir de PpIX com geração de oxigênio singlete e/ou H_2O_2 e o acoplamento com o sistema de defesa antioxidante enzimático também são mostrados. (?) Indica que a via da síntese os intermediários de PpIX, no citosol, ainda precisam de maiores esclarecimentos. Adaptado a partir dos trabalhos de Orr,⁷⁵ Jacobs,⁷⁶ Jacobs e Jacobs,⁷⁷ Matsumoto, Eckhardt, Brusslan, Ryter, e Warabi,.

O efeito tóxico ocasionado pela acumulo de PpIX no citosol, poderia ser explicado através de reações fotoquímicas por se tratarem de potentes fotosensibilizadores.⁷⁸ Assim, uma vez no citosol no estado fundamental singlete ($PpIX^S_0$) (XI), na presença de luz, poderá absorver um fóton e ser excitada ao seu estado singlete ($PpIX^S_1$), que poderá fluorescer ao voltar ao seu estado fundamental $PpIX^S_0$. Entretanto, sob uma inversão de *spin* espontânea (ISC, *Intersystem crossing*), a espécie $PpIX^S_1$ poderá passar para o seu estado triplete ($PpIX^T_1$) e, uma vez formada, poderá decair ao estado fundamental $PpIX^S_0$ acompanhada da emissão de fosforescência. No entanto, na presença de oxigênio molecular, a espécie $PpIX^T_1$ pode formar espécies reativas de oxigênio (EROs), como o oxigênio singlete ($^1\Delta_gO_2$) - por transferência de energia, ou o radical ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$) - por transferência de elétrons (XII). (*vide* Item 1.6.1) Tal situação, potencializaria a mobilização das defesas relacionadas as EROs (*vide* Item 1.6.1.1 e 1.6.1.2), o que implicaria na geração de metabólitos intermediários com alto potencial lesivo (XIII) para a célula.^{79,80}

1.3.2 Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos

A poluição marinha por óleo cru tem recebido crescente atenção devido ao aumento de desastres ambientais com petroleiros, em decorrência da intensificação do tráfego marítimo,⁸¹ liberação de resíduos por refinarias costeiras⁸²

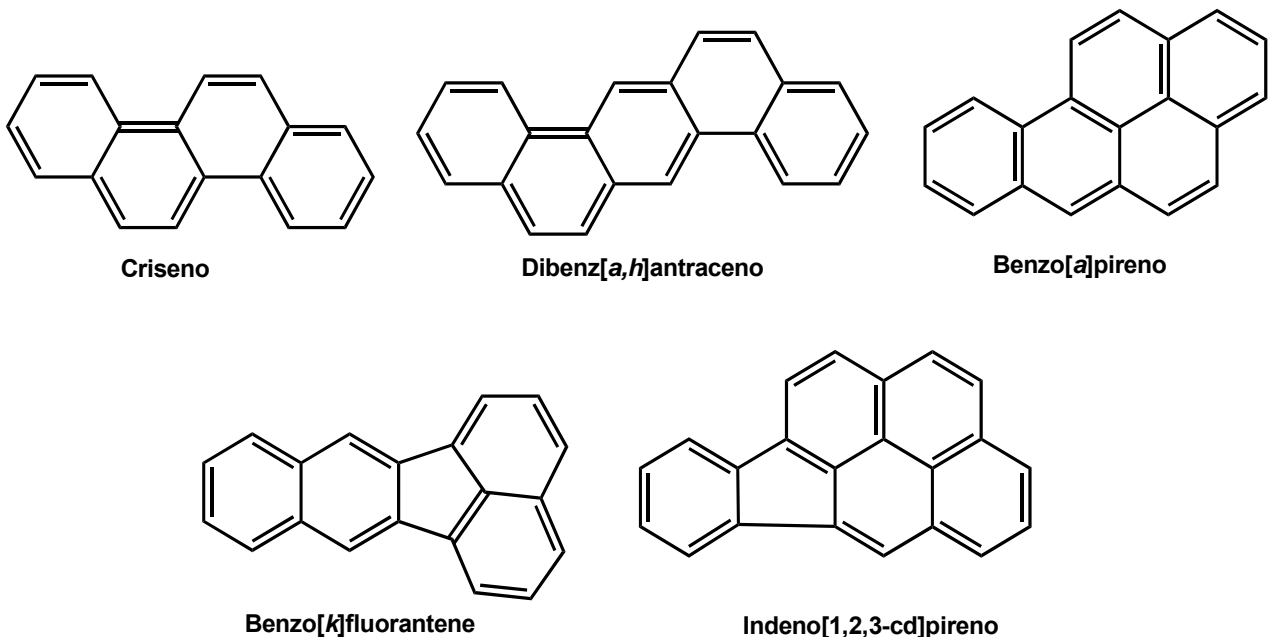
e operações de carga e descarga em alto mar.⁸³ É estimado que, aproximadamente, dois milhões de toneladas de óleo cru tenham sido espalhadas, nos oceanos desde 1965.⁸⁴

Os hidrocarbonetos poliaromáticos (HPAs) compõem em média 20% do óleo cru, sendo também originados da queima incompleta de combustíveis e, sob condições especiais, os HPAs podem ser industrializados.⁸⁵ Há mais de 100 diferentes tipos de HPAs que normalmente ocorrem em misturas complexas. São compostos persistentes no ambiente e biologicamente tóxicos, possuindo dois ou mais anéis aromáticos condensados com ou sem grupos alquila substituintes.⁸⁶ A agência norte americana de regulamentação ambiental (USEPA, *Environmental Protection Agency*) tem o registro de 17 HPAs como poluentes prioritários.⁸⁷ Isso porque: a) há mais informação técnica e estudos de caso desses, do que, do restante dos HPAs; b) são suspeitos de serem mais biologicamente agressivos do que os demais e exibem os efeitos danosos característicos do grupo dos HPAs; c) de todos os HPAs analisados, esses foram identificados como aqueles que apareceram em maior concentração em uma lista de prioridade nacional com os locais mais poluídos dos Estados Unidos.⁸⁸

Entre esse grupo de compostos, alguns têm reconhecidamente um potencial carcinogênico (e.g. criseno,^{89,90} dibenz[*a,h*]antraceno,⁹¹ indeno[*1,2,3-cd*]pireno,⁹² benzo[*k*]fluoranteno,⁹³ benzo[*a*]pireno,⁹⁴⁻⁹⁷ etc.). O transporte de HPAs no ambiente e, por conseguinte, o contato com os organismos, depende de propriedades como partição, solubilidade e volatilidade. Além de possuírem elevado *coeficiente de partição octanol-água* ($\log K_{ow} > 5$), possuem baixa pressão de vapor, sendo, portanto, rapidamente absorvidos por material orgânico particulado^{98,99} e por organismos vivos.^{13,100-103} Essa característica garante a esse

grupo de compostos ampla capacidade de deslocamento, podendo ser encontrado na atmosfera,¹⁰⁴ solo,¹⁰⁵ lagos,¹⁰⁶ oceano,^{107,108} rios,¹⁰⁹ lençóis freáticos¹¹⁰ e sedimentos.¹¹¹⁻¹¹³

Estudos envolvendo algas Chlorophyta e Phaeophyta, que compõe a base da cadeia trófica aquática, no Mar Báltico, costa oeste da Estônia e Golfo da Finlândia, mostraram importantes resultados na capacidade de bioacumulação (99% e 29%, respectivamente) e de biotransformação (4% e 49%, respectivamente) de HPAs. A alga verde *Selenastrum capricornutum* também se mostrou eficiente na degradação de HPAs, apesar da estreita dependência da fonte de luz, da dose de exposição de benzo[a]pireno e do nível de quinona, um dos seus principais metabólitos de biotransformação.¹¹⁴



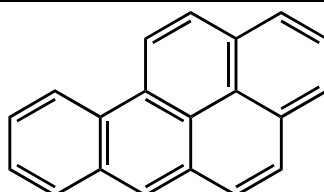
Estrutura de alguns HPAs com reconhecido poder carcinogênico.

1.3.2.1 Ação do benzo[a]pireno (BaP)

O benzo[a]pireno (BaP) é formado por 5 anéis benzênicos (Tab. 2)⁹⁷ e como a totalidade dos HPAs, está presente nos produtos de combustão incompleta

(origem pirogênica) ou presente nos derivados de produtos do petróleo (origem petrogênica).¹⁰²

Tabela 2 – Estrutura molecular, informações físico-químicas e propriedades espectrais do hidrocarboneto policíclico aromático benzo[a]pireno.⁸⁷



Nome IUPAC: Benzo[a]pireno

Nome Comum	Benzo[a]pireno
Família	HPA
CAS No.	50-32-8
Formula Molecular	C ₂₀ H ₁₂
Peso Molecular	252,31 g.mol ⁻¹
Densidade	1,35 g.mL ⁻¹
Pressão de Vapor	5,6 x 10 ⁻⁹ Torr a 25 °C
Log.K_{ow}	6,06
Solubilidade (H₂O)	5 µg.L ⁻¹
λ_{ex} e λ_{em}	290 e 430 nm

O BaP foi enquadrado pela USEPA como um poluente prioritário, alvo de preocupação mundial e reconhecido por sua propriedade carcinogênica.⁸⁷ No Brasil,¹¹⁵ alguns estudos mostram a presença desses compostos tanto de origem pirogênica como de origem petrogênica em áreas litorâneas densamente populosas como Salvador – BA,¹⁰² Niterói – RJ,¹¹⁶ Santos – SP¹¹⁷ e Rio Grande – RS.¹¹⁸

Apesar do seu potencial genotóxico, é uma molécula relativamente não tóxica, sendo, portanto um pré-carcinogênico, ou seja, é necessária uma metabolização (bioativação) para a produção de intermediários reativos com capacidade lesiva (Fig. 3). Ao entrar em contato com a célula (I), o BaP liga-se aos receptores para hidrocarbonetos aromáticos (AhR, *Aromatic hydrocarbons Receptors*) e, na presença de proteínas de estresse (HsP, *Heat shock Proteins*) específicas, formam um complexo (II).^{119,120} Muito embora esse mecanismo inicial de indução esteja bem documentado em mamíferos^{121,122} e peixes¹²³, pouco se sabe ainda se esse mesmo mecanismo de formação do complexo (*Xenobiótico + Receptor + HsP*) ocorre em algas.

Uma vez formado, esse complexo irá induzir a transcrição, no núcleo da célula, de um número de genes envolvidos no processo de bioativação de HPAs (III). Particularmente, os genes (*CYP1A1* em mamíferos,^{124,125} peixes¹²⁶ e moluscos¹²⁷) envolvidos na via de Biotransformação de Fase I, catalisado pelo sistema microssomal monooxigenásico (MMO, *Microsomal Monooxygenase*) citocromo P450 (CYP450) (*vide* Item 1.6.2.1). Igualmente, pouco se sabe também acerca das subfamílias de CYP450 responsáveis pela bioativação de HPAs em algas, ou mesmo, se a biotransformação de BaP está ao encargo de MMOs. Alguns autores defendem o metabolismo de HPAs em algas, através de diooxigenases, como ocorre em bactérias.¹²⁸

Considerando-se o mecanismo de bioativação de BaP através das reações catalisadas pela MMO associadas a uma citocromo P450 redutase NADPH-dependente (CPR), essas reações aconteceriam no retículo endoplasmático, pela oxidação de uma dupla ligação do anel aromático na posição 7 e 8 gerando um epóxido instável (BaP-7,8-epóxido) (IV).^{129,130}

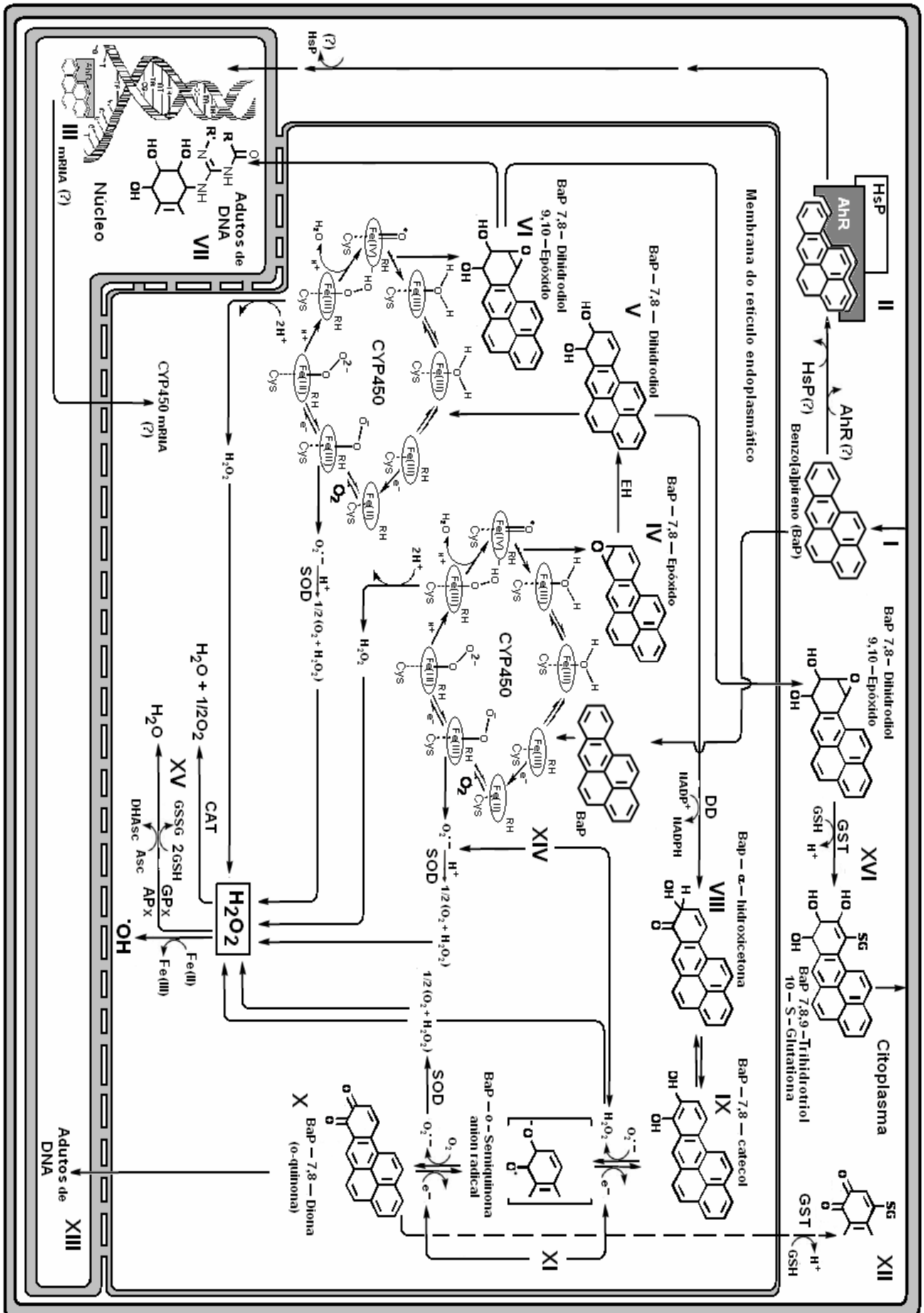
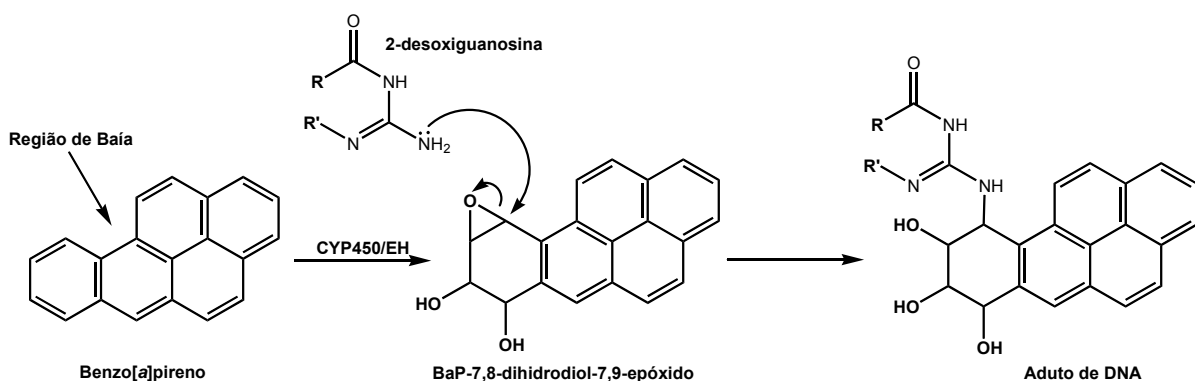
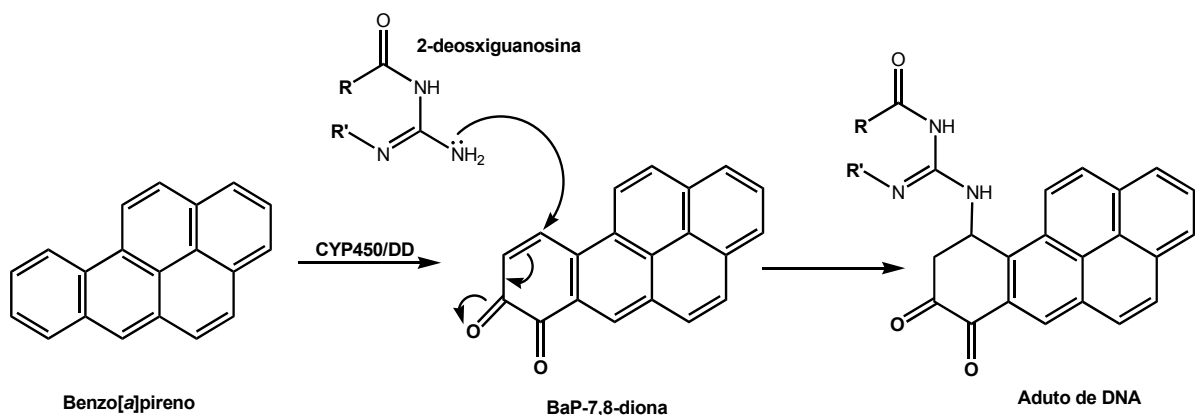


Figura 3 – Esquema geral dos mecanismos de indução de genes relacionados à biotransformação de Fase I na presença de BaP. Mecanismos de bioativação de BaP no retículo endoplasmático *via* CYP450/EH com produção de um metabólito reativo (BaP-7,8-dihidrodiol-9,10-epóxido) ou *via* DD através da produção de um intermediário (BaP-7,8-diona) ambos, potenciais agentes carcinogênicos. Correlações entre o metabolismo de ativação de BaP, a produção de EROs e a ação das defesas antioxidantes enzimáticas também são evidenciadas. Linhas tracejadas indicam *via* metabólica pouco provável. (?) Indica que os mecanismos de ativação e indução da expressão de genes relacionados aos sistemas de desintoxicação, em algas, ainda precisam de maiores esclarecimentos. Adaptado a partir dos trabalhos Xue, Okazaki, Shimada, Liao,¹³¹ Werck-Reichhart,¹³² e Hamdane.¹³³

Em seguida, este epóxido sofre hidrólise pela ação de uma epóxido hidrolase microsossomal (EH) formando um dihidrodiol (BaP-7,8-dihidrodiol) (V). Finalmente, uma segunda oxidação catalisada pela mesma MMO, na dupla adjacente ao dihidrodiol (posição 9 e 10), gera um epóxido (BaP-7,8-dihidrodiol-9,10-epóxido) adjacente à denominada *Região de Baía* (VI). Uma *Região de Baía* ocorre em HPAs devido ao posicionamento angular de um dos anéis da molécula.¹³⁴ A teoria, proposta por Jerina (1976),¹³⁵ prevê que a formação de epóxidos vicinais à *região de baía* de um HPA, gera compostos derivados com grande reatividade e potencialmente capazes de se ligarem a aminogrupos exocíclicos em bases desoxiguanosina e desoxiadenosina gerando adutos de DNA (VII).¹³⁶



Alternativamente ao mecanismo acima exposto, há ainda a bioativação do metabólito de BaP através da formação de *o*-quinonas pela ação de aldo-ceto redutases, especificamente, dihidrodiol desidrogenase (DD).⁸⁶ Sob condições fisiológicas, a DD compete com a MMO para oxidar dióis (e.g. BaP-7,8 dihidrodiol) (Fig. 3).¹³⁷ O mecanismo dessa reação NADP⁺-dependente, envolve a formação inicial de uma α -hidroxicetona (BaP-7,8-cetol), por ação de DD (VIII), que tautomeriza para formar uma hidroquinona (BaP-7,8-catecol) (IX). Em seguida, na presença de EROs (*vide* Item 1.6.1) a hidroquinona é convertida em uma *o*-quinona (BaP-7,8-diona) (X). Além disso, o par redox hidroquinona/quinona é totalmente reversível pela adição de dois elétrons (XI) o que possibilita uma série de reações potencialmente lesivas para a célula. Durante algum tempo, essa foi uma via considerada importante para desintoxicação, pois essas *o*-quinonas exibem uma forte reatividade (reação de adição tipo-Michael) com nucleófilos (e.g. glutatona e cisteína) formando compostos altamente solúveis, passíveis de serem excretados (XII).



No entanto, recentemente evidências têm revelado que a quinona do BaP teria ação muito mais deletéria, uma vez que também são substratos altamente suscetíveis em reações de formação de iminas com bases nitrogenadas, o que os torna potencialmente geradores de adutos de DNA (XIII).¹³⁸

Importantíssimo, no entanto, é o fato de que tanto o primeiro modelo de formação de epóxidos adjacentes à *região de baía* (BaP-7,8-dihidrodiol-7,9 epóxido), como a segunda proposta de formação de substratos reativos para reações de *adição tipo-Michael* (BaP-7,8-diona) há formação intensa de EROs (*vide* Item 1.6.1) (XIV).¹³⁹ Considerando a importância dessas espécies como agentes tóxicos, correlações entre as vias de ativação metabólica de BaP, a geração de EROs e a ativação do sistema antioxidante (XV) devem ser considerados. Além disso, vias alternativas de desintoxicação para BaP-7,8-dihidrodiol-7,9-epóxido e BaP-7,8-diona por condensação tióis celulares (*e.g.* glutationa) *via* glutationa s-transferase (biotransformação de fase II) (XVI), (*vide* Item 1.6.2.2) poderiam fragilizar ainda mais o sistema de defesa antioxidante em organismos expostos ao BaP, pelo consumo de GSH.

1.4 Toxicologia aquática e biomonitoramento

Os aumentos sucessivos no valor internacional do barril do petróleo (de US\$ 28 em 2003 para US\$ 130 em 2008) pressionam os países da OPEP e emergentes (*e.g.* América Latina e Ásia) a aumentarem sua produção, ultrapassando o teto de 85 milhões de barris por dia (07/2008).¹⁴⁰ Paralelamente, a demanda por alimento no planeta eleva a produção de praguicidas no mundo, estima-se que 85% da produção de defensivos agrícolas sintéticos são destinados ao setor agrário.¹⁴¹ Tais fatores aumentam a probabilidade do contato desses agentes com organismos aquáticos. Assertivas como estas, despertaram em muitos países, o aparecimento de programas de monitoramento e avaliação de impactos ambientais com o objetivo de identificar e minimizar riscos.^{142- 144}

No entanto, a atividade de monitoramento da poluição ambiental, (Fig. 4) enfrentou um processo de amadurecimento, mudança de foco e aprimoramentos. Quando avaliados diretamente no solo, as moléculas com alta persistência (baixa taxa de degradação) podem permanecer no ambiente sem sofrer qualquer alteração e apresentar baixa mobilidade (1).¹⁴⁵ Entretanto, essas moléculas podem estar adsorvidas nas partículas do solo e serem desorvidas a partir dessas mesmas partículas e sofrer lixiviação atingindo os lençóis subterrâneos ou, ainda, serem levadas para águas superficiais (2). Nos ambientes aquáticos, os poluentes podem sofrer adsorção ou desorção na interface água-sedimento (3) e, na água intersticial (4). Podem ser degradados por via química, fotoquímica ou biológica (5) e, finalmente, no epilímio entre a interface água-ar (6) volatilizarem.^{146,147} No ar, as moléculas na forma de gás ou de vapor, podem ser transportadas por muitos quilômetros, atingindo áreas muito distantes da região de origem.^{21,144,148}



Figura 4 – Ciclo biogeoquímico de poluentes e suas implicações no ambiente aquático.

Esses fatos somados podem explicar o alto grau de exposição de poluentes pela biota aquática, e respondem apropriadamente, por que a toxicidade de xenobióticos nos ecossistemas é, predominantemente, um problema dos biomas

aquáticos quando comparado com seu baixo dinamismo em ambientes terrícolas.^{149- 152}

Assim, nas fases iniciais dos programas de monitoramento de áreas costeiras, a maioria das atividades consistia, tão somente, nas avaliações de variáveis físico-químicas provendo informações valiosas do nível de contaminação, no entanto, sem qualquer relação com a biota.¹⁵³ Alguns países como a exemplo dos EUA, elaboraram importantes programas de prevenção contra impactos negativos nos ecossistemas (ERA, *Environmental Risk Assesment*)^{154- 156} com a utilização e desenvolvimento de ferramentas para predição dos efeitos tóxicos, com base apenas nas propriedades físicas e químicas do composto (e.g. QSARs, *Quantitative Structure Activity Relationships*).¹⁵⁷ Outras abordagens (e.g. QUICAR, *Qualitative Inter-Specific Chemical Activity Relationships*) constituíram inovações, tornando possível predizer os efeitos tóxicos em um determinado composto para uma espécie com base nos dados obtidos em espécies correlatas.¹⁵⁸

Como decorrência da evidente “miopia”, o foco da discussão sobre o impacto ambiental voltou-se para o biomonitoramento,^{159- 161} avaliando os efeitos de agentes xenobióticos nos organismos marinhos, em detrimento do monitoramento unicamente dos compostos químicos.⁸ Essa nova perspectiva deflagrou na América do Norte e em muitos países europeus, uma busca na aquisição de dados sobre a bioacumulação – acumulação de produtos químicos do meio circundante, no organismo, por meio das características físico-químicas do composto (e.g. lipofilicidade) e sobre a biomagnificação – aumento da concentração do agente xenobiótico ao longo da cadeia alimentar.¹⁶² Em programas de monitoramento ambiental de âmbito mundial como no *Mussel Watch*

Program,¹⁶³ moluscos bivalves (*e.g. Mytillus* sp.) foram eleitos como organismos sentinelas e usados em programas regionais em várias partes do mundo.^{164,165}

Assim, no decorrer do desenvolvimento da toxicologia aquática, o biomonitoramento tornou-se *via* principal no acesso e compreensão dos problemas de impacto ambiental.¹⁴⁴ Quando feito de forma regular, o uso sistemático de organismos vivos, garante avaliações representativas quanto à mudança do ambiente, da qualidade da água e da integridade da biota.¹⁶⁶⁻¹⁶⁹

1.5 Algas como bioindicadores

O uso de um indicador biológico ou bioindicador é fundamental para o êxito de programas de biomonitoramento. De maneira geral, um organismo *indica* que não pode sobreviver em um ambiente que não provê suas exigências físicas, químicas e nutricionais. Assim, qualquer membro da fauna de macroinvertebrados (*e.g.* moluscos,^{170,171} crustáceos,¹⁷² poliquetas,¹⁰¹ meiofauna,¹⁷³ *etc.*) ou vertebrados (*e.g.* peixes,^{174,175} aves,¹⁷⁶ e mamíferos¹⁷⁷⁻¹⁷⁹), bem como, bactérias¹⁸⁰ e protozoários¹⁸¹ ou integrantes da flora (*e.g.* algas¹⁸²⁻¹⁸⁹ e macrofitas^{27,190-192}) de um ecossistema aquático, são potenciais organismos bioindicadores da qualidade da água. A sensibilidade de um organismo a uma determinada substância tóxica é um assunto de extrema complexidade, que envolve uma série de fatores (*e.g.* característica química do composto xenobiótico, condições ambientais, metodologia de avaliação, organismo modelo, *etc.*).¹⁹³ Entretanto, particularmente os ensaios com fins de avaliação do potencial fitotóxico, têm colocado as algas, entre os organismos mais sensíveis do bioma aquático.¹⁹⁴⁻²⁰⁷

Assim, por causa de sua importância ecológica, uma vez que estão na base da cadeia trófica em ecossistemas aquáticos (*i.e.* da zona nerítica à zona litorânea),^{5,208} por sua substancial biomassa e relação superfície-volume, o que as torna organismos altamente expostos a poluentes,²⁰⁹ as algas têm sido importantes ferramentas no monitoramento de mudanças ambientais.²¹⁰ Normalmente referidas como *fígados verdes*²¹¹ dos oceanos, agem como importantes reservatórios de componentes químicos ambientais e exercem importância global na ciclagem de poluentes.^{5,183} Em especial, as interações entre micro e macro algas com metais-traço, com referências a bioacumulação,²¹² toxicidade^{213,214} e alterações morfológicas.²¹⁵⁻²¹⁷ Não menos importantes são os trabalhos envolvendo o uso de algas como indicadores de contaminação aquática por praguicidas (inseticidas e herbicidas),^{40,,,218-220} policíclicos aromáticos,^{28,,,221} e bifenilas policloradas.^{32,,,222} Nesse sentido, a diatomácea *Minutocellus polymorphus* tem se mostrado uma espécie bastante sensível a uma série de contaminantes e por esse motivo é utilizada como um dos organismos teste em estudos de toxicidade.²²³

Muito se considera o biomonitoramento pelo simples fato da presença ou ausência de um bioindicador (*e.g.* fitoplâncton) poder dar fortes indícios acerca da qualidade da água (*e.g.* *Melosira islandica*, *Cyclotella ocellata* – atestam água em condição de uso e *Microcystis aeruginosa*, *Anabaena flos-aquae* – indicam água impactada).²²⁴ No entanto, o conceito de bioindicador deve ser expandido para muito além da simples constatação ou falta do organismo no ambiente, pois, determinados integrantes da biota aquática podem sofrer algumas adaptações fisiológicas e bioquímicas e sobreviver no ecossistema impactado, tornando-se, *via* preferencial de biomagnificação de poluentes na cadeia trófica.

1.6 Biomarcadores de poluição aquática

É bastante claro e preocupante que impactos ambientais acarretem mudanças ao nível ecológico com uma amplitude de ação do litoral às zonas pelágicas.^{5,6} No entanto, tais mudanças são geralmente de complexa avaliação, apresentando altos incrementos de subjetividade, não sendo usadas na prevenção de futuras agressões.^{144,153} No afã por indicações que advirtam antecipadamente sobre os efeitos dos poluentes nos organismos sentinelas, busca-se, ao nível celular, marcadores importantes que sinalizem respostas a essas agressões.²²⁵ Assim, o termo biomarcador, tem sido usado para o conjunto de mudanças fisiológicas, bioquímicas e histológicas que apontam níveis de exposição e/ou efeitos que um bioindicador sofre quando na presença de agentes tóxicos.²²⁶

1.6.1 Espécies reativas de oxigênio

Nas células vegetais o O₂ participa em mais de 200 reações diferentes.²²⁷ Esse amplo espectro de ação abrange desde mecanismos bioquímicos envolvidos na respiração, o que consome aproximadamente 95% do O₂ para cobrir as necessidades energéticas da célula, passando por processos de desintoxicação *via* monooxigenases CYP450 e insaturações, em cadeias de ácidos graxos, por dessaturases que consomem, em situações normais, frações de O₂ intracelular.²²⁸

Em seu estado fundamental, o O₂ molecular é triplete (³Σ_g⁻), ou seja, em seu nível eletrônico ocupado de maior energia constituído por orbitais π*2p, encontram-se dois elétrons desemparelhados, um em cada orbital, com *spin* paralelos, conferindo à molécula um caráter birradicalar (Fig. 5).^{229,230}

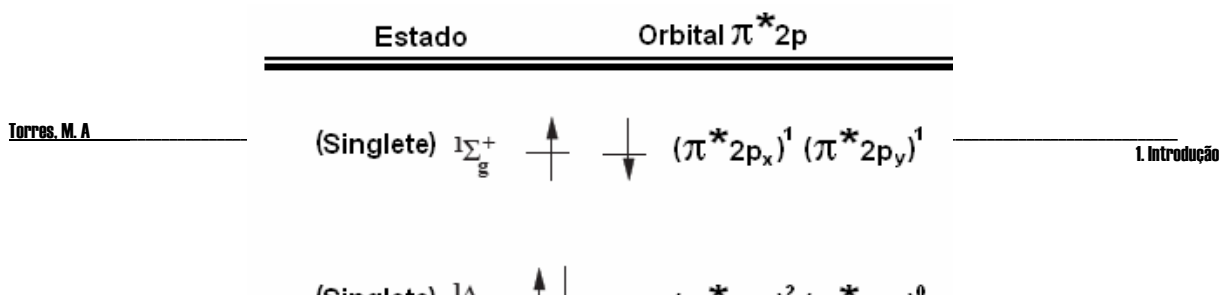


Figura 5 – Distribuição eletrônica nos orbitais moleculares π^*2p do oxigênio no estado excitado singlete ($^1\Sigma_g^+$ e $^1\Delta_g$) e no estado fundamental triplete ($^3\Sigma_g^-$). Adaptado a partir do trabalho de Martinez.²³¹

No entanto, as moléculas orgânicas no seu estado fundamental são singlete, ou seja, possuem um par de elétrons emparelhados, no mesmo orbital, com *spin* antiparalelos em seu nível eletrônico ocupado de maior energia.

Não é possível para uma molécula orgânica no seu estado fundamental singlete, no qual os elétrons, nos orbitais de maior energia possuem *spin* antiparalelos, reagir com oxigênio fundamental triplete, cujos orbitais de maior energia possuem um elétron com *spin* paralelo cada. Assim, essa característica imposta por essa *restrição de spin*, confere ao oxigênio molecular, no estado fundamental triplete, pouca reatividade frente às reações polares com moléculas orgânicas.^{230,232,233}

Uma outra consequência da restrição de *spin* é que o O₂ pode realizar reduções monoeletrônicas e, como decorrência, durante a atividade metabólica normal²³⁴ ou por ação de várias perturbações ambientais (e.g. temperatura extrema, radiação, restrição alimentar, xenobióticos, etc.) os organismos podem, a partir de O₂, gerar EROs.^{230,235}

As EROs (Fig. 6) de importância biológica são: ânion radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxila ($\bullet OH$).^{230,236}

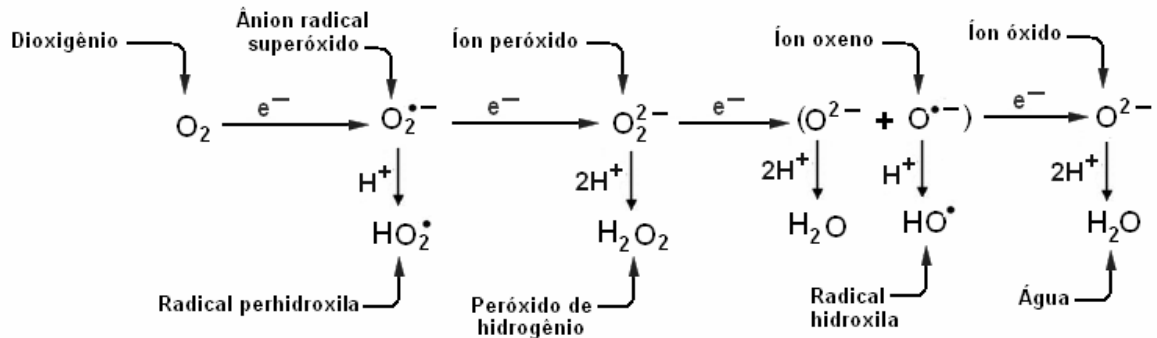
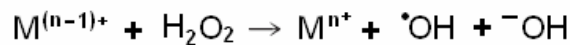
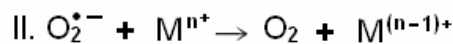


Figura 6 – Esquema das reações de redução monoelétrica do O_2 e a formação de intermediários reativos. Adaptado a partir do trabalho de Apel.

Esse último, altamente reativo e com alto potencial deletério, pode ser gerado quando metais de transição [e.g. Fe(II), Cu(I), Mn(II) etc.] catalisam a decomposição de H_2O_2 (I, reação *de Fenton*) ou quando o $O_2^{\bullet-}$, catalisado por metais, provê elétrons para a redução peroxídica (II, reação *de Haber-Weiss*).^{230,237}



Uma outra ERO (Fig. 7) de importância biológica é o oxigênio singlete ($^1\Delta_g O_2$), a forma eletronicamente excitada do O_2 molecular.^{229,232} Pode ser gerada *via* mecanismos fotoquímicos onde um sensibilizador (Sens) (e.g. clorofila, grupo Heme, flavinas, etc.) no estado singlete (S_1) ao passar para o estado triplete (T_1) gera, em contato com O_2 molecular fundamental triplete, $^1\Delta_g O_2$ por transferência de energia, ou ainda, $O_2^{\bullet-}$ por transferência de elétrons.²²⁹

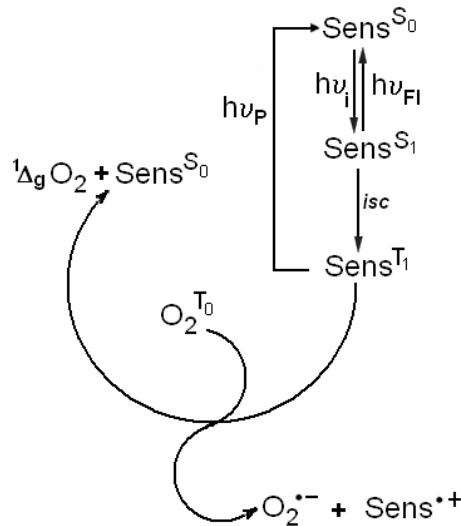


Figura 7 – Reações fotoquímicas e a formação de oxigênio singlete (${}^1\Delta_g O_2$) e ânion radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$). $h\nu_i$ = radiação incidente; $h\nu_{F1}$ = emissão de fluorescência; $h\nu_P$ = emissão de fosforescência; $Sens^{S_0}$ = sensibilizador no estado fundamental; $Sens^{S_1}$ = sensibilizador no estado singleto excitado; $O_2^{T_0}$ = O_2 no estado tripleto fundamental, $Sens^{T_1}$ = sensibilizador no estado tripleto excitado; $Sens^{\bullet+}$ = sensibilizador cátion radical e *isc*= *Intersystem crossing*. Adaptado a partir do trabalho de Ryter.

Microorganismos, animais e células fotossintetizantes, geram como subproduto do metabolismo aeróbico EROs, que podem levar um organismo a quadros críticos de estresse oxidativo.^{238,239-240} No entanto, sob condições normais, os organismos possuem um sistema de defesa contra EROs bastante desenvolvido, envolvendo mecanismos que limitam a formação destas espécies, bem como, mecanismos que promovem sua remoção.^{232,233,237,241} Sob condições de normalidade, a formação e a remoção de EROs estão em equilíbrio.^{230,237,238,242} Entretanto, quando sob uma condição onde há um aumento de EROs e concomitante impossibilidade de remoção, o sistema de defesa amplia seu arsenal enzimático^{232,238,243,244} e não-enzimático,²⁴⁵⁻²⁴⁷ para controlar os níveis intracelulares dessas moléculas.²³⁰

Embora as causas sejam as mais diversas, sob a luz da toxicologia, atribuem-se ao estresse oxidativo, os efeitos de agentes químicos

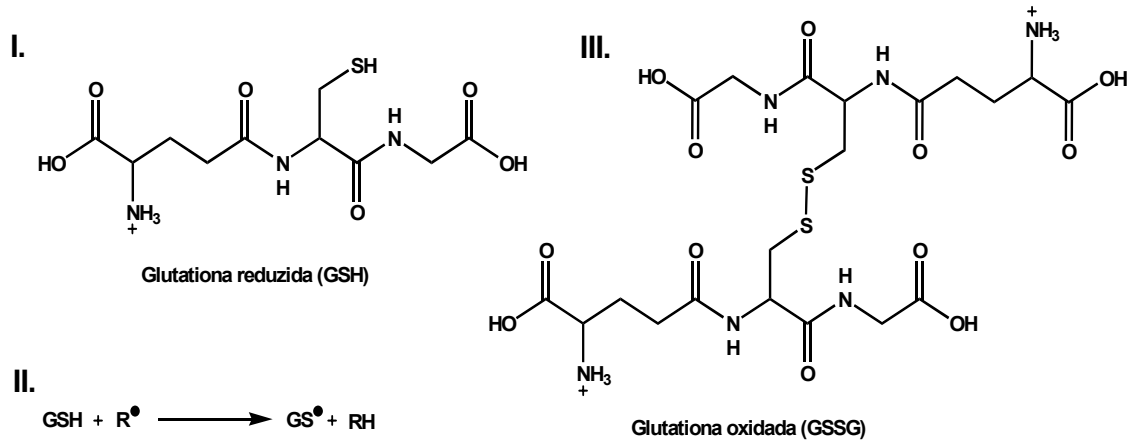
xenobiontes.^{242,248- 252} Alguns exemplos disso são os trabalhos envolvendo mutantes de *Chlamydomonas reinhardtii* cujos reflexos pleitrópicos, garantiram uma maior sensibilidade a metais e susceptibilidade ao estresse oxidativo. A exposição crônica e, particularmente, a aguda de *Gonyaulax polyedra* (sinonímia de *Lingulodinium. polyedrum*) a metais pesados, também induziu ao estresse oxidativo com aumento de lipoperoxidação.²⁵³ Somando-se a isso, ensaios com *L. polyedrum* na presença de Arochlor 1254, provocaram elevados danos oxidativos em proteínas.

1.6.1.1 Defesas antioxidantes não enzimáticas

a) Glutaciona:

Pertencente ao primeiro grupo de antioxidantes, o tripeptídeo γ -glutamilcistenil-glicina ou glutaciona (I, GSH) (Fig. 8), é fundamental como defesa e proteção celular.^{245,246} Normalmente age como um seqüestrador (*scavenger*) de EROs em sítios hidrofílicos.^{233,254} A propriedade antioxidante é devido ao grupo tiol que, em pH fisiológico, praticamente está todo protonado ($pK_a = 9,2$). Assim, sua ação seqüestradora é conferida pela transferência de um átomo de hidrogênio (II).²³⁵ A GSH tem participação ativa em reações enzimáticas envolvidas na desintoxicação de H_2O_2 (*e.g. ciclo ascorbato-glutaciona*) em conjunto com ascorbato peroxidase²⁴³ (APx) e na eliminação de peróxidos em reações catalisadas por glutaciona peroxidase (GPx).^{254,255} Além disso, a GSH impede a desnaturação de macromoléculas, protegendo grupos tíois protéicos de processos oxidativos.²⁵⁶ Todas essas funções envolvem a oxidação do grupo tiol, levando a formação do persulfeto (III, GSSG). Assim, o par redox GSH/GSSG é considerado

importante para a manutenção celular e é mantido na célula na proporção 10:1 pela ação da glutathiona redutase (GR).^{241,257}



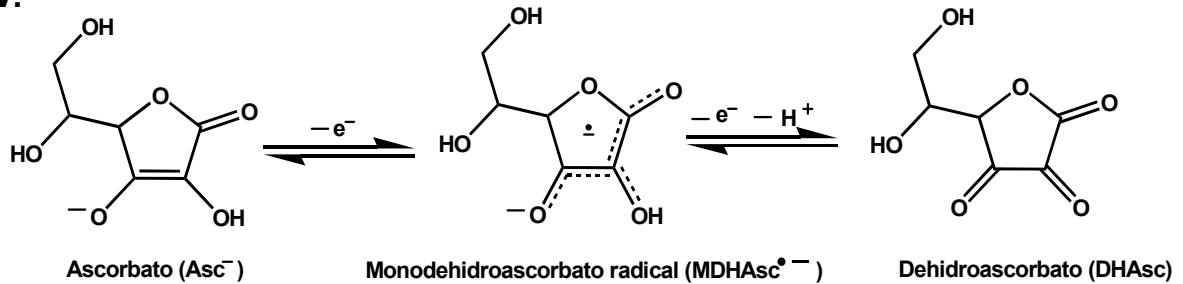
Importantíssimo também é o papel de GSH como precursor de fitoquelatinas em organismos fotossintetizantes, um polímero de glutathiona (γ -Glu-Cys)_n-Gly (n= 21) com massa molecular de 2 a 10 kDa, produzido em resposta a contaminação com metais.^{5,258} A GSH também é imprescindível em processos de desintoxicação de poluentes, sendo transferida a uma variedade de xenobióticos eletrofílicos, catalisada pela glutathiona s-transferase (GST),²⁵⁹ tornando os adutos mais aquo-solúveis, passíveis de serem excretados^{258,260} (biotransformação de fase II) (*vide* Item 1.6.2.2).

b) Ascorbato:

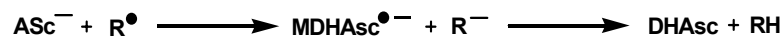
Um segundo participante na linha de defesa por seqüestro contra a produção excessiva de EROs é o ácido ascórbico (Fig.08).²³² O mais abundante e solúvel antioxidante em cloroplastos, o que sugere que essa molécula tenha participação importante em sítios celulares responsáveis pela fotossíntese.^{237,241} Em pH fisiológico, a forma ene-diol do ácido ascórbico (pK_a= 4,1) está inteiramente na forma da sua base conjugada (IV, Asc⁻), fazendo com que, preferencialmente,

participe como seqüestrador em reações de transferência eletrônica (V).²³⁵ O radical monodehidro ascorbato (MDHAsc^{•-}), formado após reação com EROs, possui uma maior estabilidade do que dehidroascorbato (DHAsc) devido ao elétron deslocalizado, sendo essa característica importante para a potencial ação seqüestradora de Asc⁻.^{235,237}

IV.



V.



À luz de novos entendimentos acerca do papel do Asc⁻ em organismos fotossintetizantes, podemos enumerar funções importantes como a ação seqüestrante direta sobre O₂^{•-}, ¹Δ_gO₂ e [•]OH,²³³ e sobre o radical sulfidríla GS[•],²⁴⁵ regeneração do radical α-tocoferoxila (α-Toc[•]) em reações envolvendo peroxidação lipídica,²⁶¹ doação de elétrons (e⁻) para o fotossistema II por Asc⁻ localizados no lúmem,²⁶² cofator nas reações envolvendo violaxantina na dissipação de energia durante a fotooxidação,²⁶³ tem participação em reações enzimáticas de eliminação de H₂O₂ (e.g. ciclo água-água e ciclo ascorbato-glutationa) em conjunto com ascorbato peroxidase e monodehidroascorbato redutase NADPH-dependente.^{232, 233,237,263,264}

Ao lado de GSH e Asc⁻, figurando como coadjuvantes, os carotenóides, agem protegendo pigmentos do complexo de antena contra espécies tripletes excitadas, ¹Δ_gO₂ e outras EROs.²⁶⁵⁻²⁶⁷

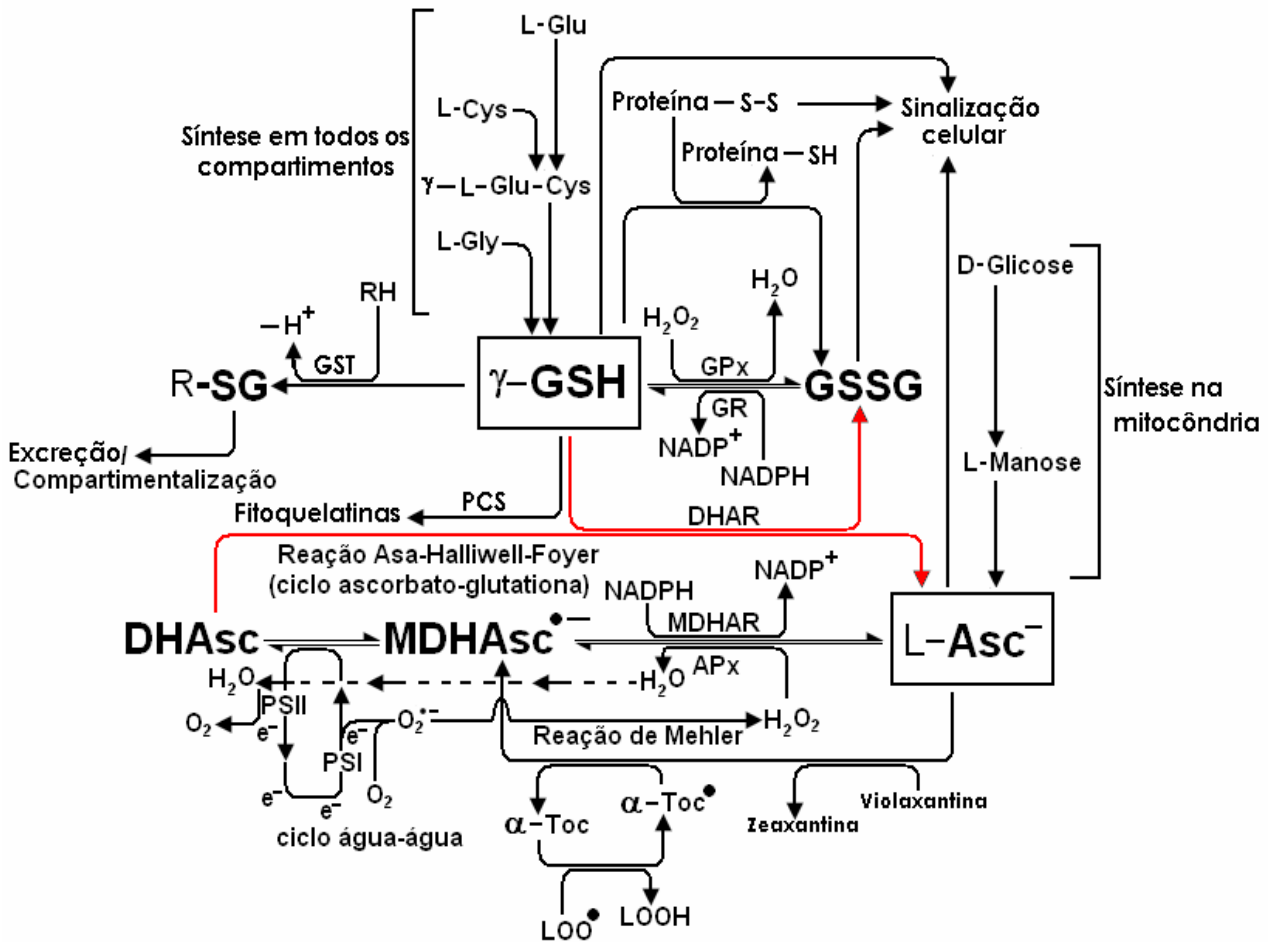


Figura 8 – Esquema geral de integração entre GSH e Asc⁻. Em vermelho o *ciclo ascorbato-glutationa*, envolvendo diretamente as duas moléculas. X, co-substrato para transferência de GSH. Adaptado a partir dos trabalhos de Apel, Edreva, Chaudière, Asada, Noctor, Cnubben, Tausz, Smirnoff, e Ishikawa.

1.6.1.2 Defesas antioxidantes enzimáticas

a) Superóxido dismutase:

Com relação ao arsenal enzimático (Fig. 9), a enzima superóxido dismutase (SOD), apresenta-se na forma de um dímero ou tetrâmero, dependendo do grupo prostético envolvido, com até 100kDa.²³⁰ É considerada a primeira frente de defesa no sistema de anulação de radicais livres, dismutando O₂^{•-} a H₂O₂ e O₂. A SOD tem sua atividade tipicamente registrada no estroma de cloroplastos²⁶⁸ (Ia, Fe-SOD), junto às membranas tilacoidais (Ib, CuZn-SOD), no citosol (Ic, CuZn-SOD), na mitocôndria (Id, Mn-SOD), nos peroxissomos (Ie, Mn-SOD e CuZn-SOD) e

região do apoplasto (If, CuZn-SOD).²⁴⁴ Agem sobre $O_2^{\bullet-}$ provenientes de fontes como: fotorredução de O_2 durante estresse fotooxidativo (IIa), durante a respiração celular (IIb), devido à ação de enzimas desintoxicantes (IIc) e durante processos de infestação por fitopatógenos (IId).²³⁸ Por sua importância, a atividade da SOD em fitoplâncton, pode sofrer variações circadianas (e.g. *Lingulodinium polyedrum*),²⁶⁹ ontogenética (e.g. *L. polyedrum*, *Tetraselmis gracillis*, *M. polymorphus*)²⁷⁰ ou responder à presença de metais pesados (e.g. *L. polyedrum*).²⁷¹ Experimentos com a alga vermelha *Kappaphycus alvarezii* na presença de clofibrato (estimulador de β -oxidação em peroxissomos com elevada produção de H_2O_2), mostraram imediata resposta da SOD frente à catalase (CAT) ou APx.²⁷²

b) Catalase:

Mecanismos enzimáticos encarregados da desintoxicação de H_2O_2 gerando H_2O e O_2 , utilizam a CAT, uma proteína tetramérica com quatro grupos heme apresentando um K_m amplo para H_2O_2 (10 a 140 mM) dependendo das isoformas.^{230,235} Estão presentes principalmente nos peroxissomos (IIIa) e, excepcionalmente em mitocôndrias (IIIb), citosol (IIIc) e apoplastos (IIId).^{237,238}

c) Ascorbato peroxidase:

Com características próprias, porém agindo também sobre H_2O_2 , os organismos fotosintetizantes utilizam, em grande medida, a APx,²³⁸ uma série de isoenzimas heme proteínas com alta afinidade para o Asc⁻ como doador de e^- .^{230,237,243} São amplamente representadas no citosol (IVa, APx_{cit}),^{243,273} no cloroplasto, especificamente no estroma (IVb, APx_{est})²⁷⁴ e membrana tilacoidal (IVc, APx_{til}),²⁷⁵ na membrana de microcorpos (peroxissomos e glioxissomos) (IVd, APx_{mic})²⁷⁶ e finalmente na membrana de mitocôndrias (IVe, APx_{mit})²⁷⁷. Além disso, há ainda um arsenal de peroxidases não específicas (Px_{n.e.})

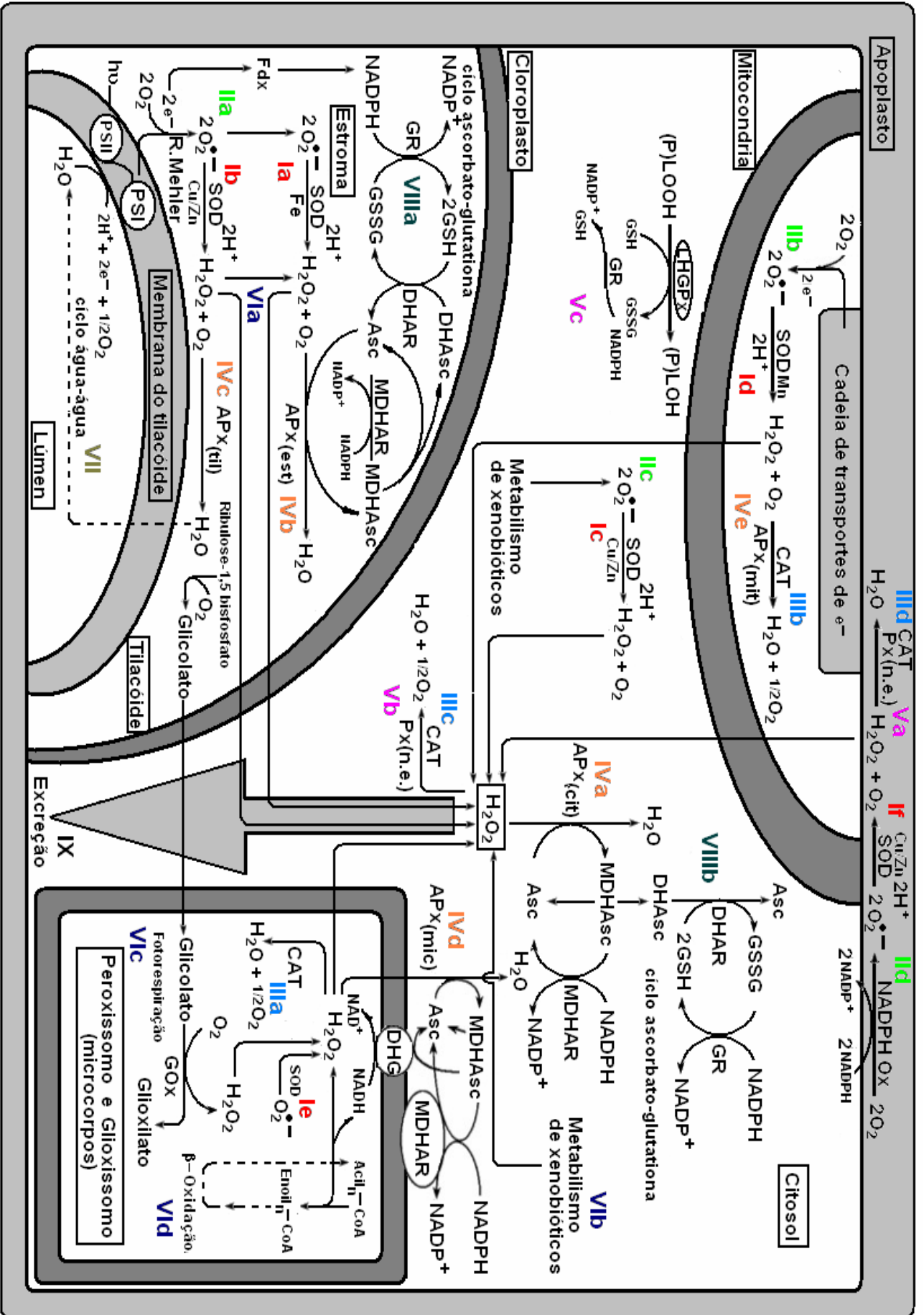


Figura 9– Esquema geral da integração das defesas antioxidantes enzimáticas e não-enzimáticas em algas, frente ao metabolismo normal de produção de EROs ou em decorrência a exposição de poluentes. PSI e II= fotossistemas, Fdx= ferredoxina, GOX Glicolato oxidase. DHG= Desidrogenases. Obs.: As reações acima esboçadas não são necessariamente simultâneas e a formação de O_2^{S1} por radiação luminosa, nos cloroplastos, também deve ser considerada. Adaptado a partir dos trabalhos de Apel, Asada Scandalios, e Shigeoka.

espalhadas no apoplastos (Va) e citosol (Vb),²⁴³ e um grupo específico de glutathione peroxidase, que age sobre hidroperóxidos lipídicos (LHGPx) (Vc).²⁵⁵ Apesar de sua ação sinalizadora,²³⁰ elevadas concentrações de H_2O_2 decorrentes do metabolismo celular como: as típicas reações de *Mehler*²³² (VIa), Mecanismos de desintoxicação celular^{5,139} (VIb), fotorrespiração devido à atividade oxigenásica da Rubisco²³⁷ (VIc), β -oxidação peroxisomal²⁴³ (VIId) e ação da SOD²⁴⁴ podem, invariavelmente, limitar o crescimento e a atividade metabólica (e.g. *Scenedesmus obliquus*),²⁷⁸ inibir a atividade de SOD²⁴⁴ e disparar eventos envolvendo morte celular (apoptose) (e.g. *Peridinium gatunense*).²⁷⁹ Além de, na presença de metais $[M^{(n-1)+}]$ promover a geração de $\bullet OH$.²³⁰

d) Redutases:

Concomitantemente, um grupo de enzimas auxiliares, na sua grande maioria redutases NADPH dependentes (e.g. MDHAR e GR) e GSH dependentes (e.g. DHAR), colaboram em reações importantes como *ciclo água-água*²³² (VII) e reação do tipo *Asada-Halliwell-Foyer*²⁸⁰ (*ciclo ascorbato-glutationa*)^{245,257} (VIIIa e b).

e) Mecanismos alternativos:

Devido à baixa susceptibilidade na resposta de CAT ou APx para a desintoxicação de H_2O_2 à presença de certos xenobióticos, algumas algas utilizam-se da excreção de H_2O_2 diretamente no meio circundante (IX). Além disso, uma outra alternativa à diminuição na produção de H_2O_2 é observada em comunidades

fitoplanctônicas com elevada densidade celular, decorrente de processo de eutrofização em estágios avançados. Sob essas condições, há uma diminuição à exposição a raios UV (*self-shading*), o que minimiza em grande parte a geração de EROs, sobre tudo H₂O₂ com diminuição de danos celulares.²⁸¹

1.6.1.3 Lipoperoxidação

Ácidos graxos poliinsaturados são particularmente susceptíveis aos ataques de EROs,^{80,230} que acabam funcionando como iniciadores do processo de lipoperoxidação (LPO).^{234,239,282} (Fig. 10) Os produtos dessas reações são normalmente radicais (e.g. alila (L[•]); peroxila (LOO[•]), etc.), que terão profunda influência na sobrevivência da célula,¹⁴ provocando sérios danos na membrana²⁶¹ e comprometendo a homeostase do organismo.^{228,,283} Resumidamente, a LPO consiste na incorporação de oxigênio molecular ao ácido graxo insaturado para produzir um hidroperóxido lipídico (LOOH). Esse conjunto de reações pode ser dividido em três etapas: I) Iniciação: A partir de EROs com reatividade suficiente a ponto de abstrair um hidrogênio de um grupo metilênico (-CH₂); II) Propagação: O radical alila gerado se combina com o O₂, formando o radical peroxila, promovendo uma reação em cadeia e III) Terminação: Compreendida como uma aniquilação dos radicais formados originando produtos não-radicalares.²⁸⁴ A decomposição do radical peroxila pode ocorrer devido à reação deste com uma dupla ligação dentro da própria molécula de ácido graxo, formando dioxetanos, peróxidos cíclicos.²³⁰ O malondialdeído (MDA) é um dialdeído decorrente da degradação de endoperóxidos cíclicos, possui baixo peso molecular (72,07 mol.L⁻¹), uma cadeia carbônica curta (1,3 - dicarbonílica) e é um ácido moderadamente fraco (pK_a= 4,5).

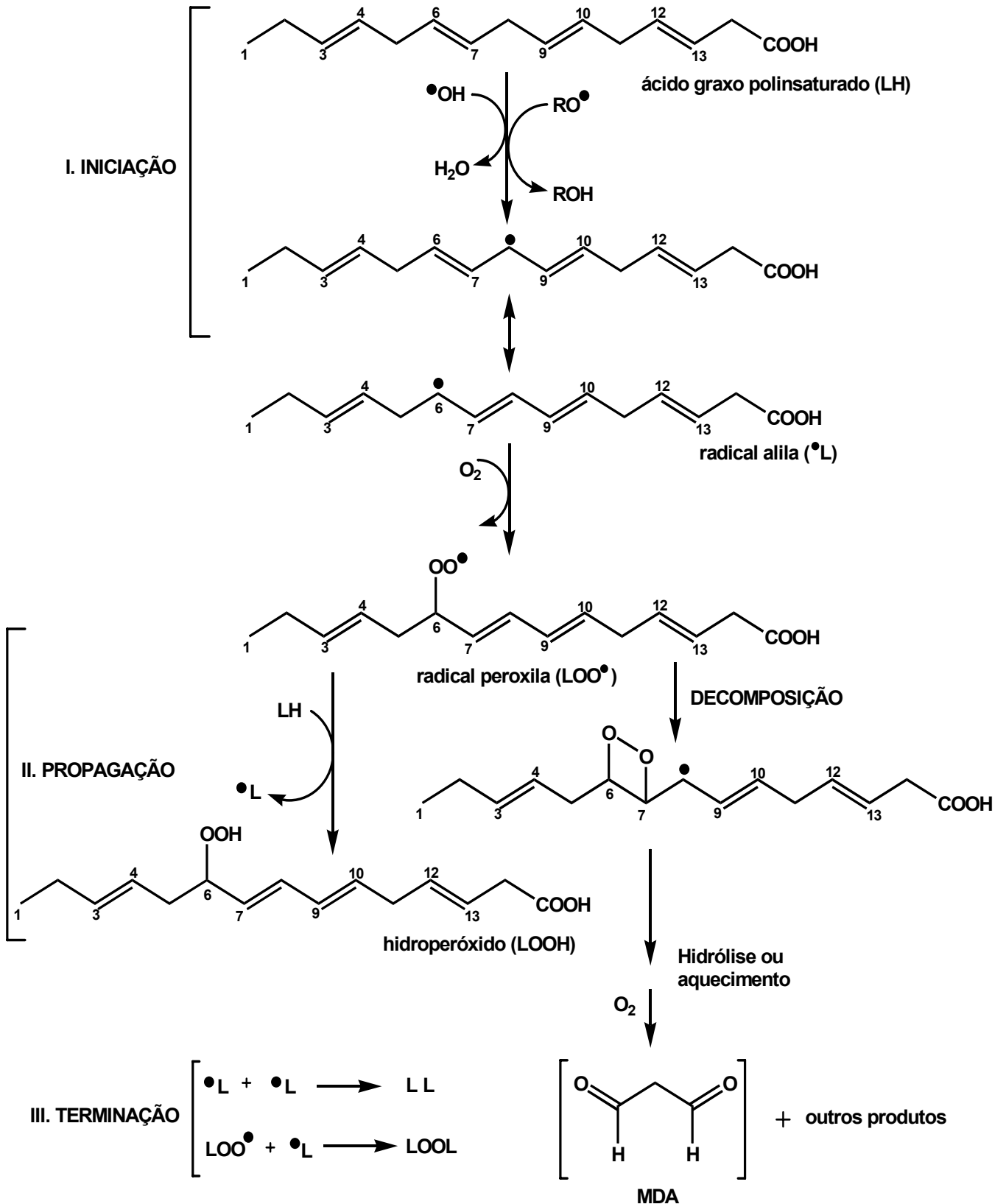


Figura 10 – Esquema geral dos três estágios das reações envolvidas em processo de peroxidação de lipídeos em membrana celular. O produto final MDA pode funcionar como marcador importante da ação de EROs em organismos expostos a poluentes. Adaptado a partir dos trabalhos de Lima e Almeida.

Assim, em condições apropriadas podem reagir com nucleófilos produzindo cromóforos com elevada absorvidade molar.²⁸⁴ Por revelarem, em certa medida, um grau de exposição da célula às EROs, são importantes indicadores de lipoperoxidação.²⁸⁵ Como conseqüência, por seu significado, a avaliação do dano na membrana lipídica através do MDA, causados por EROs tem recebido muita atenção. Muito embora, sejam decorrentes do próprio metabolismo da célula, níveis elevados de MDA, podem ser associados a um quadro de estresse oxidativo,²⁸⁶ muitas vezes decorrentes de exposição a poluentes.

1.6.2 Sistemas de biotransformação de xenobióticos

Talvez o sistema bioquímico (Fig.11) mais extensivamente estudado em organismos aquáticos relacionados com a exposição a compostos tóxicos, sejam as enzimas envolvidas no metabolismo de substâncias químicas com potencial ação tóxica.²⁸⁷ Entretanto, esse sistema de biotransformação de xenobióticos, até muito recentemente, era vinculado a uma função tipicamente animal²⁸⁸ (e.g. crustáceos e poliquetas,²⁸⁹ moluscos^{171, 290} e peixes,²⁹¹ etc.).

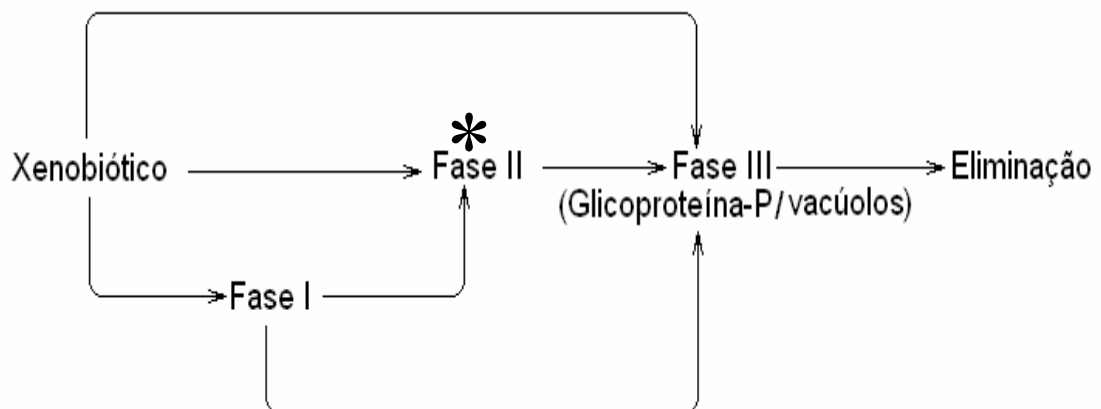


Figura 11 – Integração das fases que compõe o sistema de desintoxicação de xenobióticos e que figuram como importantes biomarcadores em ecotoxicologia.(*). Apenas a fase II constitui objeto de estudo nesse trabalho.

Apesar disso, a identificação de tais sistemas biomarcadores de desintoxicação em organismos fotossintetizantes, tem aumentado rapidamente nos últimos anos, caracterizando algas e macrófitas como organismos altamente susceptíveis e acumuladores de poluentes ambientais.²¹¹ Competindo em nível de importância com os sedimentos.²⁹²

1.6.2.1 Citocromo P450 (Transformação – Fase I)

Tecnicamente conhecido como sistema microsomal monooxigenásico mediado por citocromo P450 (MMO, *Microsomal Monooxygenase*),²⁹⁴ tem a principal função de monooxigenar não só moléculas endógenas como também compostos xenobióticos com concomitante produção de água.²⁹⁵ Tal reação exige reduções monoeletrônicas do O₂ em dois passos, transferindo elétrons a partir do NADPH *via* uma flavoproteína NADPH-P450 redutase (CPR, *Cytochrome P450 Reductase*) resultando na ativação prévia e necessária do oxigênio.^{139,,296}

O esquema do ciclo catalítico do CYP450 (Fig.12) representa uma situação durante um processo de biotransformação com liberação de uma significativa porção de EROs juntamente ou, em descompasso com processos de monooxigenação do substrato (setas vermelhas).¹³⁹ A primeira via responsável pela produção de EROs é resultante da autoxidação do *complexo CYP450 oxiferoso* com posterior liberação de O₂^{•-}. A segunda via geradora de EROs é resultante de um desacoplamento, caracterizada pela protonação do *complexo CYP450 hidropoxi* com formação de H₂O₂.²⁹⁷

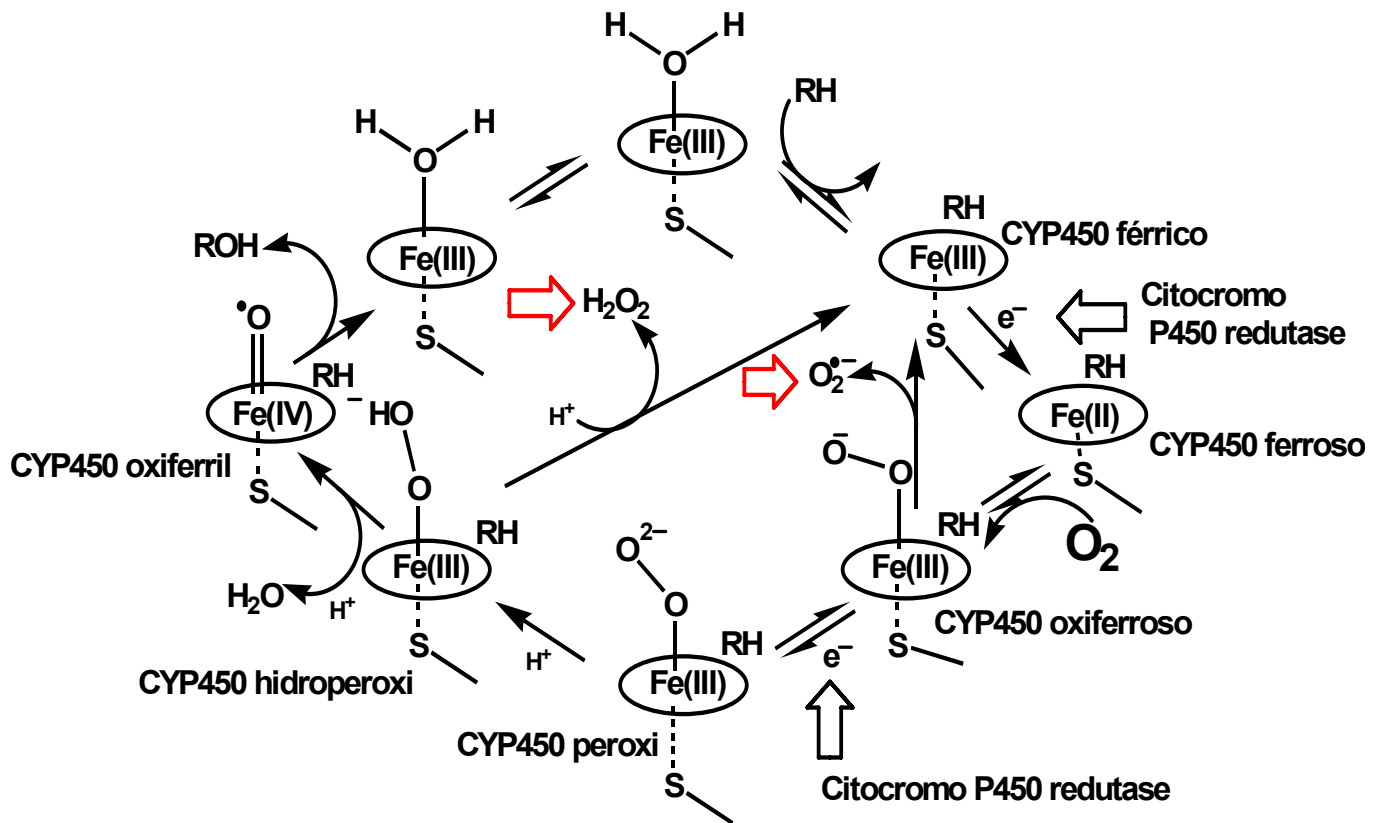


Figura 12 – Esquema simplificado da atividade monooxigenásica catalisada pelo sistema microsomal citocromo P450 (MMO). Aporte de elétrons *via* redutases (setas brancas). Eventuais desacoplamentos, entre a produção de substratos monooxigenados e EROs também são mostrados (setas vermelhas). Adaptado a partir dos trabalhos de Zangar, Halliwell, Hodgson, Coon, e Halkier.

As isoformas do sistema CYP450 possuem características favoráveis e importantes como biomarcadores bioquímicos de poluição, uma vez que são altamente induzidas em vertebrados, através de uma família de genes (*e.g.* *CYP1A1*, *CYP1A2* e *CYP1B1*) quando expostos a xenobióticos.²⁹⁸ Nos vegetais, no entanto, a função catalítica das isoformas de CYP450 é mais bem documentada e relacionada à biossíntese de flavonóides, hormônios, lipídios e metabólitos secundários.²⁹⁹ Apesar disso, a atividade enzimática de CYP450 após o tratamento com metais pesados e moléculas orgânicas (*e.g.* herbicidas, HPAs, solventes e resíduos industriais) tem sido descrita em plantas.³⁰⁰⁻³⁰³ Com relação às algas, alguns trabalhos importantes desenvolvidos com macroalgas envolvendo

o gênero *Laminaria*, e as espécies *Fucus vesiculosus* e *Ulva lactuca* expostas a PCBs e herbicidas, registram elevada atividade hidroxilásica.³⁰⁴ Outros trabalhos utilizando algas verdes unicelulares *Chlorella sorokiniana* e *Chlorella fusca* na presença de metflurazon, comprovaram atividade de desmetilação.³⁰⁵ Assim, a indução dos genes de algumas famílias de CYP450, quando na presença de xenobióticos, tem sido objeto recente de pesquisa, sobretudo *CYP76B1*³⁰⁶ e *CYP71A10*.³⁰⁷ Além disso, a atividade enzimática dessas isoformas pode ser avaliada, em frações microsomais, utilizando não só 7-etoxiresorufina (*i.e.* atividade etoxiresorufina-o-desetilase - EROD) como também 7-etoxicumarina (*i.e.* atividade ecotoxicumarina-o-desetilase - ECOD) como substrato.^{191,,308}

1.6.2.2 Glutathione s-transferase (Conjugação – Fase II)

Glutathione s-transferase (GST) são dímeros protéicos com massa molecular típica de 50 kDa.^{309,310} De forma geral, GSTs catalisam a transferência de GSH para um co-substrato (R-X) com um centro eletrofílico reativo, capaz de formar um produto polar s-glutatiolado (R-SG) (Fig. 13).³¹¹ O resultado normalmente é um produto com elevada solubilidade, em geral com toxicidade reduzida e passível de ser excretado. Ensaio bioquímico e imunológico, em organismos fotossintetizantes, apontam evidências abundantes para a localização citosólica de GST.³⁰⁹ Historicamente, a GST tem sido localizada no fígado e em outros órgãos animais e tem como característica principal a função desintoxicante.³¹²



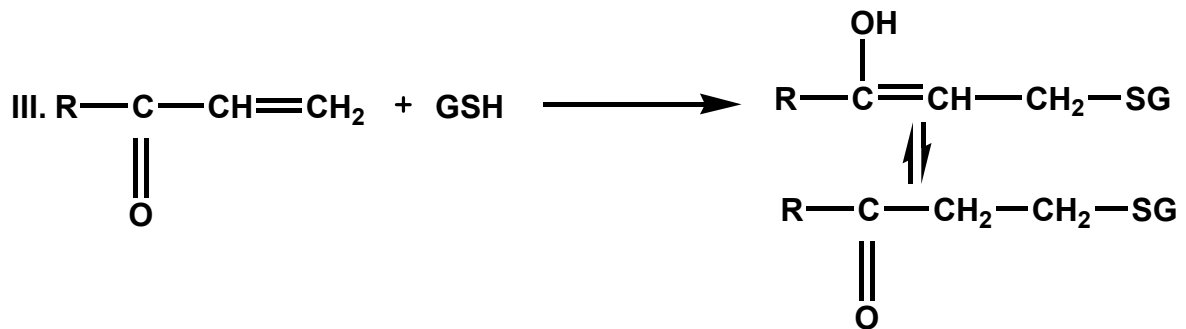


Figura 13 – Reações típicas catalisadas pela GST. I) Reação de substituição $\text{S}_\text{N}2$, II) Reação de doação de H^+ , III) Reação de adição do tipo *Michael*.

A despeito da historicidade em grupos animais, a enzima GST tem sido caracterizada em plantas^{313,314} [e.g. em milho, quando sob exposição ao metolaclor e CDNB (1-cloro-2,4 dinitrobenzeno)],³¹⁵ Bem como em algas, tanto de água doce^{316,317} como marinhas. No entanto, outras funções mais evidentes têm sido associadas a elas: como participantes no metabolismo de produtos naturais,³¹⁸ agente protetor em plantas, agindo com peroxidases usando a GSH para reduzir hidroperóxidos a ácidos graxos.³⁰⁹ No entanto, é importante mencionar que a atividade de GST pode, em certa medida, comprometer o par redox GSH/GSSG do organismo, uma vez que GSH figura como importante antioxidante celular. Tal característica, faz da avaliação da atividade de GST, bem como os produtos de excreção por ela conjugados, um conjunto imprescindível de biomarcadores de poluição aquática com implicações diretas no metabolismo de O_2 e produção de EROs.

1.6.2.3 Excreção e/ou compartimentalização e estoque (Fase III)

Em animais a fase III, caracteriza-se pela excreção dos compostos conjugados com certa hidrofiliabilidade. Entre as várias alternativas à disposição da

célula para excreção de compostos, a atividade da glicoproteína-P chama a atenção em especial.³¹⁹ Glicoproteína-P (*ATP-binding transporters*) têm sido amplamente estudada ao longo dos anos por conferir resistência a múltiplas drogas quimioterápicas MDR (*Multi-Drug Resistance*) em células tumorais.³²⁰ Recentes trabalhos mostram que esses transportadores estão envolvidos no efluxo de xenobióticos ($\log K_{ow} < 2$) em células de mamíferos, peixes, moluscos e esponjas. Tal mecanismo de múltipla resistência MXR (*Multi-Xenobiotic Resistance*), atesta uma importante adaptação desses organismos em ecossistemas aquáticos. Nas plantas, o caminho seguido pelos xenobióticos é um tanto quanto peculiar, sendo exportados para o interior de vacúolos celulares, para o espaço extracelular, ou então depositado em meio à lignina ou outro componente da parede celular. Até o momento não há qualquer evidência na literatura, que ateste a existência concreta de sistemas MXR em organismos fotossintetizantes e que possam ser usados como biomarcadores de poluição.

2. OBJETIVOS

1. Estudar a susceptibilidade das defesas antioxidantes e de mecanismos de desintoxicação de xenobióticos na microalga diatomácea *Minutocellus. polymorphus* (Hargraves et Guillard) Hasle, von Stosch et Syversten 1983 quando submetida a concentrações subletais de oxifluorfenol e de benzo[a]pireno em exposição aguda.

2. Isolar a fração microsomal para caracterizar a presença de CYP450 em macroalga *Kappaphycus alvarezii* (Doty) Doty ex P. Silva 1996.

Para se atingir estes objetivos centrais as seguintes etapas foram abordadas:

- I. Cultivo da microalga *M. polymorphus* em incubadoras sob condições controladas;
- II. Adaptação da macroalga de cultivo em mar aberto, para condições controladas de laboratório;
- III. Determinação da curva de crescimento em *M. polymorphus* com base na fluorescência da clorofila *in vivo*.
- IV. Determinação da concentração subletal (IC₅₀) em *M. polymorphus* para OxF e BaP;



- V. Análise das enzimas de defesa antioxidantes e da enzima de glutatona s-transferase por espectrofotometria;
- VI. Análise dos níveis de MDA, de GSH/GSSG e de Asc⁻ e Asc⁻ total através da técnica de HPLC;
- VII. Medida dos níveis de excreção/liberação de H₂O₂ através de luminômetro.
- VIII. Adaptação das metodologias de Isolamento da fração microssomal encontradas na literatura, para macro algas ;
- IX. Quantificação do sistema CYP450 através de espectrofotometria;

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Manipulação das culturas

A primeira parte experimental constitui-se da manutenção das culturas, determinação das curvas de crescimento, ensaios para determinação do IC₅₀ para OxF e BaP, elaboração dos testes toxicológicos, coleta e armazenagem das amostras.

a) Equipamentos utilizados

- Autoclave vertical – Phoenix;
- Fluxo laminar vertical FVL CII B2 - Trox Technik;
- Incubadora refrigerada Precision 818 – Thermo Scientific;
- Radiômetro QSL 100 – Biospherical Instruments;
- Espectrofluorímetro F4500 – Hitachi;
- Centrífuga RC-5B, rotor GSA e tubos com vol. 250 mL – Sorval;
- Microcentrífuga 5417R com rotor fixo e tubos com vol 1,0 mL – Eppendorf;
- Butijão criogênico (*dewar*) para N₂ liq. com vol. 1 L – Thermo Scientific;
- Freezer –86 °C 8560 – Forma Scientific.

b) Reagentes utilizados

- Herbicida oxifluorfenó (Goal) – DowAgroscience;
- HPA benzo[a]pireno – Sigma-Aldrich;
- Metanol P.A. – Merck.

c) Soluções utilizadas

- Meio de cultura *f/2*;
- Meio de cultura *von Stosch* a 50%.

d) Materiais utilizados

- Cubetas em quartzo para fluorescência com vol. 1,0 mL – Hellma;

- Frascos *Fernbach* (vol. 2,8 L), tubos para centrífuga [tubos *Falcon* (5, 10 e 20 mL) e tubos *Eppendorf* (1 e 2 mL)], tampões de algodão e gaze, provetas (100, 250 e 500 mL), *erlenmeyers* (50, 100 e 200 mL), *bekers* (vários volumes), micropipetas (10, 100, 1000 e 5000 μL), ponteyras, pipetas *Pasteur*, espátulas, luvas de látex, etc.

3.1.1 Culturas

Utilizou-se nesse estudo, a diatomácea (Heterokontophyta) *M. polymorphus*, por apresentar um crescimento rápido, o que permitiu a realização de experimentos de incubação de caráter agudo (48h) com minimização dos efeitos de degradação, volatilização e/ou adsorção do xenobiótico nas paredes do recipiente. As *culturas-mãe* da *M. polymorphus* (Fig. 14A e B) foram manipuladas sob condições assépticas em fluxo laminar e mantidas em água do mar, com salinidade 32‰. A água do mar foi previamente esterilizada em autoclave durante 30 minutos a 130°C com 1,5 kgf.cm⁻² de pressão e, posteriormente enriquecidas com meio de cultura *f/2*. (Vide apêndice A) As culturas desenvolveram-se em incubadoras a 19 °C com fotoperíodos de 12 horas de luz, com lâmpada fluorescente fria com 120 μmol de fótons.m⁻².s⁻¹ de irradiância fotossinteticamente ativa (PAR) (63 W.m⁻² de irradiância solar).^{38,202,214,269}

Como experimentos adicionais, foram mantidos em frascos de cultivo amostras da Rhodophyta (alga vermelha) *K. alvarezii* (Fig. 14C) com água do mar enriquecida com meio de cultura *von Stosch* a 50%. (Vide apêndice B) As algas foram mantidas em incubadoras a 25 °C e submetidas à fotoperíodos de 14 horas de luz, com lâmpada fluorescente fria, sob 210 μmol de fótons m⁻².s⁻¹ de irradiância.³²¹ Particularmente, *K. alvarezii* exigiu cuidados especiais como limpeza

semanal sob água corrente e troca quinzenal de meio de cultura. Além disso, diferentemente de *M. polymorphus*, era mantida sob constante oxigenação mediante uso de compressor usado em aquarismo. As amostras de *K. alvarezii* foram utilizadas somente nos ensaios para padronização da análise de CYP450.

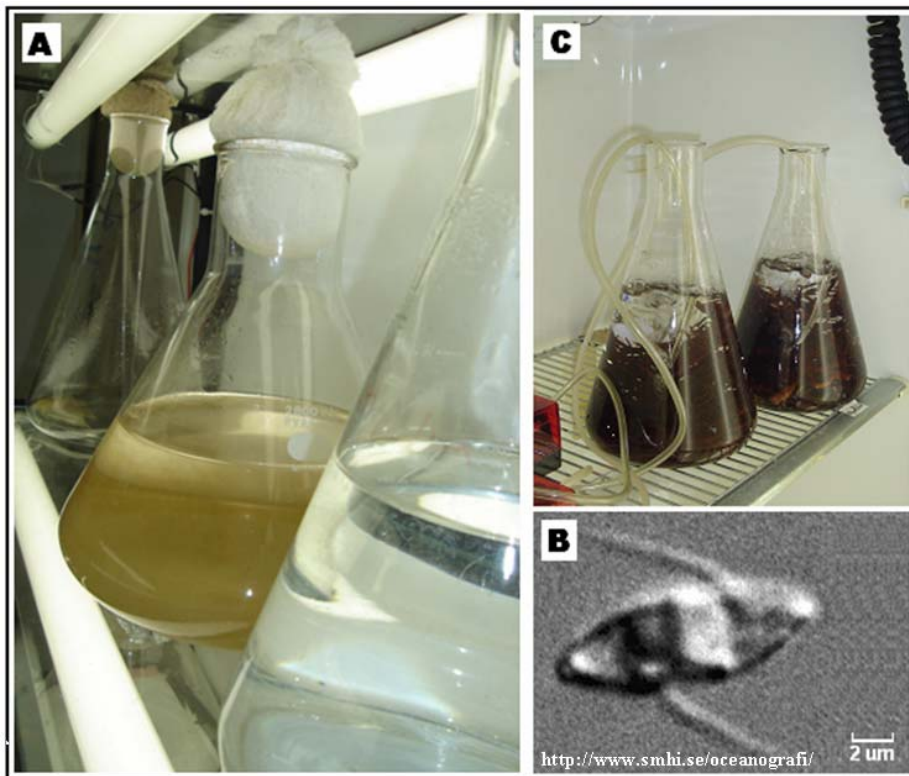


Figura 14 – A) Foto das culturas axênicas de *M. polymorphus*, em primeiro plano as culturas 1×10^6 células.mL⁻¹ no dia do inóculo e, em segundo plano, as culturas de *M. polymorphus* com 8 dias. B) Imagem de *M. polymorphus* em MEV. C) Foto das amostras de *K. alvarezii*, mantidas em laboratório sob aeração artificial.

3.1.2 Determinação da curva de crescimento por fluorescência *in vivo* da clorofila

Sob as condições de desenvolvimento acima citadas, células de *M. polymorphus* em um volume de 1L (em triplicatas) foram inoculadas com uma concentração 1×10^6 células.mL⁻¹, estimadas por contagem em microscópio (*vide* apêndice C), a partir de culturas-mãe durante o período de desenvolvimento exponencial entre o 1º. e 5º. dias. Os inóculos cresceram por um período de 30

dias, considerando-se o monitoramento do parâmetro da fluorescência da clorofila *in vivo*, conforme o protocolo DIN 38412-33.³²²

Diariamente, durante esse período, após suave agitação da cultura, alíquotas de 1 mL (três repetições por réplica) eram retiradas para medir a fluorescência da clorofila (λ_{ex} = 440 nm e λ_{em} = 680 nm). (Fig. 15) Os espectros de fluorescência foram obtidos com espectrofluorímetro ajustado com a tensão da fotomultiplicadora em 900 V, com 5 mm de abertura de fenda e com velocidade de varredura de 5 nm.s⁻¹.

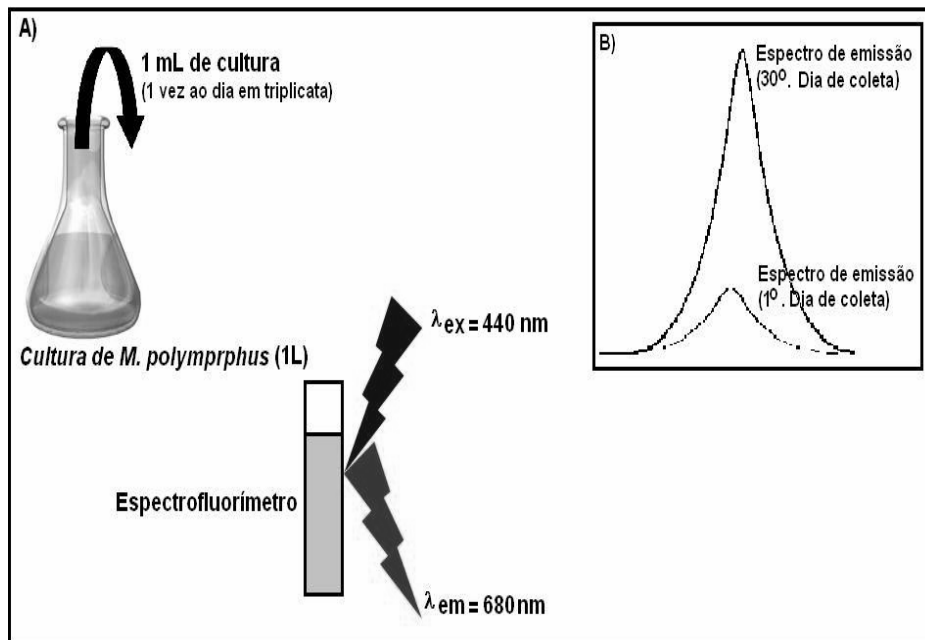


Figura 15 – A) Procedimento de coleta de amostras para construção da curva de crescimento de *M. polymorphus* com base na fluorescência *in vivo* da clorofila. B) Representação ilustrativa de aumento da intensidade de fluorescência de clorofila (λ_{em} = 680 nm) em função do aumento da densidade populacional durante o período (30 dias) de ensaio.

Paralelamente, monitorou-se o crescimento da cultura de *M. polymorphus* durante o mesmo período e com as mesmas condições de início. Porém, usando-se o parâmetro de contagem de células (*vide* Apêndice C), conforme protocolo

ABNT 12648,³²³ para assegurar sobre a correlação entre os parâmetros da fluorescência da clorofila com a concentração celular.

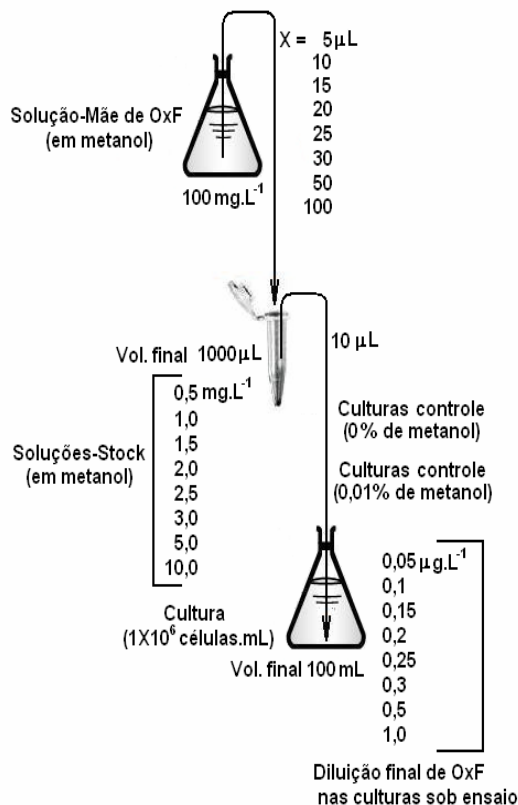
3.1.3 Teste toxicológico em *M. polymorphus* (determinação do IC₅₀)

Após prévio contato com o departamento técnico da empresa DowAgroscience, por intermédio do Dr. Marcelo Balderrama, e explicação acerca da importância do xenobiótico para o delineamento do projeto, o herbicida Goal (OxF) nos foi gentilmente cedido pela companhia, detentora da patente de produção do produto no Brasil. Inóculos, a partir de culturas-mãe na fase exponencial, contendo 1×10^6 células.mL⁻¹ de *M. polymorphus* cultivadas em erlenmeyer de 100 mL (em triplicatas) foram submetidas às concentrações de OxF

(I).

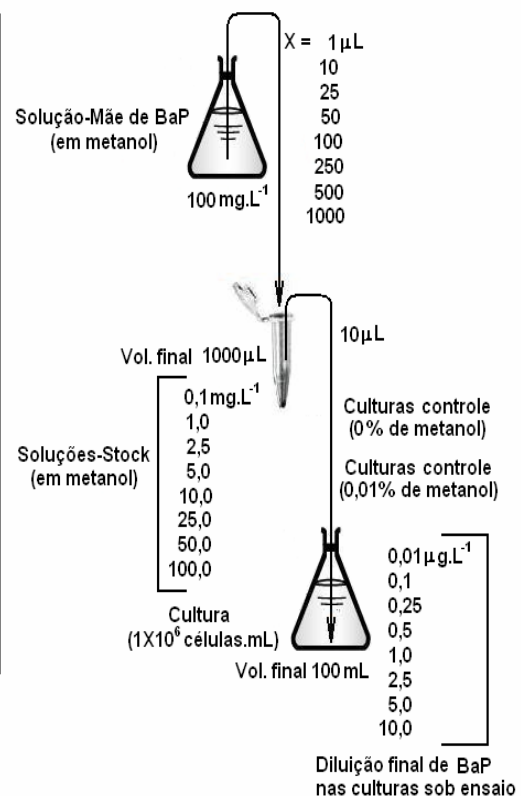
I)

Ensaio com Oxifluorfenó:



II)

Ensaio com Benzo[a]pireno:



Paralelamente, em outro grupo experimental, inóculos foram expostos às concentrações de BaP (II). Além disso, como decorrência do uso de metanol para solubilizar OxF e BaP, considerou-se inóculos controle com 0% e inóculos controle com 0,01% de metanol.

As células foram mantidas sob condições ideais de cultura, por um período de 48h e, ao final desse período, alíquotas de 1 mL (três repetições por réplica) foram retiradas para leitura da fluorescência da clorofila. A taxa de crescimento celular diário das algas (μ) foi obtida segundo o protocolo ISO 8692.³²⁴ (Eq. 1)

$$\mu = \frac{(\ln FL_{48} - \ln FL_{\text{basal}})}{t_n} \times 24$$

Onde:

μ = Taxa de crescimento celular diário;

FL_{basal} = Medida da fluorescência da alga no tempo zero;

FL_{48} = Medida da fluorescência da alga após 48h;

t_n = 48 horas.

As concentrações efetivas (CE) de OxF e BaP suficientes para inibir um parâmetro em 50% (CE_{50}), foram obtidas com base na medida da porcentagem de inibição da taxa de crescimento celular diário ($\%inib.\mu$), sendo então, denominada de IC_{50} . Os cálculos foram feitos considerando-se a diferença entre os valores das áreas da fluorescência das culturas controle (FL_c) e tratadas (FL_t) em 48h de ensaio pelos valores da fluorescência basal (FL_{basal}) no tempo zero (1×10^6 células.mL⁻¹). (Fig.16)

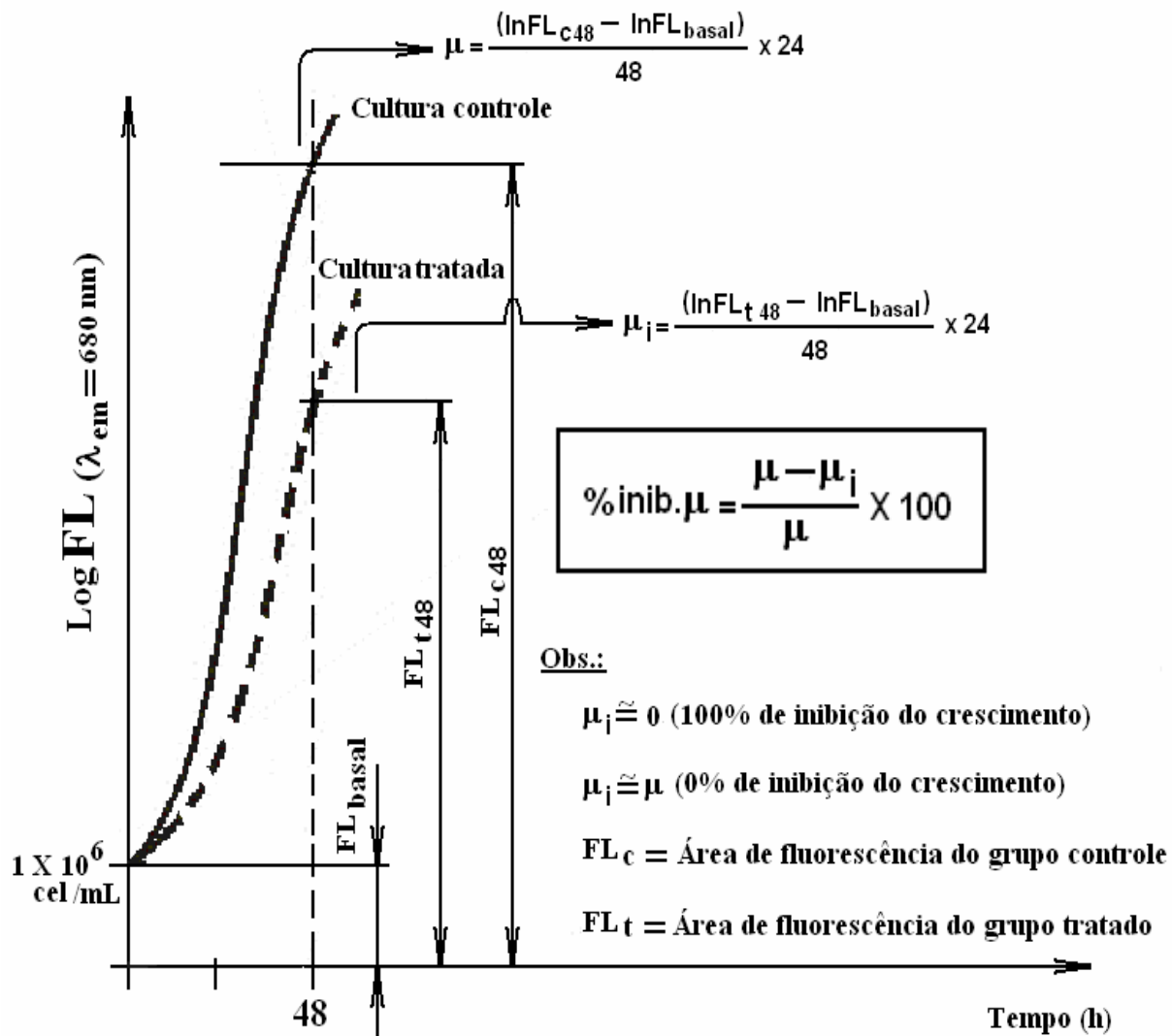


Figura 16 – Esquema ilustrativo que mostra os critérios para obtenção de IC_{50} . Cada concentração de xenobiótico (OxF ou BaP) gerou um grau de inibição (μ_i) a partir de μ em 48h. Adotamos como 100% de inibição do crescimento da cultura, quando, em uma dada concentração de xenobiótico, os valores de $\mu_i=0$ e, como 0% de inibição, quando, em uma dada concentração do xenobiótico, os valores de $\mu_i=\mu$.

Possíveis interferências de OxF e BaP na fluorescência da clorofila, poderiam gerar distorções na curva dose-resposta alterando a correlação entre a inibição da fluorescência da clorofila e a $\%inib.\mu$. Assim, as culturas de *M. polymorphus* foram ensaiadas por 48h sob a IC_{50} para OxF e BaP e, posteriormente, submetidas ao protocolo de contagem de células, com vistas à confirmação da $\%inib.\mu$ considerando a diminuição da concentração celular.

3.1.4 Delineamento experimental

Os experimentos com *M. polymorphus* foram elaborados a partir de culturas testes (2,4 L com inóculos na concentração de 1×10^6 células.mL⁻¹ em triplicatas) expostas a uma IC₅₀ para OxF de 0,24 µg.L⁻¹, e a uma IC₅₀ para BaP de 0,99 µ.gL⁻¹ e comparadas com controles com e sem metanol (2,4 L com inóculos na concentração de 1×10^6 células.mL⁻¹ em triplicatas) por um período de 48 h nas condições de cultura anteriormente descritas. Terminado o período de exposição, procedeu-se a coleta.

3.1.4.1 Coleta do material e armazenagem

1ª. Etapa (coleta): Inicialmente foi feita uma primeira centrifugação de 1,2 L de cultura, acondicionadas em 6 tubos com 200 mL cada a 10000 rpm durante 20 min sob 4 °C (Fig. 17).

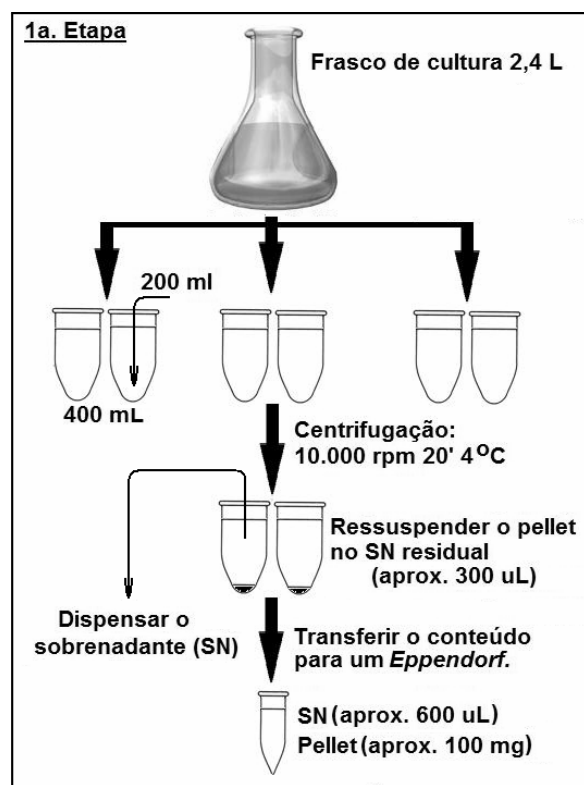


Figura 17 – Ilustração do protocolo da 1ª. etapa - coleta.

Após a centrifugação e retirada dos tubos da centrifuga, procedeu-se com a transferência dos *pellets*. Retirou-se a água (sobrenadante) em excesso com uma trompa-d'água, deixando-se um mínimo de $\pm 300 \mu\text{L}$ junto ao *pellet* intacto. Com os tubos sob gelo e com o auxílio de uma espátula, ressuspendeu-se o *pellet* no sobrenadante residual, transferindo-se com uma pipeta *Pasteur*, o volume ressuspensão de cada dois tubos ($\pm 600 \mu\text{L}$ c/ aprox. 100 mg de massa de material biológico fresco) para um tubo *ependorf* devidamente identificado e resfriado. Repetiu-se o mesmo procedimento para os 1200 mL restantes.

2ª. Etapa (armazenagem): A próxima etapa (Fig.18A) consistiu-se em submeter os 6 tubos *ependorf*, com as células coletadas, a uma segunda centrifugação a 10000 rpm durante 5 min sob 4 °C. O sobrenadante em excesso ($\pm 550 \mu\text{L}$) foi dispensado e, então, o pellet intacto foi submetido a um *Dewar* com N_2 liq. por 1 min e congelado, logo após, armazenado em *freezer* a -80 °C até o momento da análise (Fig. 18B).

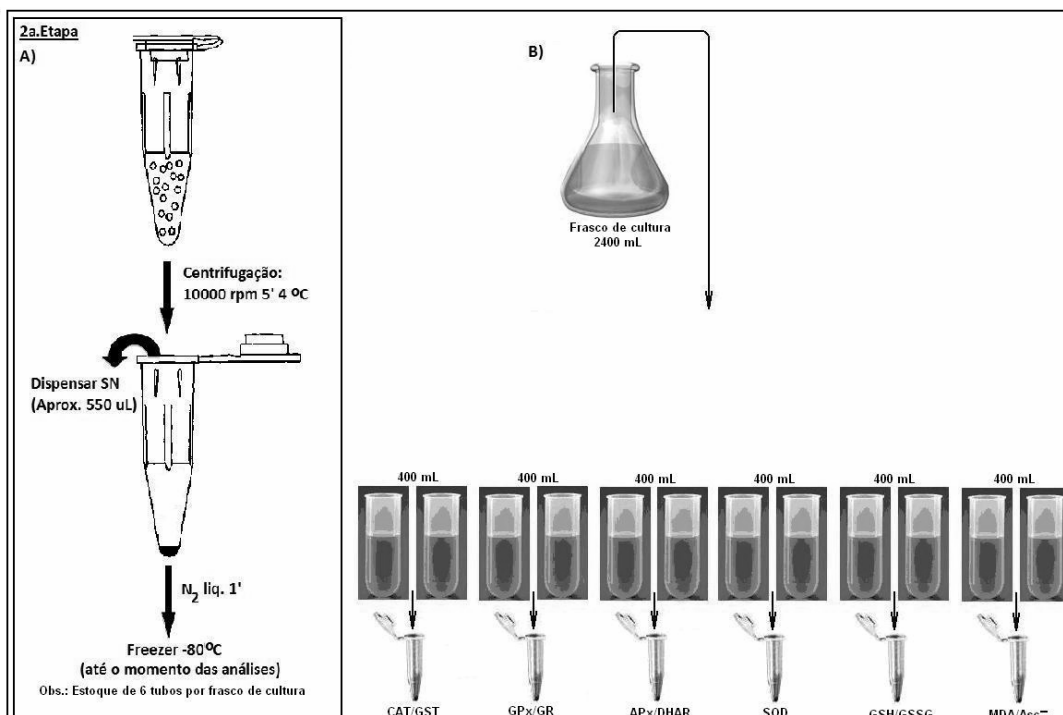


Figura 18 – A) Ilustração do protocolo da 2ª. etapa - armazenagem. B) Resumo: 2,4 L de cultura coletados e armazenados em seis diferentes tubos, guardados em *freezer* – 80°C e previamente destinados às futuras análises.

3.2 Ensaios enzimáticos

A segunda parte experimental constitui-se da preparação dos extratos e da elaboração dos ensaios enzimáticos referentes ao estresse oxidativo e aos processos de biotransformação de fase II.

a) Equipamentos utilizados

- Sistema de purificação de água MilliQ – MilliPore;
- Disruptor de células Sonifier 250 – Branson;
- Centrifuga 5417R com rotor fixo e tubos com vol 1,0 mL – Eppendorf;
- Espectrofotômetro duplo feixe U3000 com banho termostatizado – Hitachi.

b) Reagentes utilizados

- Os reagentes a seguir foram utilizados sem purificação prévia. NaH₂PO₄.H₂O, Na₂HPO₄.12H₂O, KH₂PO₄, K₂HPO₄, NaOH em lentilhas, H₂O₂ 30%, etanol 95%, ácido clorídrico 37%, todos P.A. da Merck. Ácido etilenodiaminotetraacético (EDTA), β-NADPH, 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB), fluoreto de fenilmetilsulfonila (PMSF), citocromo C (Cit c), GSH, GSSG, t-butil hidroperóxido 70% (t-BOOH), xantina, xantina oxidase (XO) (25 U mL⁻¹), glutatona redutase (24 U.mL⁻¹) da Sigma-Aldrich.

c) Soluções utilizadas

- Tampão de res. – Fosfato de sódio 100 mM, pH 7,4 com 1 μM PMSF em etanol;
- Tampão para CAT – Fosfato 50 mM, pH 7,0;
- Tampão para GPx – Fosfato de potássio 100 mM, pH 7,0 com EDTA 1 mM;
- Tampão para GR – Fosfato de sódio 100 mM, pH 7,6, com EDTA 0,5 mM;

- Tampão para APx – Fosfato de potássio 50 mM, pH 7,0;
- Tampão para DHAR – Fosfato de potássio 50 mM, pH 6,5 com EDTA 0,1 mM;
- Tampão para SOD – Fosfato 50 mM, pH 7,8 com EDTA 0,1 mM;
- Tampão para GST – Fosfato de potássio 100 mM, pH 6,5 com EDTA 1,0 mM.

d) Materiais utilizados

- Cubetas em quartzo para espectrofotometria (vol. 0,5 e 1,0 mL) – Hellma;
- Tubos *ependorf* (1 e 2 mL), provetas (100, 250 e 500 mL), *erlenmeyers* (50, 100 e 200 mL), *bekers* (vários volumes), micropipetas (10, 100, 1000 e 5000 μ L), ponteiros, espátulas, luvas de látex, *etc.*

3.2.1 Obtenção dos extratos

As algas, previamente armazenadas em *freezer* -80 °C, foram ressuspensas (Fig. 19) em 1 mL tampão gelado de ressuspensão e então levadas ao desruptor de células (sonicador) ajustado em um *duty cycle* de 70% e *Output control* 2, sendo submetidas aos pulsos de ultra-som por 4 períodos de 15 s com intervalos de 15 s entre eles. Logo após, os tubos foram centrifugados a 10000 rpm durante 5 min sob 4 °C. Estando os tubos sempre envoltos em gelo, os sobrenadantes obtidos dessa forma, estavam prontos para os ensaios enzimáticos.

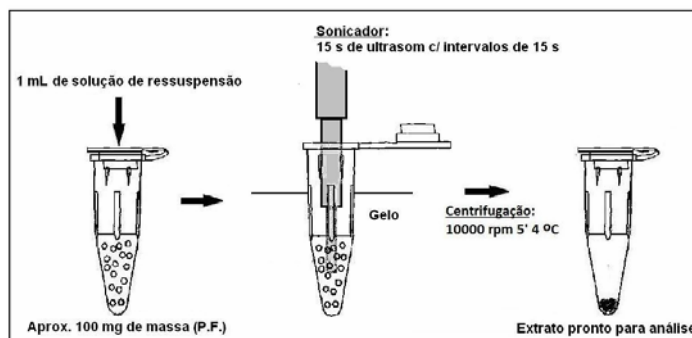


Figura 19 – Esquema ilustrativo do protocolo de obtenção do extrato para os ensaios enzimáticos a partir dos estoques acondicionados em *freezer* -80 °C.

Todos os ensaios enzimáticos (n=3 com 3 repetições por réplica) foram feitos em espectrofotômetro, no dia da preparação dos homogenatos (extratos) e juntamente com a preparação das soluções para os respectivos ensaios. Os cálculos das atividades para cada enzima estão descritos na metodologia específica do ensaio. Para o cálculo da atividade específica, utilizou-se a concentração de proteína encontrada no próprio extrato usado no ensaio.

3.2.2 Estresse Oxidativo

3.2.2.1 Catalase (E.C.: 1.11.1.6)

A uma cubeta de quartzo de 0,5 mL, contendo 400 µL de uma solução de H₂O₂ 12,5 mM em tampão, foram adicionados 100 µL de extrato. Logo que a amostra foi adicionada, a cinética foi monitorada por 1 min, sendo a leitura realizada em 240 nm, a 30 °C.³²⁵

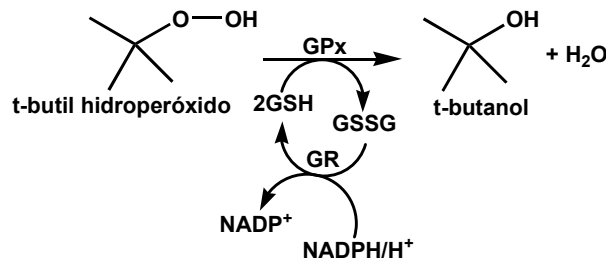


A atividade da CAT foi determinada dividindo-se a inclinação da reta obtida (A.min⁻¹) pelo coeficiente de absorvidade molar de H₂O₂ ($\epsilon_{240} = 39,4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$), multiplicando-se por 1000 e pelo fator de diluição (5X). Uma unidade de CAT foi definida como a quantidade de enzima que catalisa a decomposição de 1 µmol de H₂O₂ por minuto a 30°C em pH 7,0.

3.2.2.2 Glutathione Peroxidase (E.C.: 1.11.1.9)

A uma cubeta de quartzo de 1,0 mL, contendo 910 µL de tampão, foram adicionados 50 µL de extrato, 10 µL de glutathione redutase 24 U.mL⁻¹ e 10 µL de GSH 10 mM solubilizada em tampão seguido de uma incubação por 10 min a 37°C sob agitação. Em seguida foram adicionados 10 µL de NADPH 15 mM

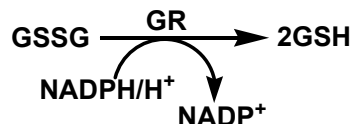
solubilizados em tampão e a absorbância foi monitorada por 3 min em 340 nm a 37°C sob agitação. Após isso, disparou-se a reação pela adição de 10 µL de t-BOOH 120 mM em água desionizada e a cinética foi monitorada nas mesmas condições, durante 5 min.³²⁶



A atividade da GPx foi determinada dividindo-se a inclinação da reta obtida (A.min⁻¹) pelo coeficiente de absorvidade molar do NADPH ($\epsilon_{340} = 6220 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$), multiplicando-se por 1000, pelo fator estequiométrico de 2 e pelo fator de diluição (20X). Uma unidade de GPx foi definida como a quantidade de enzima que catalisa a oxidação de 1 µmol de NADPH por minuto a 37°C em pH 7,0.

3.2.2.3 Glutaciona Redutase (E.C.: 1.6.4.2)

Preparou-se o meio reacional contendo em 10 mL de tampão, NADPH 0,1 mM e GSSG 1 mM. Após a adição de todos os reagentes, aguardou-se 10 min. A uma cubeta de quartzo de 1,0 mL foram adicionados, então, 950 µL do meio reacional e 50 µL de extrato. A cinética foi monitorada em 340 nm, a 30°C por 5 min e sob agitação.³²⁷

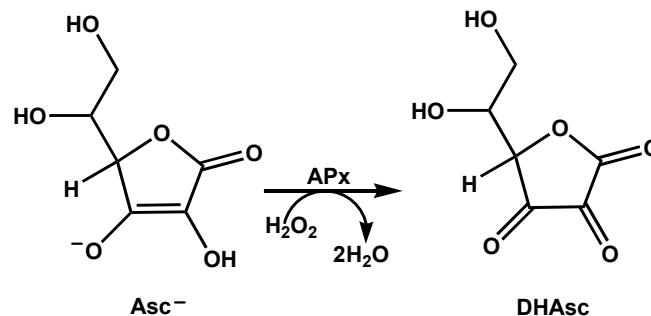


A atividade da GR foi determinada dividindo-se a inclinação da reta obtida (A.min⁻¹) pelo coeficiente de absorvidade molar de NADPH ($\epsilon_{340} = 6220 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$), multiplicando-se por 1000 e pelo fator de diluição (20X). Uma unidade de GR foi

definida como a quantidade de enzima que catalisa a oxidação de 1 μmol de NADPH por minuto a 30°C pH 7,6.

3.2.2.4 Ascorbato peroxidase (E.C.:1.11.1.11)

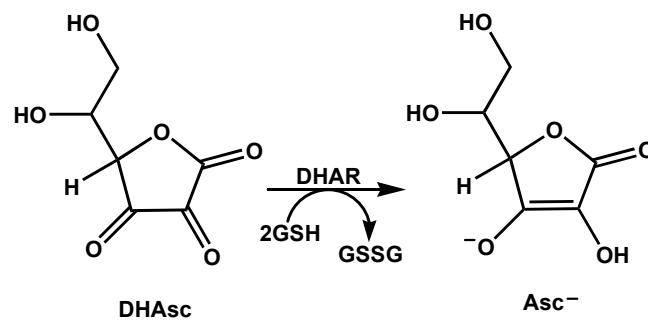
A uma cubeta de quartzo de 1,0 mL, contendo 930 μL de tampão, foram adicionados 50 μL de extrato e 10 μL de Asc^- 50 mM solubilizado em tampão. Primeiramente, a absorbância foi monitorada em 290 nm durante 2 min para verificar uma eventual atividade ascorbato oxidase. Após isso, reação foi iniciada pela adição de 10 μL de H_2O_2 10 mM em tampão e a cinética foi monitorada por 3 min, sendo a leitura realizada em 290 nm (e não em 265 nm por causa da alta absorvidade molar do Asc^-), a 30 °C e sob agitação.^{328,329}



A atividade da APx foi determinada dividindo-se a inclinação da reta obtida ($\text{A} \cdot \text{min}^{-1}$) pelo coeficiente de absorvidade molar de Asc^- ($\epsilon_{290} = 2800 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$), multiplicando-se por 1000 e pelo fator de diluição (20X). Correções para compensar uma provável atividade ascorbato oxidase e a taxa de oxidação não enzimática de asc^- por H_2O_2 foram feitas descontando-se frações de até 5% do valor final encontrado para a atividade da enzima. Uma unidade de APx foi definida como a quantidade de enzima que catalisa a oxidação de 1 μmol Asc^- de por minuto a 30°C em pH 7,0.

3.2.2.5 Dehidroascorbato redutase (E.C.: 1.8.5.1)

A uma cubeta de quartzo de 1,0 mL, contendo 930 μ L de tampão, foram adicionados 10 μ L de DHAsc 50 mM e 10 μ L de GSH 500 mM ambos solubilizados em tampão. Primeiramente, a absorbância foi monitorada em 265 nm durante 2 min para verificar a taxa de redução não enzimática de DHAsc por GSH. Após isso, reação foi iniciada pela adição de 50 μ L de extrato e a cinética foi monitorada por 3 min, sendo a leitura realizada em 265 nm, a 30 °C e sob agitação.³³⁰

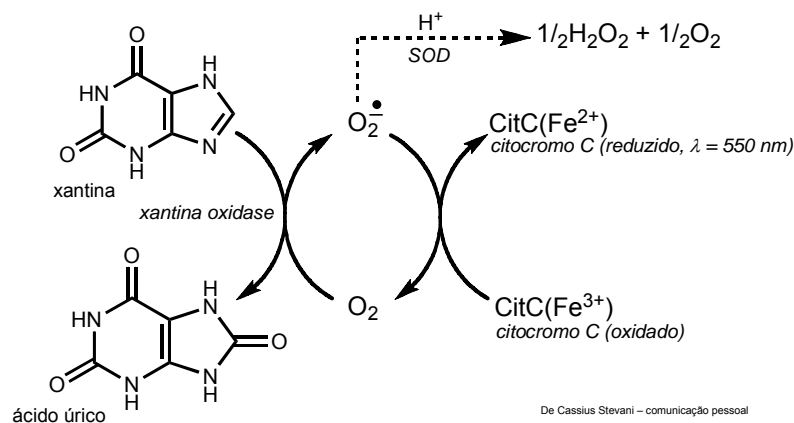


A atividade da APx foi determinada dividindo-se a inclinação da reta obtida ($A \cdot \text{min}^{-1}$) pelo coeficiente de absorvidade molar de Asc⁻ ($\epsilon_{265} = 14000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$), multiplicando-se por 1000 e pelo fator de diluição (20X). Correções para compensar a taxa de redução não enzimática de DHAsc e a taxa de formação de GSSG ($\epsilon_{265} = 180 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) foram feitas descontando-se frações de até 2% do valor final encontrado para a atividade da enzima. Uma unidade de DHAR foi definida como a quantidade de enzima que catalisa a redução de 1 μ mol DHAsc de por minuto a 30°C em pH 6,5.

3.2.2.6 Superóxido dismutase (E.C.: 1.15.1.1)

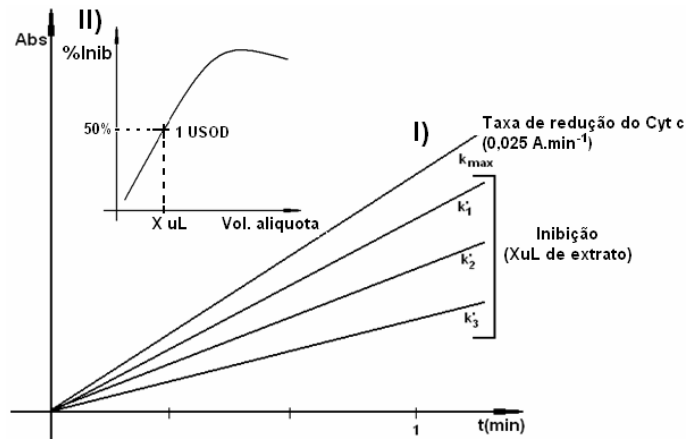
O ensaio de SOD total foi baseado na inibição da taxa de redução do Cit c, onde SOD compete com Cit c por $\text{O}_2^{\bullet -}$, gerado pelo sistema xantina/xantina oxidase. O meio reacional foi preparado adicionando-se em 25 mL de tampão, 10

mL de uma solução de 0,5 mM de xantina em NaOH 1 mM e 6,2 mg de Cit c. A seguir, verificou-se a taxa de redução do Cit c adicionando-se em uma cubeta de 1,0 mL, 950 μ L de meio reacional e um fração de XO (25 U.mL^{-1}) previamente em gelo e, após agitação, monitorou-se o aumento da absorbância em 550 nm, durante 5 min a 25 °C. No presente ensaio, uma fração de 2 μ L de XO foi suficiente para obter uma taxa de redução de Cit c de $0,0250 \text{ A.min}^{-1}$. Assim, o ensaio da SOD se deu através do acréscimo de alíquotas de extratos (2,5 a 50 μ L) no sistema a cima descrito, causando uma inibição da taxa de redução de Cit c dentro de uma faixa de 0 a 80% ($0,0250 - 0,005 \text{ A.min}^{-1}$).³³¹



A atividade de SOD foi determinada da seguinte maneira: (I) Através da inclinação (A.min^{-1}) da reta controle (k_{max}) que é a taxa de redução do Cit c e das inclinações das retas que receberam alíquotas crescentes de extrato (k') que causaram a inibição da redução do Cit c.

A partir disso, calculou-se a inibição percentual através da relação $\%_{\text{Inb}} = ((k'/k_{\text{max}}) - 1) \cdot 100$. Após (II), determinou-se o volume de extrato equivalente a 1 unidade de SOD através do gráfico ($\%_{\text{Inb}}$ versus vol. das alíquotas de extrato). Finalmente, multiplicou-se pelo fator de diluição do volume determinado para o ensaio de 1mL.

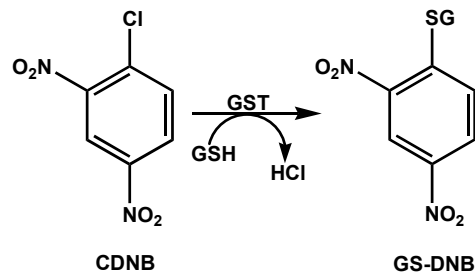


Uma unidade de SOD é definida como a quantidade de enzima (alíquota do extrato) que é suficiente para inibir 50% da redução de Cyt *c* a 25°C em pH 7,8.

3.2.3 Biotransformação - Fase II

3.2.3.1 Glutathione s-transferase (E.C.: 2.5.1.18 - GST)

A uma cubeta de quartzo de 1,0 mL foram adicionados 930 μ L de tampão, 10 μ L de CDNB 0,1 M em etanol, 10 μ L de GSH 0,1 M em tampão e 50 μ L de extrato. A cinética foi monitorada por 1 min em 340 nm, a 25°C e sob agitação.³³²



A atividade da GST foi determinada dividindo-se a inclinação da reta obtida pelo coeficiente de absorvidade molar do aduto GS-DNB ($\epsilon_{340} = 9600 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) e multiplicando-se por 1000 e pelo fator de diluição (20X). Uma unidade de GST foi definida como a quantidade de enzima que catalisa a formação de 1 μ mol do aduto GS-DNB por min a 25 °C em pH 6,5.

3.3 Ensaios cromatográficos

A terceira parte experimental constitui-se da preparação dos extratos e de análises em HPLC. Todos os ensaios cromatográficos foram feitos (em triplicatas) no dia da preparação dos extratos e juntamente com as soluções.

a) Equipamentos utilizados

- Sistema de purificação de água MilliQ – MilliPore;
- Sonicador com banho termostaticado Bransonic 300 – Branson;
- Centrifuga 5417R com rotor fixo e tubos com vol 1,0 mL – Eppendorf;
- *Thermomixer compact* – Eppendorf;
- Agitador tipo *Vortex* – Velp Científica;
- Sistema de filtração p/ fase móvel com frasco *tipo Kitassato* (vol. 2L) – Millipore
- Bomba de vácuo EL 510 – Insight equipamentos
- O sistema cromatográfico destinado às análises era formado por uma estação Shimadzu com uma controladora (SLC 10A VP), duas bombas isocráticas (LC 10AT VP), um degaseificador *on-line* (DGU 20A5), um injetor automático refrigerado (SIL 10AD VP), um forno de coluna Waters (TCM) e, além disso, era munido de um detector de fluorescência (RF10A XL) e um detector eletroquímico ESA (Coulchem III) com uma cela guarda 5020 e uma cela analítica 5010 com dois eletrodos em série (E_1 e E_2). Toda a aquisição dos dados e posterior integração das áreas cromatográficas foram feitas mediante software Shimadzu (Class VP 6.12 SP2).

b) Reagentes utilizados

- Os reagentes a seguir foram utilizados sem purificação prévia. $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, KH_2PO_4 , NaOH em lentilhas, etanol 95%, ácido clorídrico 37%, ácido fosfórico 85%, ácido sulfúrico 97%, todos P.A. da Merck. 1,1,3,3-tetraetoxipropano (TEP),

ácido tiobarbitúrico (TBA), butilhidroxitolueno (BHT), GSH, GSSG, ácido octanossulfônico (AOS), tris (hidroximetil)aminometano (TRIZMA), ditioneitol (DTT), ácido etilenodiaminotetraacético (EDTA), ácido metafosfórico (MPA), cloreto de *n*-dodeciltrimetilamônio (*n*-DTA), homocisteína, da Sigma-Aldrich. Metanol e acetonitrila grau HPLC da EM Science.

c) Soluções utilizadas

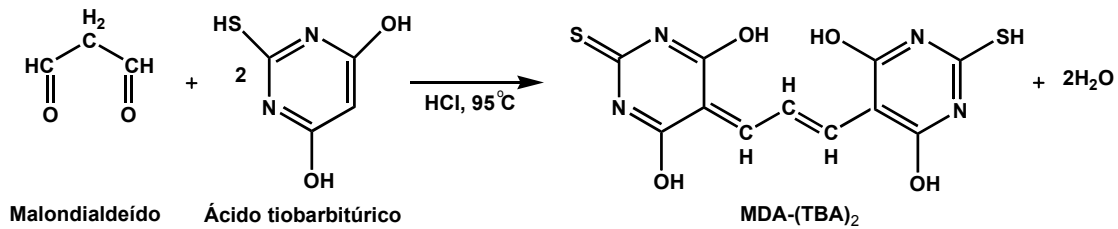
- Fase móvel MDA – Metanol/tampão fosfato 25 mM pH 6,5 (40:60).
- Fase móvel GSH/GSSG – Tampão fosfato de sódio 50 mM pH 2,7, com 50 µM de AOS e 2% de acetonitrila. *Obs.: O tampão foi feito partindo-se de ácido fosfórico e o pH ajustado com NaOH.*
- Fase móvel Asc⁻/DHAR – Tampão fosfato de sódio 100 mM pH 3,0, com 2,5 mM de EDTA e 2,0 mM de *n*-DTA. *Obs.: O tampão foi feito partindo-se Na₂HPO₄.12H₂O e o pH ajustado com ácido fosfórico.*

d) Materiais utilizados

- Seringa plástica descartável esterilizada (vol. 1,0 mL) – Cirúrgica Passos;
- Unidades filtrantes Millex-GV 0,22 µm p/ amostras e padrões – Millipore;
- *Vials* em borossilicato (P/N 534-795) para HPLC (vol. 1,0 mL) – Shimadzu;
- Tubos *ependorf* (1 e 2 mL), provetas (100, 250 e 500 mL), *erlenmeyers* (50, 100 e 200 mL), *bekers* (vários volumes), micropipetas (10, 100, 1000 e 5000 µL), ponteiros, espátulas, luvas de látex, *etc.*;
- Membranas de filtração PVDF (Aq./Org.) 0,45 µm p/ fase móvel– Millipore;
- Coluna e pré-coluna LUNA RP-18 de fase reversa 100 X 4,6 mm com diâmetro de partícula de 5 µm – Phenomenex;
- Coluna e pré-coluna Gemini C18 de fase reversa 250 X 4,6 mm com diâmetro de partícula de 5 µm – Phenomenex;

- Coluna e pré-coluna Nova-Pak C18 de fase reversa 75 X 3,9 mm com diâmetro de partícula de 4 µm – Waters.

3.3.1 Avaliação dos níveis de malondialdeído (MDA - (TBA)₂)



3.3.1.1 Preparação da curva de calibração

Partiu-se de uma solução-estoque de 4,0 M de TEP para elaboração dos padrões de MDA e, após sucessivas diluições em metanol 30%, obtiveram-se os pontos 0,5; 1,0; 2,0; 5,0 e 10,0 µM em triplicatas, que foram deixados em tubos *ependorf* com vol. de 1,0 mL. Paralelamente, preparou-se 100 mL de ambas as soluções, o agente derivatizante TBA 0,67% em HCl 0,2 M e o antioxidante BHT 2% em etanol. O ensaio de derivatização foi feito misturando-se, em um tubo *ependorf*, os reagentes na proporção 300 µL de TEP, 600 µL de TBA e 100 µL BHT que foram vigorosamente agitados em *vortex* durante 30 seg. Para os controles, usou-se água desionizada no lugar de TEP. Os tubos em triplicatas e com presilhas de segurança, foram mantidos a 95 °C durante 30 min e sob agitação lenta em um *termomixer*. Findo esse período, os padrões, agora nas concentrações 0,15; 0,3; 0,6; 1,5 e 3,0 µM, foram resfriados, filtrados e em seguida transferidos aos *vials* para injeção no HPLC.

3.3.1.2 Preparação das amostras

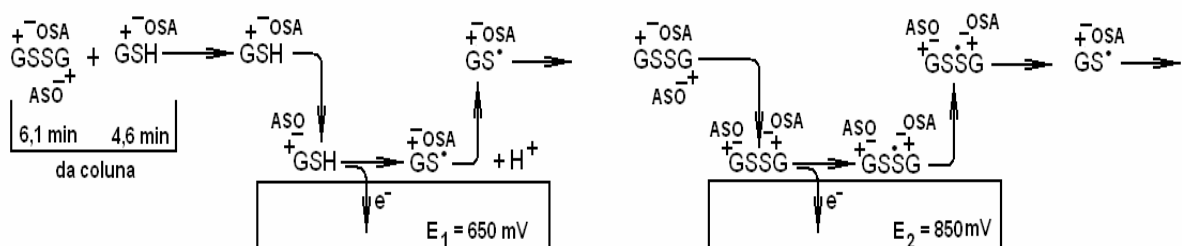
Primeiramente, procedeu-se a ressuspensão do *pellet* de algas em triplicatas (± 100 mg previamente estocado em *freezer* -80 °C) em 1 mL de metanol com vigorosa agitação em *vortex* por 1 min. Após isso, as amostras foram submetidas ao sonicador com banho a 0 °C durante 15 min e, em seguida, os homogenatos (extratos) foram centrifugados a 10000 rpm durante 5 min sob 4 °C. A derivatização foi feita exatamente com no procedimento da curva de calibração, utilizando 300 μ L do extrato no lugar de TEP (dil. 3,33X). Ao término do ensaio, as amostras foram filtradas e submetidas ao HPLC.

3.3.1.3 Análises

A detecção do aduto MDA – (TBA)₂ foi feita em HPLC³³³ associado a um detector de fluorescência ajustado para uma melhor resposta em um λ_{ex} = 515 nm e λ_{em} = 553 nm. A separação, após injeção automática de 10 μ L, teve lugar utilizando-se uma coluna e pré-coluna LUNA RP-18 com fluxo isocrático $1,0$ mL.min⁻¹ a temperatura ambiente. Todos os solventes foram previamente filtrados em membrana antes do uso.

3.3.2 Avaliação dos níveis de GSH e GSSG³³⁴

Os níveis de GSH e GSSG foram estimados em um detector eletroquímico como mostra a figura abaixo.



Esquema do sistema separação em coluna cromatográfica e de detecção eletroquímica de GSH (4,6 min) e GSSG (6,1 min) em cela analítica com eletrodo coulométrico *flow-through* em série. (OSA) ácido octanosulfônico (par iônico).

3.3.2.1 Construção do voltamograma hidrodinâmico

Para elaboração do voltamograma hidrodinâmico (HV), concentrações fixas de 10 μM de GSH e GSSG foram preparadas na própria fase móvel e mantidas em gelo. Antes da injeção da amostra de GSH no sistema de HPLC, o detector eletroquímico E_1 foi ajustado para um potencial eletroquímico inicial de 275 mV e então se procedeu à injeção. Antes, no entanto, de cada nova injeção, o potencial eletroquímico era aumentado de 25 mV. Assim, após sucessivos ajustes seguidos de injeções, o HV para GSH foi construído até o detector E_1 atingir um potencial final de 500 mV. O mesmo procedimento foi feito para GSSG. No entanto, utilizou-se o detector E_2 com potencial inicial de 600 mV, mantendo o detector E_1 com voltagem em 200 mV. Após sucessivos ajustes seguidos de injeções, o HV para GSSG foi construído até o detector E_2 atingir um potencial final de 875 mV.

3.3.2.2 Preparação da curva de calibração

Utilizou-se como solução-estoque 1 mM de GSH e GSSG solubilizados na própria fase móvel e após sucessivas diluições obtiveram-se os pontos 1,0; 2,5; 5,0; 10,0; 25,0; 50,0; 75,0 e 100,0 μM . Os padrões foram filtrados e em seguida transferidos aos *vials* para injeção no HPLC.

3.3.2.3 Preparação das amostras

Procedeu-se a ressuspensão do *pellet* de algas em triplicatas (\pm 100 mg previamente estocado em *freezer* - 80 °C) em 1 mL de fase móvel com vigorosa

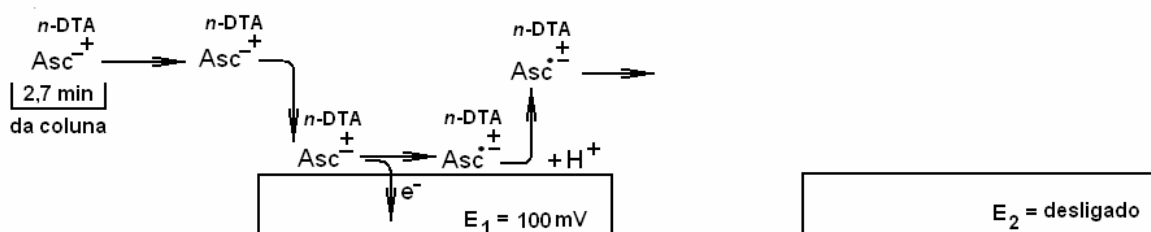
agitação em *vortex* por 1 min. Após isso, as amostras foram submetidas ao sonicador com banho a 0°C durante 15 min e, em seguida, os homogenatos (extratos) foram centrifugados durante 5 min sob 4 °C. Ao término do ensaio, as amostras foram filtradas e submetidas ao HPLC.

3.3.2.4 Análises

A detecção de GSH e GSSG foi feita em HPLC associado a um detector eletroquímico com eletrodos analíticos coulométrico *flow-through* em série. O sistema foi montado com uma célula guarda posicionada antes do injetor e ajustada para um potencial de 980 mV. A cela analítica foi posicionada após a saída da coluna e seus eletrodos ajustados para GSH e GSSG respectivamente em $E_1 = 650$ mV e $E_2 = 850$ mV. A separação, após injeção automática de 10 μ L teve lugar utilizando-se uma coluna e pré-coluna Gemini C18 com fluxo isocrático 1,0 mL.min⁻¹ em um forno de coluna ajustado a 44°C. Todos os solventes foram previamente filtrados em membrana antes do uso.

3.3.3 Avaliação dos níveis de Asc⁻³³⁵

Os níveis de Asc⁻ foram estimados em um detector eletroquímico como mostra a figura abaixo.



Esquema do sistema separação em coluna cromatográfica e de detecção eletroquímica de Asc⁻ (2,7 min) em cela analítica com eletrodo coulométrico *flow-through* em série. (*n*-DTA) *n*-dodeciltrimetilamônio (par iônico)

3.3.3.1 Construção do Voltamograma hidrodinâmico

Para elaboração do HV, foram preparadas concentrações fixas de 100 μM de padrão Asc^- , com 0,5 mM de homocisteína em MPA 5% e mantidas em gelo. Antes da injeção da amostra de Asc^- , o detector eletroquímico E_1 foi ajustado para um potencial eletroquímico inicial de -200 mV e então se procedeu à injeção. Antes de cada nova injeção, o potencial eletroquímico era aumentado de 50 mV. Assim, após sucessivos ajustes seguidos de injeções, o HV para Asc^- foi construído até o detector atingir um potencial final de 200 mV. O detector E_2 foi mantido desligado durante todo o experimento.

3.3.3.2 Preparação da curva de calibração

Utilizou-se como solução-estoque uma preparação de Asc^- idêntica à usada na construção do HV. Após sucessivas diluições em solução aquosa de MPA 5% obtiveram-se os pontos 5,0; 10,0; 20,0; 40,0; 80,0 e 100,0 μM . Os padrões foram filtrados e em seguida transferidos aos *vials* para injeção no HPLC.

3.3.3.3 Preparação das amostras

Para determinação de Asc^- :

Procedeu-se a ressuspensão do pellet de algas em triplicatas (± 100 mg previamente estocado em *freezer* - 80 °C) em 1,0 mL de MPA 10% com vigorosa agitação em *vortex* por 30 seg. Após isso, as amostras foram submetidas ao sonificador com banho a 0°C durante 15 min e, ao final, foram centrifugados a 10000 rpm durante 5 min sob 4 °C. Em seguida, procedendo-se para cada réplica, transferiu-se uma alíquota de 100 μL para um tubo *ependorf*, acrescentando-se

100 μ L de tampão TRIZMA 125 mM, pH 9,0 resultando em um pH de 2,5 (dil. 2X). Ao término do ensaio, foram filtradas e submetidas ao HPLC.

Para determinação de Asc^- total (Asc^- + DHAsc)

Do homogenato em MPA 10%, procedendo-se para cada réplica, transferiu-se uma alíquota de 100 μ L para um tubo *ependorf*, acrescentando-se 50 μ L de tampão TRIZMA 500 mM, pH 9,0, com 10 mM de DTT resultando em um pH de 6,0 (dil. 1,5X). Ao término do ensaio, foram filtradas e submetidas ao HPLC.

3.3.3.4 Análises

A detecção de Asc^- e Asc^- total foi feita em HPLC associado a um detector eletroquímico com eletrodos analíticos coulométricos *flow-through* em série. O sistema foi montado com uma célula guarda posicionada antes do injetor e ajustada para um potencial de 200 mV. A cela analítica foi posicionada após a saída da coluna e seu eletrodo E_1 ajustado para Asc^- em $E_1 = 100$ mV. A separação, após injeção automática de 10 μ L teve lugar utilizando-se uma coluna e pré-coluna Nova-Pak C18 com fluxo isocrático 0,5 mL.min⁻¹ em temperatura ambiente. Todos os solventes foram previamente filtrados em membrana antes do uso.

3.4 Determinação de H₂O₂ e proteínas

A última parte experimental constitui-se de experimentos destinados a detecção e quantificação de H₂O₂ nas culturas tratadas com OxF e BaP, bem como nos controles e, além disso, quantificação das proteínas nos extratos utilizados nos ensaios enzimáticos.

a) Equipamentos utilizados

- Sistema de purificação de água MilliQ – MilliPore;
- Luminômetro com leitor de microplacas – EG&Berthold – Lumach LB50
- Espectrofotômetro duplo feixe U3000 com banho termostaticado – Hitachi;
- Cronômetro digital com alarme – Fisher.

b) Reagentes utilizados

- Os reagentes a seguir foram utilizados sem purificação prévia. Na₂HPO₄.12H₂O, KH₂PO₄, NaOH em lentilhas da Merck. Luminol, peroxidase de raiz forte (HRP), H₂O₂ 30%, ácido [3-(N-morfolino)propano sulfônico] (MOPS) da Sigma-Aldrich. Reagente de *comassie* (cromóforo *Brilliant Blue G 250*) e padrão de proteína albumina de soro bovino da BioAgency.

c) Soluções utilizadas

- Solução A para H₂O₂ – Tampão MOPS 500 mM pH 7,0 com 500 µM de luminol;
Obs.: Diluiu-se o luminol em tampão MOPS a partir de uma solução-estoque em NaOH 1M.
- Solução B para H₂O₂ – Tampão fosfato 100 mM pH 7,0 com HRP 2800 U.mL⁻¹.

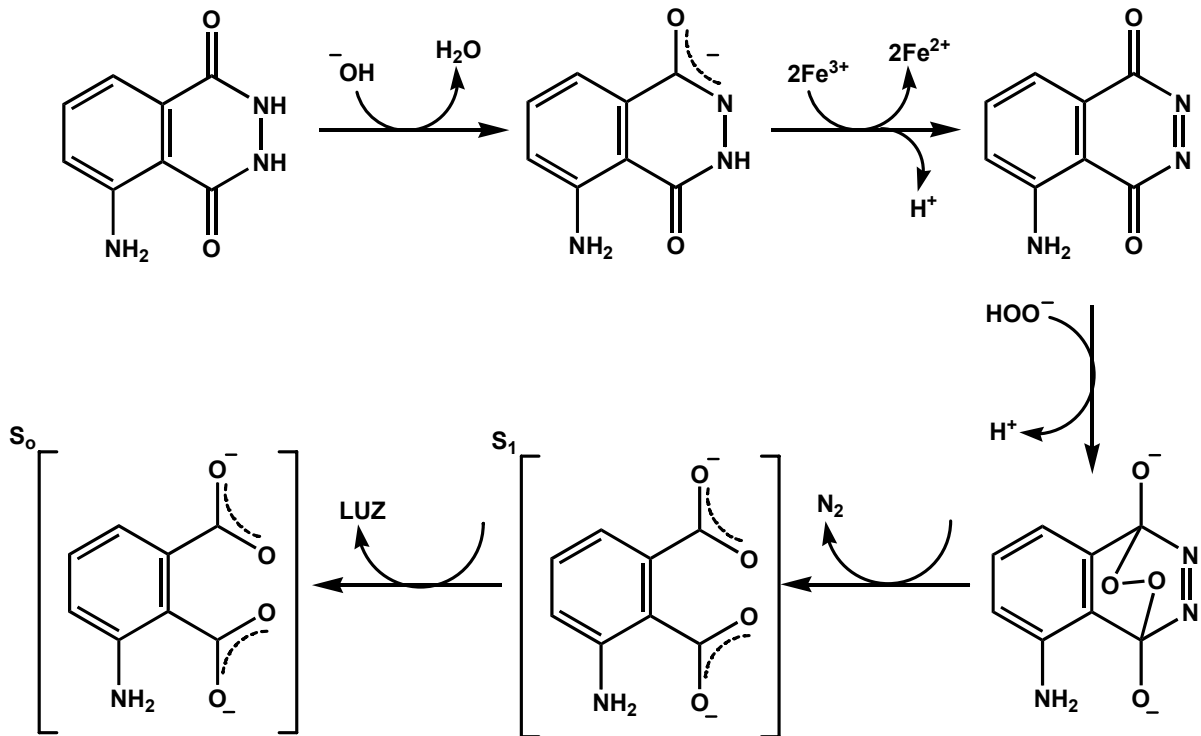
d) Materiais utilizados

- Cubetas em quartzo para espectrofotometria (vol. 1,0 mL) – Hellma;
- Microplaca em acrílico com 48 poços 3548 – Corning
- Tubos *ependorf* (1 e 2 mL), provetas (100, 250 e 500 mL), *erlenmeyers* (50, 100 e 200 mL), *bekers* (vários volumes), micropipetas (10, 100, 1000 e 5000 µL), ponteiros, espátulas, luvas de látex, *etc.*

3.4.1 Níveis de liberação *in vivo* de H₂O₂

O aumento concentração de H_2O_2 produzida nos meio de cultura de *M. polymorphus* expostas ao OxF e BaP foi determinado utilizando um teste quimiluminescente empregando luminol e HRP.^{272,336}

3.4.1.1 Descrição do ensaio



3.4.1.2 Desenho experimental

Os experimentos (Fig. 20) foram elaborados a partir de culturas testes, em triplicatas e em frascos *erlenmeyers* de 50 mL com inóculos na concentração de 1×10^6 células.mL⁻¹ após 48h de crescimento. Fimdo esse período, as culturas foram submetidas, imediata e separadamente, a diferentes concentrações de OxF (0 a 0,5 $\mu\text{g.L}^{-1}$) e BaP (0 a 5 $\mu\text{g L}^{-1}$) e em seguida monitoradas com relação à liberação de H_2O_2 . Alíquotas representativas de 980 μL foram retiradas de cada concentração, a cada 5 min, durante um período de 120 min e, em seguida,

misturadas com 10 µL solução A e 10 µL de solução B em uma microplaca e submetidas ao luminômetro.

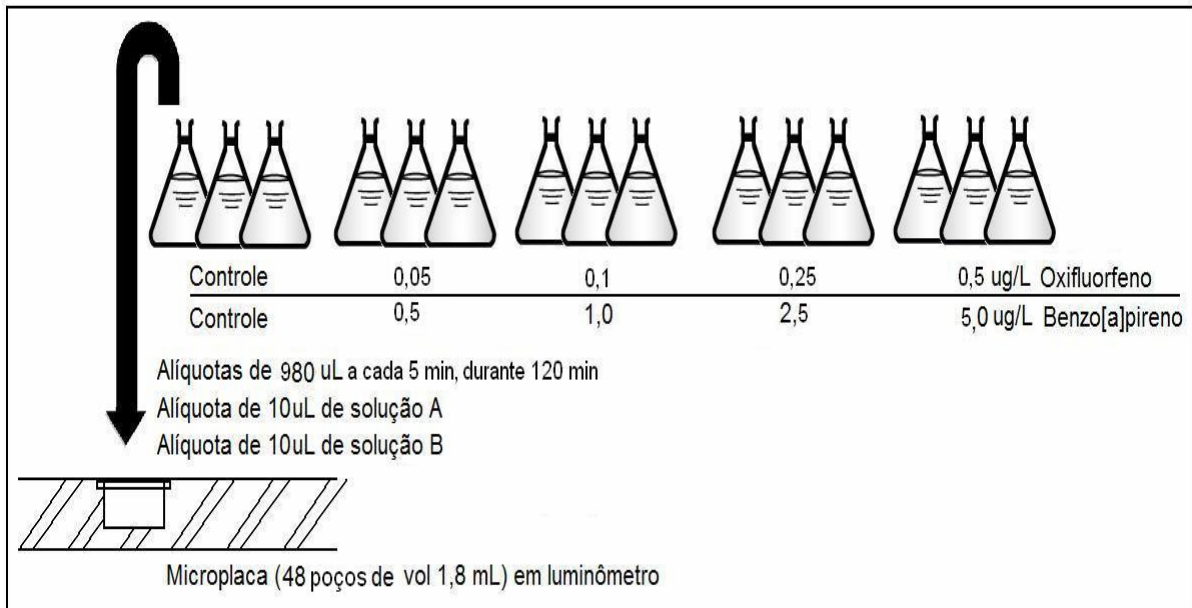


Figura 20 – Desenho experimental do ensaio para avaliar os níveis de liberação de H₂O₂ (método do luminol em luminômetro) no meio de cultura de diatomáceas *M. polymorphus* expostas ao OxF (0; 0,05; 0,1; 0,25 e 0,5 µg.L⁻¹) e ao BaP (0; 0,1; 0,5; 1,0 e 5,0 µg.L⁻¹) durante 120 min.

3.4.1.3 Preparação da curva de calibração

A construção da curva de calibração foi feita nas mesmas condições experimentais. Ou seja, utilizou-se 980 µL de uma solução de H₂O₂ nas concentrações (0, 5,0; 10,0; 25,0; 50,0 e 100,0 nM) e misturou-se em seguida com a solução A e B, sendo posteriormente submetidas ao luminômetro.

3.4.2 Quantificação de proteínas

Para determinação de proteínas totais³³⁷ em extratos de *M. polymorphus* (n=3, com 3 repetições por réplica), foi usado o método *Bradford* que utiliza o reagente de *Coomassie* e albumina, cuja absorvidade máxima após reação com o cromóforo, ocorre em 595 nm. Para curva de calibração, utilizaram-se cinco alíquotas de albumina de soro bovino (20-100 µL, 0,10 mg.mL⁻¹) em triplicatas, 200

μL de reagente de *Bradford* e água desionizada para completar 1,0 mL. Após 5 min de ensaio procedeu-se a leitura em espectrofotômetro. A determinação de proteína nos homogenatos foi realizada a partir de 5 μL de homogenato, 795 μL de água e 200 μL do reagente de *Bradford*, considerando um fator de diluição de 200X.

3.5 Análise estatística

Dentro do delineamento experimental que constitui o presente trabalho, a avaliação estatística dos resultados foi realizada empregando-se o teste *t*-Student bilateral para comparação entre médias amostrais independentes quando expostas a um tipo de poluente (OxF ou BaP). E para efeito comparativo entre grupos com diferentes tratamentos (OxF e BaP) utilizou-se de análise de variância a um critério de classificação (*one way ANOVA*), considerando um nível de significância de 5% ($p < 0,05$).³³⁸

3.6 Ensaio com *K. alvarezii*

Tendo em vista a necessidade de grande quantidade de massa (>50 g), os protocolos de caracterização de CYP450 em extratos microssomais de microalgas diatomáceas, mostraram-se inviáveis. No entanto, pela importância da informação no contexto geral do presente trabalho, optou-se pela realização de um experimento paralelo e adicional para padronização da técnica de isolamento de microssomos, utilizando amostras da macro alga de *K. alvarezii*. Amostras essas que foram gentilmente cedidas pelo Prof. Ricardo Toledo de Lima Pereira, responsável pelo setor de algas marinhas do Instituto de Pesca do Estado de São Paulo em Ubatuba e pelo Prof. Eurico Cabral de Oliveira Filho do Instituto de Biociências da USP - São Paulo.

a) Equipamentos utilizados

- Espectrofotômetro duplo feixe U3000 com banho termostático – Hitachi;
- Sistema de purificação de água MilliQ – MilliPore;
- Centrifuga RC-5B, rotor GSA e tubos com vol. 250 mL – Sorval;
- Ultracentrífuga Himac CP85β, rotor P50A2-1077 e tubos com vol 80 mL - Hitachi
- Triturador mecânico portátil – Tissue Terror.

b) Reagentes utilizados

- Os reagentes a seguir foram utilizados sem purificação prévia. $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, KH_2PO_4 , K_2HPO_4 , glicerol, NaOH em lentilhas, ácido clorídrico 37%, todos P.A. da Merck. Ditionito de sódio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$), Ácido etilenodiaminotetraacético (EDTA), ácido ascórbico, ditioeritritol (DTE), polivinilpirrolidona (PVP), amberlite XAD-4, fluoreto de fenilmetilsulfonila (PMSF), da Sigma-Aldrich. Um cilindro de 1m^3 de monóxido de carbono ultra-puro da White Martins.

c) Materiais utilizados

- Cubetas em quartzo para espectrofotometria (vol. 0,5 mL) – Hellma;
- Tela de nylon 50 μm - Millipore
- Tubos *ependorf* (1 e 2 mL), provetas (100, 250 e 500 mL), *bekers* (vários volumes), micropipetas (10, 100, 1000 e 5000 μL), ponteiros, espátulas, luvas de látex, tesoura cirúrgica, almofariz, *etc.*

3.6.1 Extração e obtenção da fração microssomal

O método a seguir foi adaptado do método descrito por Pflugmacher para obtenção de fração microssomal em Chlorophyta.³⁰⁴

a) 1ª. etapa – Extração: Inicialmente 100g massa de material biológico fresco em triplicata foi pré-triturado manualmente em um almofariz com o auxílio de uma tesoura cirúrgica. Sendo então transferido para um *beker* com 100 mL de tampão fosfato de sódio 0,1 M pH 6,5 contendo: 20% (w/v) de glicerol, 1,4 mM de DTE, 20 mM de ácido ascórbico, 1% PVP, 1mM de EDTA e 1 mM PMSF (Solução A). Após, procedeu-se a trituração mecânica a 30000 rpm a 4°C durante 10 min.

Para uma maior eficiência na extração, o material triturado ficou sob agitação lenta, na mesma solução A, durante 15 min. (Fig. 21A) Em seguida, os *debris* celulares do extrato foram removidos por centrifugação 10000 rpm a 4°C durante 20 min. O sobrenadante foi transferido para um *beker* previamente gelado e com a resina Amberlite XAD-4 10% (w/w) que, sob agitação durante 20 min, possibilitou a remoção dos compostos fenólicos. Uma filtração prévia do sobrenadante, em tela de *Nylon*, foi feita para retirar a resina.

b) 2ª. etapa – Fração microssomal: O filtrado teve seu pH ajustado para 7,0 e em seguida submetido a uma ultracentrifugação a 120000 g a 4°C durante 80 min. O sobrenadante foi dispensado e o *pellet* definido como a fração microssomal (Fig. 21B). Em seguida o *pellet* foi lavado 2X com tampão fosfato 20 mM pH 7,0 contendo: glicerol 20% e DTE 1,4 mM (solução B). Após isso, o *pellet* foi ressuspenso na própria Solução B em um volume final de 1000 μ L devendo conter de 1 a 2 mg.prot.mL⁻¹.

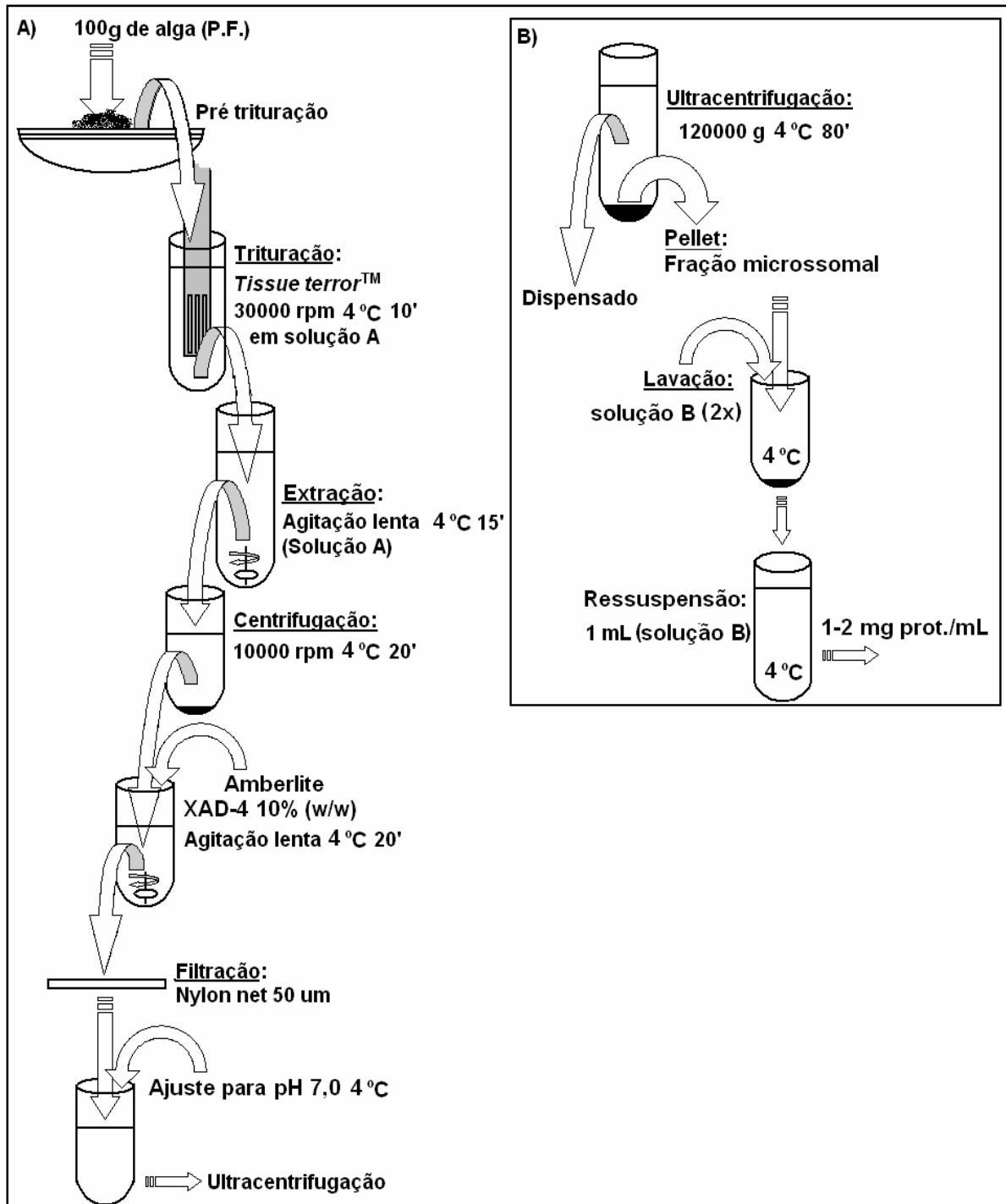


Figura 21 – Esquema ilustrativo do protocolo de obtenção da fração microsomal em *K. alvarezii*. A) Primeira etapa - extração e B) Segunda etapa – Fração microsomal.

3.6.2 Caracterização e quantificação de CYP450³³⁹

A determinação do espectro CYP450 em *K. alvarezii* foi conduzida em um espectrofotômetro utilizando-se cubetas de 500 μ L de volume (em triplicatas).

Tanto na cubeta referência como na cubeta amostra, foi adicionada 250 μL da suspensão microssomal e em seguida 100 μL de uma solução 500 mM de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$. A medida do espectro de CYP450 foi feita após a saturação, somente da amostra, com monóxido de carbono que foi borbulhado cuidadosamente sob a capela ligada e fechada durante 2 min. O espectro de CYP450 foi medido em uma varredura de 400 a 500 nm a 20 °C ($\epsilon_{450} = 91000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$). O cálculo da concentração de CYP450 foi feito dividindo-se o valor da absorbância pelo coeficiente de extinção molar e, o resultado, dividido pela concentração de proteína encontrada na fração microssomal.

4. RESULTADOS

4.1 Culturas

Inicialmente as culturas da diatomácea *M. polymorphus* apresentaram problemas no desenvolvimento formando, ao longo do período de crescimento, pequenos grumos que se depositavam no fundo do frasco de cultura. Além disso, nessas condições, μ foi reduzida à metade e as culturas entravam em declínio em poucos dias. Após a preparação de novos meios de cultura *f/2* e da chegada de um novo lote de amostras de água do mar, as culturas foram re-iniciadas. Assim, observado esses critérios, os inóculos tiveram um bom desenvolvimento, com células apresentando a morfologia penatulada característica com um eixo apical cerca de três vezes maior que o eixo transapical (aprox. 15 X 5 μ m). Apresentando assim, μ médio de 0,45 células.dia⁻¹, durante a fase exponencial (entre o 1º. E 5º. dias), em água do mar esterilizada com salinidade 32‰ e enriquecida com meio *f/2* em pH 7,8.³²⁴

As amostras da alga vermelha *K. alvarezii* foram mantidas durante oito semanas em condições controladas no laboratório. Na primeira semana, quando trazidas do cultivo nas dependências do Núcleo de Pesquisa do Instituto de Pesca do Litoral Norte em Ubatuba, SP as algas apresentaram um embranquecimento dos talos. No entanto, após o acréscimo de meio *von Stoch* a 50% na água do mar, as amostras mantiveram-se em bom estado durante o período de adaptação até o momento dos ensaios.

Tendo em vista o histórico e a tradição do laboratório do Dr. Pio Colepico na pesquisa com micro e macro algas associado a excelência em equipamentos e apoio técnico, o domínio dos detalhes do cultivo e manutenção das culturas da microalga *M. polymorphus* e *K. alvarezii* foi gradativo, transcorrendo sem maiores problemas.

4.2 curva de crescimento

4.2.1 Estudo da fluorescência *in vivo*

O acompanhamento do aumento da população de células a partir de inóculos de *M. polymorphus* foi feito segundo o monitoramento *in vivo* da fluorescência da clorofila.³²² Os resultados do espectro de excitação em 1 mL de cultura de algas mostraram uma banda característica da clorofila em 440 nm (Fig. 22A), cujo espectro de emissão em 680 nm é bem evidenciado, podendo portanto, ser monitorado (Fig. 22B). Além disso, não foi registrada nenhuma interferência do meio de cultura e dos agentes OxF e BaP nos respectivos λ_{ex} e λ_{em} da clorofila. (vide tabela 0,1 e 0,2 respectivamente)

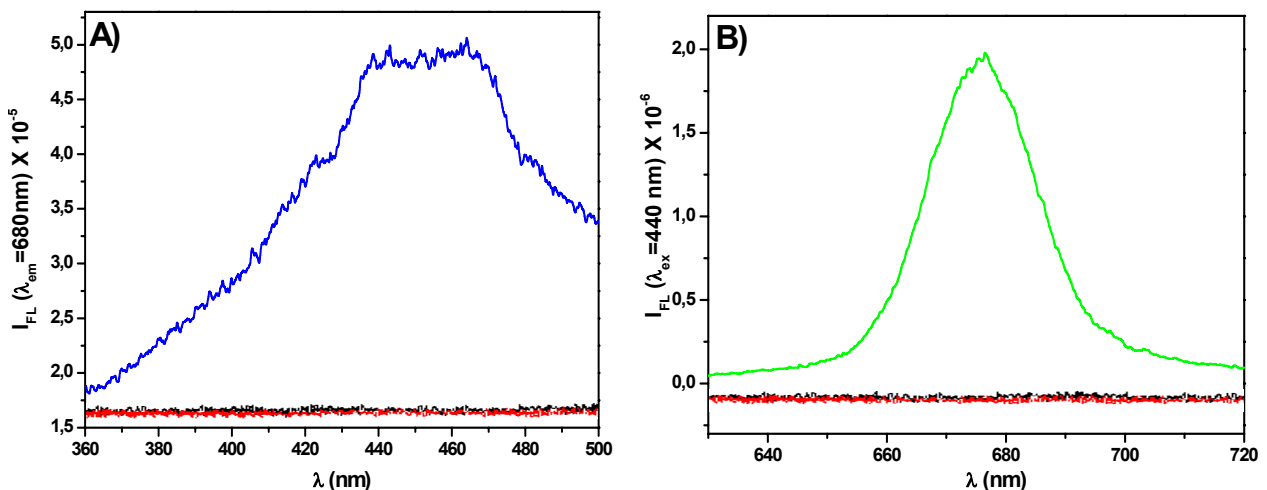


Fig.22 – A) Em azul, o espectro de excitação ($\lambda_{em}= 680$ nm) e B) Em verde, o espectro de emissão ($\lambda_{ex}= 440$ nm) *in vivo* da clorofila, em uma cultura de *M. polymorphus*. (I_{FL}) Intensidade de fluorescência; (λ) *Scan* de excitação (A) e de emissão (B). Em vermelho e preto, sobreposição dos espectros de excitação (A) e emissão (B) para soluções, em meio de cultura, de OxF e BaP ($1,0 \mu\text{g.L}^{-1}$) respectivamente.

4.2.2 Monitoramento do crescimento das culturas

Culturas em triplicatas de *M. polymorphus*, inoculadas com uma concentração de 1×10^6 células.mL⁻¹ foram monitoradas através da fluorescência da clorofila (680 nm) durante 30 dias (Tab. 3a). A variação de pH no meio de cultura

também foi acompanhado durante o desenvolvimento. Ao término desse experimento, construiu-se o perfil da curva de crescimento (Fig. 23). Paralelamente, nas mesmas condições de desenvolvimento e, sob o mesmo período de tempo, foram coletados os dados do crescimento por contagem ao microscópio (Tab. 3b).

Tabela 3a – Resultados obtidos a partir da integração dos espectros de fluorescência *in vivo* de culturas de *M. polymorphus* (n= 3) durante 30 dias.

Tempo (d)	A1 _{FL} (U.A.)	A2 _{FL} (U.A.)	A3 _{FL} (U.A.)	pH
0	5,29333E4	5,61148E4	5,67458E4	7,8 ± 0,03
1	1,50718E5	1,66945E5	1,57867E5	7,9 ± 0,02
2	5,41667E5	5,97307E5	5,22301E5	8,0 ± 0,05
3	1,73307E6	1,74746E6	1,86873E6	8,2 ± 0,03
4	3,33445E6	3,47595E6	3,17851E6	8,5 ± 0,1
5	4,17714E6	4,27481E6	3,95296E6	8,8 ± 0,2
6	5,66E6	5,49775E6	5,91223E6	
7	6,15111E6	6,61172E6	6,32251E6	
8	5,014E6	5,25726E6	5,55957E6	
9	5,18667E6	5,78147E6	5,78147E6	
10	--	--	--	8,8 ± 0,6
11	--	--	--	
12	5,58722E6	5,49775E6	5,84648E6	
13	4,2177E6	4,04236E6	4,22727E6	
14	5,77833E6	6,11393E6	6,04594E6	
15	--	--	--	9,1 ± 0,4
16	--	--	--	
17	--	--	--	
18	--	--	--	
19	--	--	--	
20	3,58389E6	3,51504E6	3,71717E6	8,9 ± 0,6
21	--	--	--	
22	--	--	--	
23	--	--	--	
24	--	--	--	
25	--	--	--	9,2 ± 0,7
26	--	--	--	
27	3,65667E6	3,909E6	4,04236E6	
28	--	--	--	
29	--	--	--	
30	--	--	--	9,5 ± 0,5

Nota: A1 a A3 – Integral dos picos de fluorescência ($\lambda_{em}=680$ nm)

Tabela 3b - Resultados obtidos a partir da contagem de células de culturas de *M. polymorphus* (n= 3) ao microscópio de luz durante 30 dias.

Tempo (d)	N°. células	N°. células	N°. células
0	122000	94300	96300
1	--	--	--
2	--	--	--
3	2,48E6	2,03E6	2,4E6
4	--	--	--
5	--	--	--
6	--	--	--
7	9,66E6	8,72E6	9,46E6
8	--	--	--
9	--	--	--
10	8,78E6	8,48E6	7,22E6
11	--	--	--
12	--	--	--
13	--	--	--
14	1,16E7	6,51E6	1,21E7
15			
16			
17	9,76E6	8,54E6	9,08E6
18	--	--	--
19	--	--	--
20	--	--	--
21	1,19E7	1,39E7	9,6E6
22	--	--	--
23	--	--	--
24	9,12E6	1,03E7	1,08E7
25	--	--	--
26	--	--	--
27	--	--	--
28	--	--	--
29	--	--	--
30	--	--	--

4.2.3 Ajuste dos pontos a uma equação de desenvolvimento exponencial

Os pontos obtidos por fluorescência e por contagem foram ajustados através uma equação de crescimento exponencial (Função de *Boltzmann*) (Eq. 2), fazendo

com que os resultados, para ambas as metodologias, apontem para um período de desenvolvimento exponencial entre 0 a 5 dias.

Equação 2 – Equação de Crescimento Exponencial

$$y = \frac{A_1 - A_2}{1 + e^{-(x-x_0)/dx}} + A_2$$

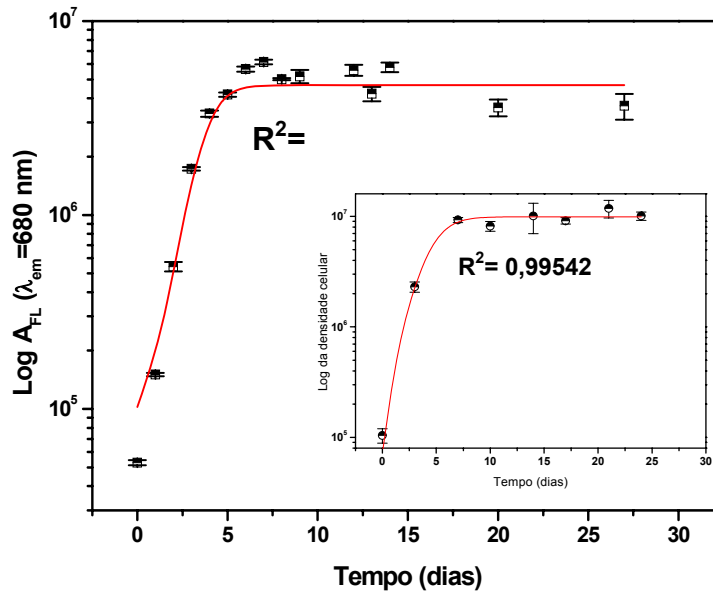


Fig.23 – Curva de crescimento da cultura de *M. polymorphus* (n= 3, com 3 repetições por réplica) com base na área integrada de fluorescência (Log A_{FL}) (λ_{em}= 680 nm) da clorofila. A cultura foi monitorada durante 30 dias e iniciada com 1X10⁶ células.mL⁻¹. No detalhe, uma comparação com uma curva de crescimento sob as mesmas condições com base em contagem no microscópio óptico. Em vermelho, em ambas as curvas, um ajuste dos pontos com uma equação de crescimento exponencial (Eq. 2) com X_{0(fl)} e X_{0(cont)}= 3,5 dias. x₀= Tempo necessário para aumentar em 50% a população de algas como base nos ensaios por fluorescência *in vivo* (X_{0(fl)}) e por contagem celular ao microscópio (X_{0(cont)}). A₁ e A₂= valores máximos e mínimos respectivamente e d_x= inclinação da curva.

4.3 Determinação do IC₅₀

4.3.1 Coleta e tratamento dos dados

As culturas de células de *M. polymorphus* cultivadas em *erlenmeyer* de 100 mL foram submetidas distintamente aos ensaios de toxicidade para OxF e para BaP. Os dados apontam a IC₅₀ com base na %inib.μ (Tab.4a e b respectivamente).

Tabela 4a – Resultados obtidos a partir da integração dos espectros de fluorescência *in vivo* de culturas de *M. polymorphus* (n= 3, com 3 repetições por réplica) expostas ao OxF durante 48h.

Oxifluoreno (μgL^{-1})	FL _{Basal} (U.A.)	FL ₄₈ (U.A.)	μ (células.dia ⁻¹)	μ_{Nor} (μ/μ_{max})	Inib. μ (1- μ_{Nor})	%Inib. μ \pm D.P.
Controle (0)	60458,00	133000,00	0,394200	1,00000	0	0
0,05	59786,00	124159,73	0,365399	0,92694	0,07494	7,5 \pm 1
0,1	61354,00	115445,05	0,316067	0,80179	0,19983	20 \pm 3
0,15	58146,00	106217,63	0,301267	0,76425	0,2373	24 \pm 7
0,2	59315,00	92438,36	0,221840	0,56276	0,43838	44 \pm 5
0,25	60347,00	87338,53	0,184840	0,46890	0,53205	53 \pm 5
0,3	61012,00	76465,88	0,112887	0,28637	0,71421	71 \pm 2
0,5	58934,00	60825,57	0,015796	0,04007	0,96001	96 \pm 4
1,0	59765,00	60011,02	0,002054	0,00521	0,9948	99 \pm 7

Legenda: (FL_{Basal}) – Área dos espectros de fluorescência de culturas iniciadas com 1X10⁶ células.mL⁻¹ no dia zero; (FL₄₈) – Área do espectro de fluorescência após 48h de exposição; (μ) – Taxa de crescimento celular diário após 48h; (μ_{Nor}) – Todos os valores de μ foram normalizados pelo μ da cultura controle, ou seja, pelo μ_{max} ; (%Inib. μ) – Inibição de μ em relação às concentrações crescentes do OxF.

Tabela 4b - Resultados obtidos a partir da integração dos espectros de fluorescência *in vivo* de culturas de *M. polymorphus* (n= 3, com 3 repetições por réplica) expostas ao BaP durante 48h.

Benzo[a]pireno (μgL^{-1})	FL _{Basal} (U.A.)	FL ₄₈ (U.A.)	μ (células.dia ⁻¹)	μ_{Nor} (μ/μ_{max})	Inib. μ (1- μ_{Nor})	%Inib. μ \pm D.P.
Controle (0)	59271,00	153921,99	0,477163	1,00000	0	0
0,01	58635,00	144833,40	0,452126	0,94753	0,05247	5 \pm 2
0,1	61342,00	144031,62	0,426784	0,89442	0,10558	11 \pm 5
0,25	59874,00	136461,84	0,411901	0,86323	0,13677	14 \pm 2
0,5	63214,00	136049,83	0,383248	0,80318	0,19682	20 \pm 1
1,0	59135,00	99427,10	0,259801	0,54447	0,45553	46 \pm 2
2,5	58364,00	72631,05	0,109347	0,22916	0,77084	77 \pm 3
5,0	60248,00	78442,00	0,131945	0,27652	0,72348	72 \pm 5
10,0	59897,00	70000,08	0,077935	0,16333	0,83667	84 \pm 1

Legenda: (FL_{Basal}) – Área dos espectros de fluorescência de culturas iniciadas com 1X10⁶ células.mL⁻¹ no dia zero; (FL₄₈) – Área do espectro de fluorescência após 48h de exposição; (μ) – Taxa de crescimento celular diário após 48h; (μ_{Nor}) – Todos os valores de μ foram normalizados pelo μ da cultura controle, ou seja, pelo μ_{max} ; (%Inib. μ) – Inibição de μ em relação às concentrações crescentes do BaP.

4.3.2 Ajuste dos pontos a uma equação dose-resposta

Os pontos obtidos ao longo do período de exposição, para ambos os tratamentos, foram ajustados com uma equação dose-resposta (Função Logística). (Eq. 3) Assim, foram obtidos como resultados, a concentração de 0,24 $\mu\text{g.L}^{-1}$, para o herbicida oxifluorfenol ($\text{IC}_{50} = 0,24 \mu\text{g.L}^{-1}$) (Fig. 24A) e 0,99 $\mu\text{g.L}^{-1}$ para o HPA Benzo[a]pireno ($\text{IC}_{50} = 0,99 \mu\text{g.L}^{-1}$) (Fig. 24B), suficientes para inibir 50% de μ . Testes paralelos através do protocolo de contagem celular em culturas submetidas ao IC_{50} tanto de OxF com de BaP, mostraram valores de inibição de μ próximos a 50%. Além disso, não houve nenhuma diferença estatística nas taxas de desenvolvimento das culturas controles com 0% e 0,01% de metanol respectivamente.

Equação 3 – Equação dose - resposta

$$y = \frac{A_1 - A_2}{1 + (x/x_0)^p} + A_2$$

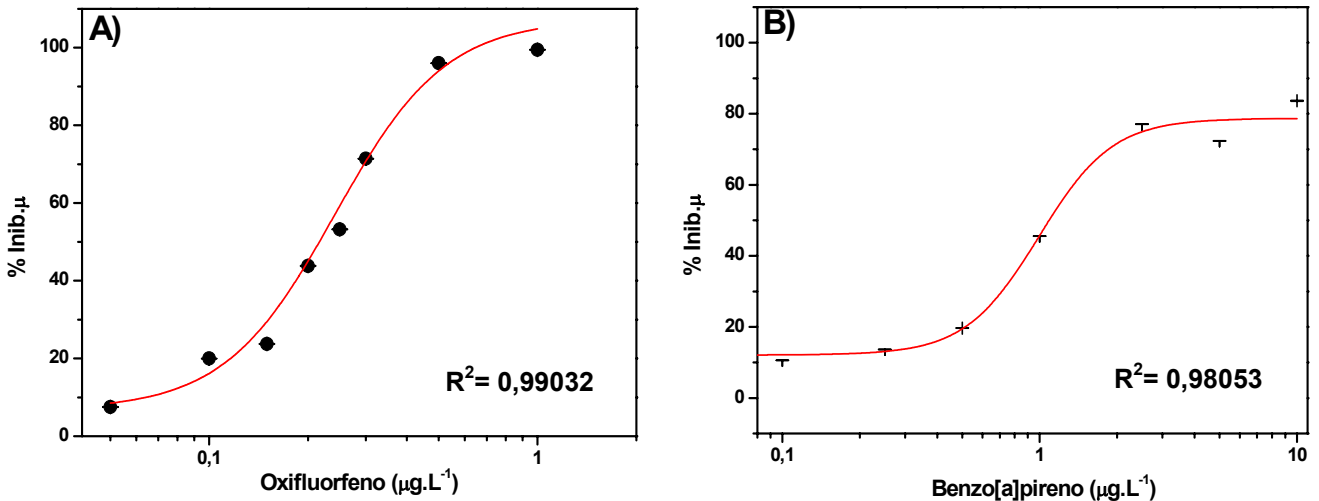


Figura 24 – Curva dose-resposta (n= 3, com 3 repetições por réplica) para os ensaios de toxicidade com OxF ($\text{IC}_{50} = 0,24 \mu\text{g.L}^{-1}$) e BaP ($\text{IC}_{50} = 0,99 \mu\text{g.L}^{-1}$) em 48h de exposição. Em vermelho, em ambas as curvas, um ajuste dos pontos com uma equação dose-resposta (Eq. 3) com $X_{0(\text{oxifluorfenol})} = 0,24 \mu\text{g.L}^{-1}$ e $X_{0(\text{benzo[a]pireno})} = 0,99 \mu\text{g.L}^{-1}$ e $R^2 = 0,99$ e $0,98$ para ambos os tratamentos respectivamente. X_0 = Concentração necessária para inibir em 50% de μ . A_1 e A_2 = valores máximos e mínimos respectivamente e P = inclinação da curva.

4.4 Enzimas antioxidantes

Culturas de *M. polymorphus* em triplicatas foram expostas separadamente durante a fase exponencial, a uma concentração (IC_{50}) de OxF e BaP durante 48h e, logo depois, submetidas às análises de atividade das enzimas antioxidantes. Não foi encontrada nenhuma diferença significativa nas atividades das amostras controles com e sem metanol. Assim, foram chamadas apenas de controle.

4.4.1 Catalase

Valores da atividade CAT nos extratos de culturas de algas sob o tratamento com OxF, ao serem comparados com valores dos extratos da cultura controle, mostram um aumento de 80% na atividade de CAT ($6,5 \pm 0,7$ e $3,9 \pm 0,5$ U.mg prot⁻¹, respectivamente) (Fig. 25A). Os extratos de culturas expostas ao BaP mostram um aumento de cerca de 10 vezes na atividade de CAT quando comparadas ao grupo controle ($35,7 \pm 1,3$ e $4,0 \pm 0,9$ U.mg prot⁻¹, respectivamente) (Fig. 25B).

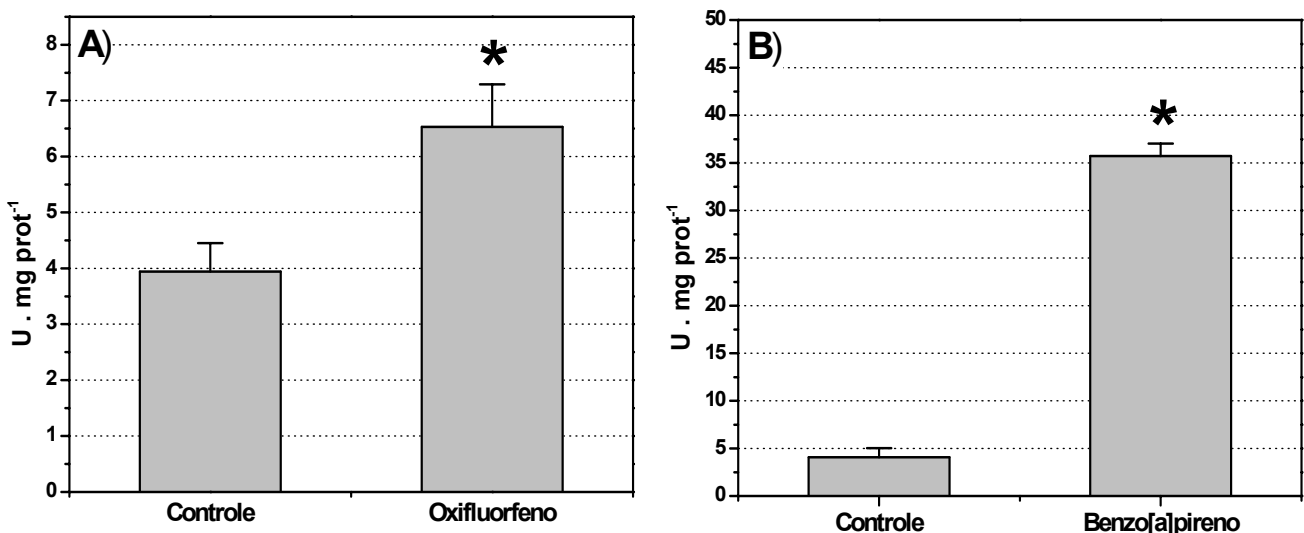


Figura 25 – A atividade de CAT (U.mg prot⁻¹) em extratos de cultura de microalga *M. polymorphus* com 48h de exposição ao OxF (IC_{50} 0,24 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) (A) e ao BaP (IC_{50} 0,99 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) (B). Para todos os tratamentos e controles n=3 (com 3 repetições por réplica). (*) Indica diferença significativa ($P < 0,05$) entre o controle e amostra para um mesmo tratamento.

4.4.2 Glutationa peroxidase

O grupo tratado com o OxF ($0,06 \pm 0,02$ U.mg prot⁻¹) comparado ao grupo controle ($0,06 \pm 0,02$ U.mg prot⁻¹), não teve variação estatisticamente significativa na atividade de GPx. O mesmo ocorrendo com os extratos de cultura expostas ao BaP quando comparadas aos extratos de controle ($0,08 \pm 0,03$ e $0,07 \pm 0,02$ U.mg prot⁻¹ respectivamente) (Fig. 26 A e B).

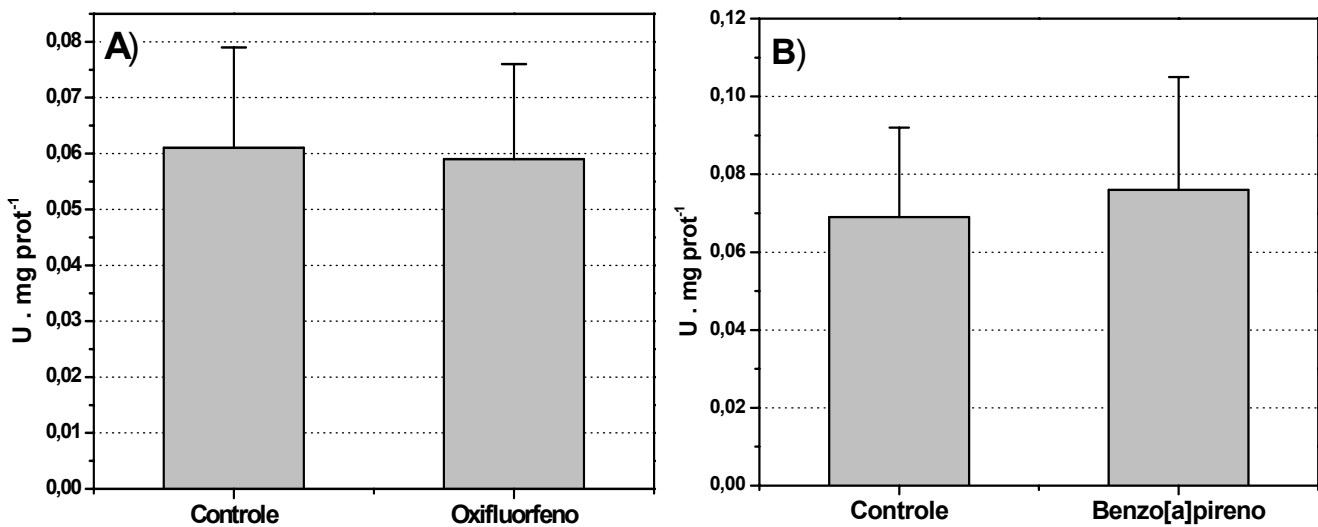


Figura 26 – A atividade de GPx (U.mg prot⁻¹) em extratos de cultura de microalga *M. polymorphus* com 48h de exposição ao OxF (IC₅₀ 0,24 µg.mL⁻¹) (A) e ao BaP (IC₅₀ 0,99 µg.mL⁻¹) (B). Para todos os tratamentos e controles n=3 (com 3 repetições por réplica).

4.4.3 Glutationa redutase

Os extratos de culturas tratadas com o OxF apresentaram uma atividade para GR 50% menor do que os valores encontrados nos extratos grupo controle ($0,42 \pm 0,02$ e $0,78 \pm 0,07$ U.mg prot⁻¹, respectivamente). Contrariamente, os extratos de culturas de algas expostas ao BaP, ao serem comparados com o grupo controle, não apresentaram variação, nos níveis de atividade enzimática de GR, estatisticamente significativa ($0,89 \pm 0,08$ e $0,84 \pm 0,05$ U.mg prot⁻¹, respectivamente) (Fig. 27 A e B).

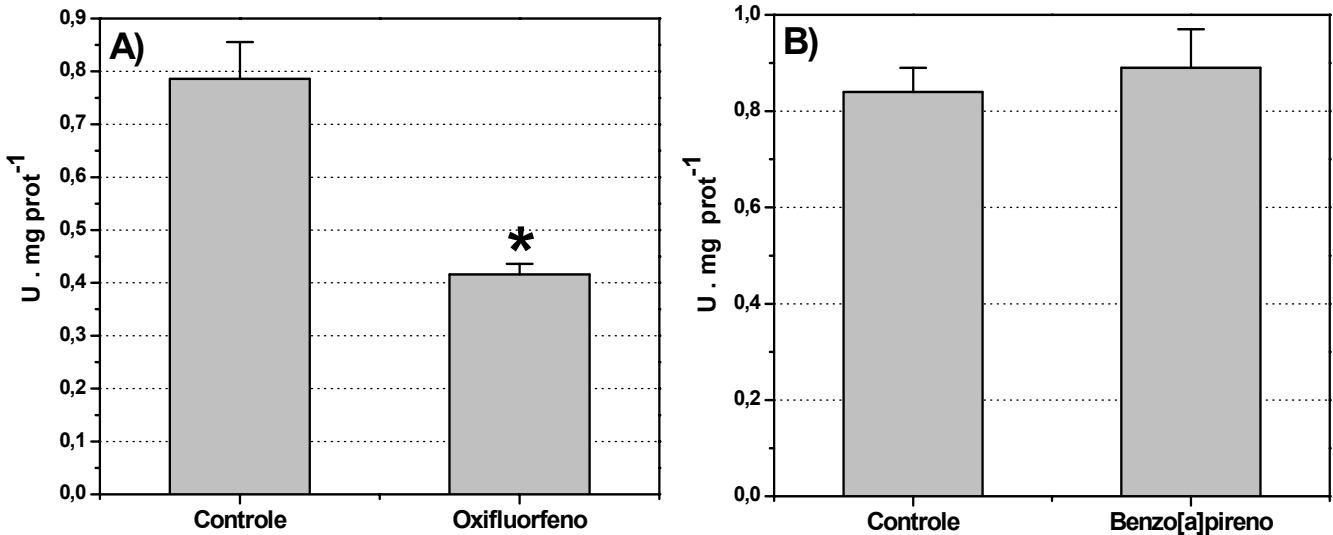


Figura 27 – A atividade de GR (U.mg prot⁻¹) em extratos de cultura de microalga *M. polymorphus* com 48h de exposição ao OxF (IC₅₀ 0,24 µg mL⁻¹) (A) e ao BaP (IC₅₀ 0,99 µg.mL⁻¹) (B). Para todos os tratamentos e controles n=3 (com 3 repetições por réplica). (*) Indica diferença significativa (P<0,05) entre o controle e amostra para um mesmo tratamento.

4.4.4 Ascorbato peroxidase

Os ensaios para APx em extratos de algas sob tratamento com OxF, apresentaram ténues mudanças, aproximadamente 20% (Fig. 28A), porém, estatisticamente significativas ao serem comparadas com o grupo controle (1,01 ± 0,06 e 0,82 ± 0,05 U.mg prot⁻¹ respectivamente). Contrariamente, nos extratos das culturas submetidas aos ensaios com BaP, a atividade aumentou cerca de 6 vezes quando comparadas aos extratos do grupo controle (4,95 ± 0,06 e 0,86 ± 0,03 U.mg prot⁻¹ respectivamente) (Fig. 28B).

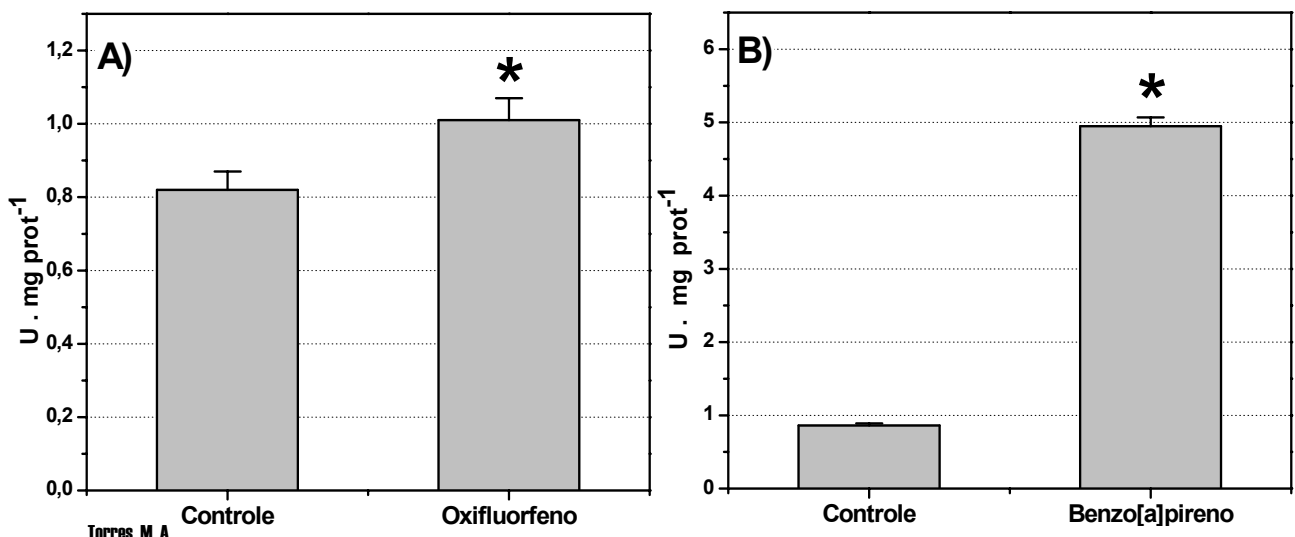


Figura 28 – A atividade de APx ($\text{U} \cdot \text{mg} \text{prot}^{-1}$) em extratos de cultura de microalga *M. polymorphus* com 48h de exposição ao OxF (IC_{50} $0,24 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) (A) e ao BaP (IC_{50} $0,99 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) (B). Para todos os tratamentos e controles $n=3$ (com 3 repetições por réplica). (*) Indica diferença significativa ($P < 0,05$) entre o controle e amostra para um mesmo tratamento.

4.4.5 Dehidroascorbato redutase

Os ensaios enzimáticos para as atividades de DHAR em extratos de culturas expostas ao OxF (Fig. 29A) apresentaram resultados 63% menores do que os valores encontrados nos extratos do grupo controle ($0,16 \pm 0,03$ e $0,43 \pm 0,08 \text{ U} \cdot \text{mg} \text{prot}^{-1}$, respectivamente). No entanto, os resultados para os extratos de culturas expostas ao BaP apresentaram valores para a atividade de DHAR estatisticamente não significativas (Fig. 29B) quando comparadas com o grupo controle ($0,44 \pm 0,05$ e $0,38 \pm 0,07 \text{ U} \cdot \text{mg} \text{prot}^{-1}$ respectivamente).

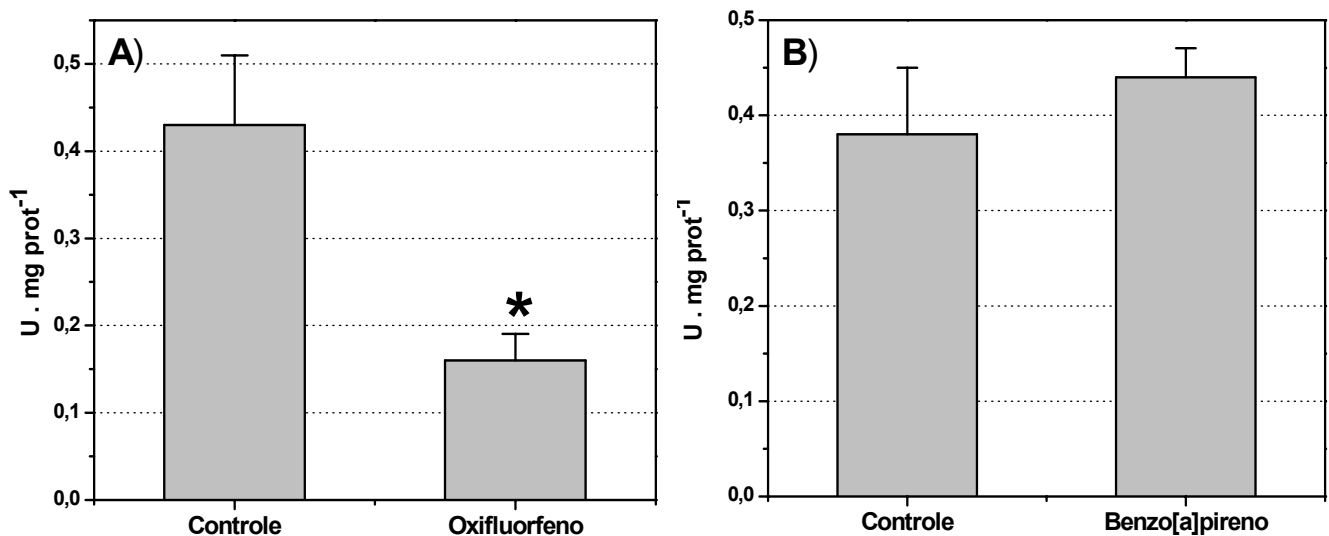


Figura 29 – A atividade de DHAR ($\text{U} \cdot \text{mg} \text{prot}^{-1}$) em extratos de cultura de microalga *M. polymorphus* com 48h de exposição ao OxF (IC_{50} $0,24 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) (A) e ao BaP (IC_{50} $0,99 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) (B). Para todos os tratamentos e controles $n=3$ (com 3 repetições por réplica). (*) Indica diferença significativa ($P < 0,05$) entre o controle e amostra para um mesmo tratamento.

4.4.6 Superóxido dismutase

As culturas de *M. polymorphus* tratadas com o OxF apresentaram valores de atividade de SOD cerca de 5 vezes maiores (153 ± 7 U SOD.mg prot⁻¹) quando comparada ao grupo controle (32 ± 6 U SOD.mg prot⁻¹). (Fig.30A) Seguindo a mesma tendência, os valores encontrados para culturas de *M. polymorphus* expostas ao BaP apresentaram valores de atividade de SOD aproximadamente 3 vezes maiores (105 ± 6 U SOD.mg prot⁻¹) quando comparadas às culturas controle (35 ± 5 U SOD.mg prot⁻¹) (Fig. 30B).

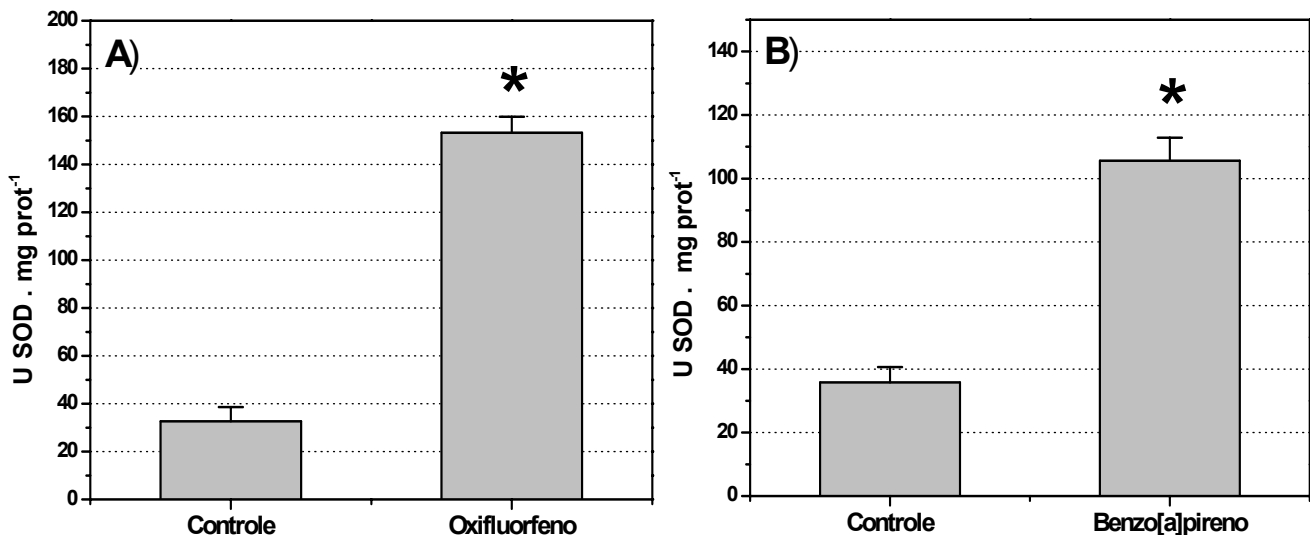


Figura 30 – A atividade de SOD (U SOD.mg prot⁻¹) em extratos de cultura de microalga *M. polymorphus* com 48h de exposição ao OxF (IC₅₀ 0,24 µg.mL⁻¹) (A) e ao BaP (IC₅₀ 0,99 µg.mL⁻¹) (B). Para todos os tratamentos e controles n=3 (com 3 repetições por réplica). (*) Indica diferença significativa (P<0,05) entre o controle e amostra para um mesmo tratamento.

4.4.7 Resumo geral

A seguir, de forma sintética, são mostrados todos os resultados encontrados para as atividades das defesas antioxidantes enzimáticas determinados em extratos de culturas de *M. polymorphus* expostas (IC₅₀) ao OxF e ao BaP durante um período de 48h (Tab. 5).

Tabela 5 – Resumo dos valores de atividade enzimática encontrados para as defesas antioxidantes em extratos de *M. polymorphus* expostas (48h) ao OxF e BaP (IC₅₀).

	Controle (OxF)	Oxifluorfenol	Controle (BaP)	Benzo[a]pireno
CAT	3,9 ± 0,5	(*)6,5 ± 0,7	4,0 ± 0,9	(*)(#)35,7 ± 1,3
GPx	0,06 ± 0,02	0,06 ± 0,02	0,07 ± 0,02	0,08 ± 0,03
GR	0,78 ± 0,07	(*)0,42 ± 0,02	0,84 ± 0,05	(#)0,89 ± 0,08
APx	0,82 ± 0,05	(*)1,01 ± 0,06	0,86 ± 0,03	(*)(#)4,95 ± 0,06
DHAR	0,43 ± 0,08	(*)0,16 ± 0,03	0,38 ± 0,07	0,44 ± 0,05
SOD	32 ± 6	(*)153 ± 7	35 ± 5	(*)(#)105 ± 6

(*) Indica diferença significativa (P<0,05) entre o controle e amostra para um mesmo tratamento. (#) Indica diferença significativa (P<0,05) entre amostras sob tratamentos diferentes.

4.5 Enzimas Biotransformação (Fase - II)

4.5.1 Glutathione s-transferase

Culturas de *M. polymorphus* em triplicatas foram expostas separadamente durante a fase exponencial, a uma concentração (IC₅₀) de 0,24 e 0,99 µg.L⁻¹ de OxF e BaP respectivamente durante 48h e, logo após, submetidas à análise da atividade de GST. As atividades de GST para os extratos das culturas tratadas com OxF (176 ± 28 U.mg prot⁻¹) e para os extratos das culturas tratadas com BaP (402 ± 67 U.mg prot⁻¹) tiveram um aumento de cerca de 2,5 e 5,5 vezes respectivamente quando comparadas com os extratos obtidos das culturas controles (73 ± 18 e 71 ± 24 U.mg prot⁻¹ respectivamente) (Fig. 31A e B).

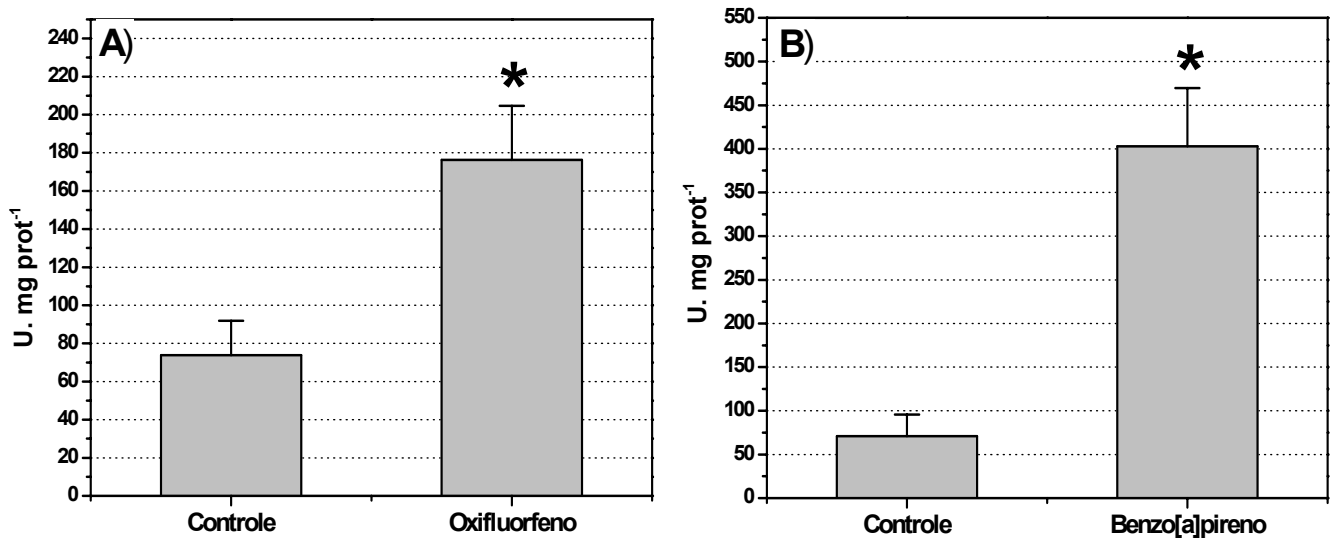


Figura 31 – A atividade de GST (U.mg prot⁻¹) em extratos de cultura de microalga *M. polymorphus* com 48h de exposição ao OxF (IC₅₀ 0,24 µg.mL⁻¹) (A) e ao BaP (IC₅₀ 0,99 µg.mL⁻¹) (B). Para todos os tratamentos e controles n=3 (com 3 repetições por réplica). (*) Indica diferença significativa (P<0,05) entre o controle e amostra para um mesmo tratamento.

4.6 Níveis de MDA – (TBA)₂

A seguir, os valores referentes à avaliação dos índices de lipoperoxidação, traduzidos na forma dos níveis do aduto MDA – (TBA)₂, encontrados em extratos de cultura de células de *M. polymorphus* sob 48h de exposição ao OxF (IC₅₀= 0,24 µg.L⁻¹) e ao BaP (IC₅₀= 0,99 µg.L⁻¹). Os resultados encontrados para os controles com e sem metanol não apresentaram diferença estatística significativa. Foram, portanto, denominados apenas de controles (C₁ – controle dos ensaios com OxF e C₂ controles dos ensaios com BaP).

4.6.1 Curva de calibração

Os resultados em triplicatas, obtidos da curva de calibração, mostraram boa correlação (R= 0,9991) entre as concentrações dos padrões do aduto MDA-TBA₂ no intervalo entre 0,15 a 3,0 µM e a integral da intensidade de fluorescência (λ_{em}= 553 nm) correspondente, obtida em HPLC (Fig. 32).

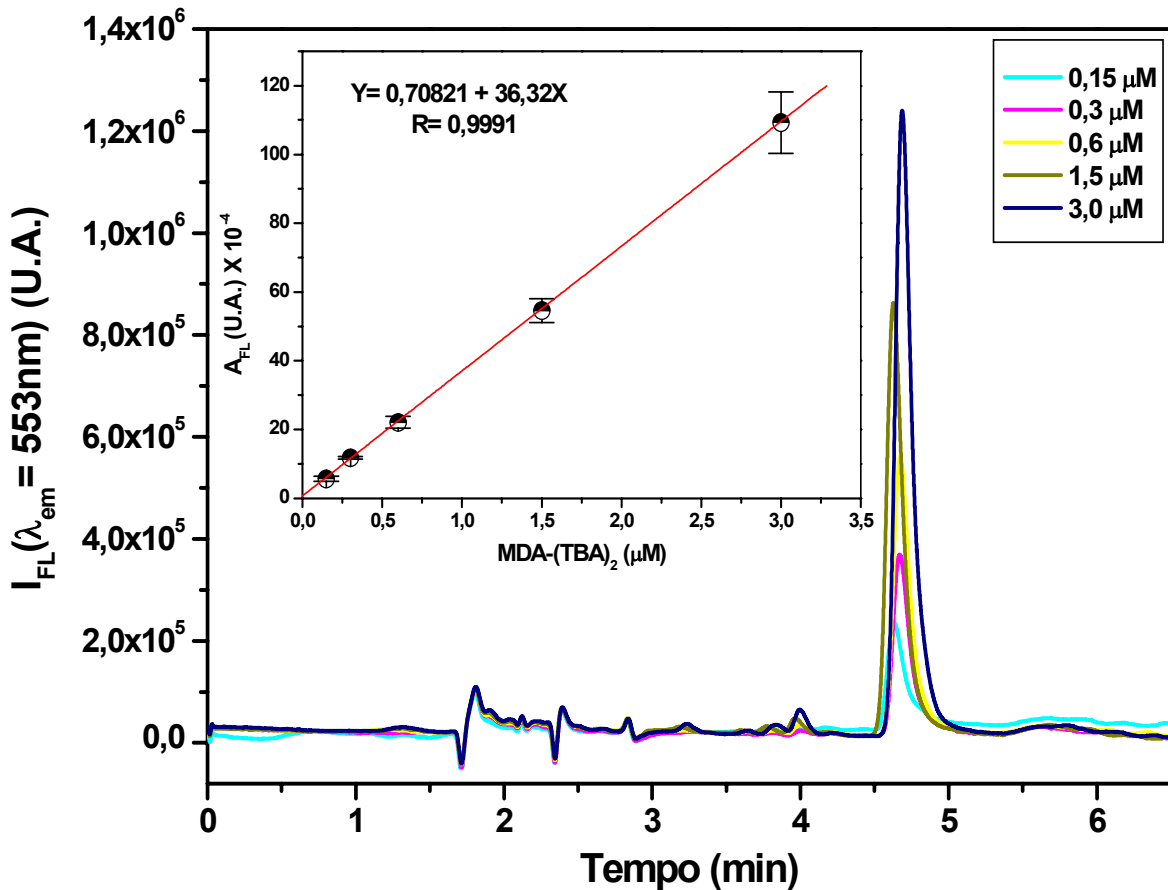


Figura 32 – Cromatogramas sobrepostos (vol. inj. 10 μL , fluxo 1,0 $mL \cdot min^{-1}$, tempo de reten. 4,6 min) dos padrões de MDA – $(TBA)_2$ obtidos com detecção de fluorescência ($\lambda_{ex} = 515$ e $\lambda_{em} = 553$ nm) em diferentes concentrações (0,15; 0,3; 0,6; 1,5; 3,0 μM). No detalhe, a correlação linear ($R = 0,9991$) entre as concentrações da curva e a integral da fluorescência (A_{FL}).

4.6.2 Resultados obtidos nas amostras

Os resultados para MDA – $(TBA)_2$ obtidos de extratos de algas *M. polymorphus* com protocolos de extração em metanol, forneceram cromatogramas com boa definição (Fig. 33). Valores relacionados aos níveis de MDA – $(TBA)_2$, encontrados nas culturas submetidas ao ensaio com o OxF, apresentaram, incidência do aduto cerca de 9 vezes mais do que nas culturas controle (C_1) (689 ± 77 e 73 ± 9 nM respectivamente). Por sua vez, os ensaios com o BaP resultaram em valores de MDA – $(TBA)_2$ cerca de 5 vezes mais elevados nos grupos tratados

quando comparados às amostras do grupo controle (C₂) (347 ± 65 e 68 ± 11 nM respectivamente) (Fig. 33 detalhe).

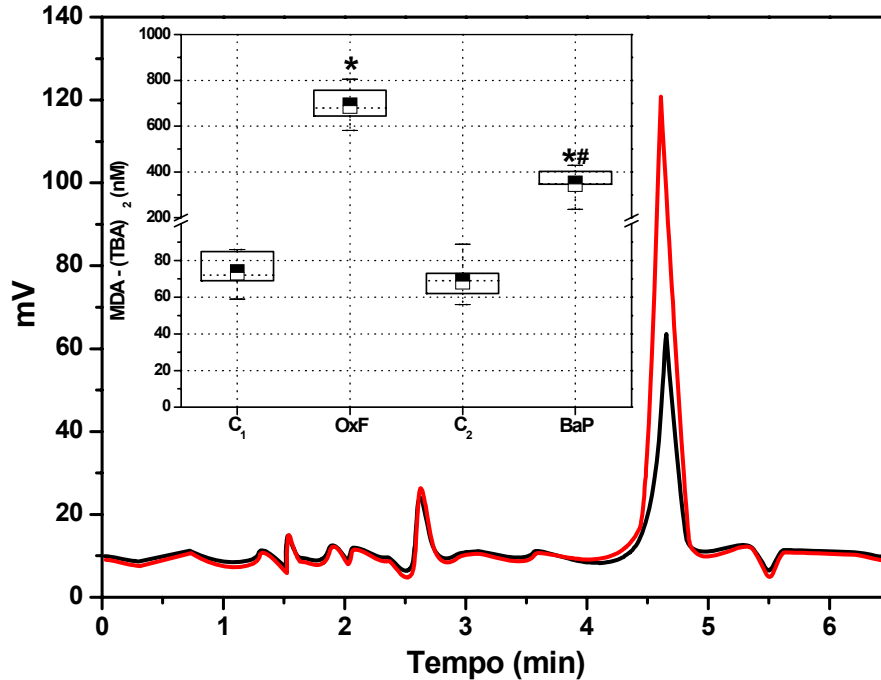


Figura. 33 – Em preto, um cromatograma de uma amostra de extrato de *M. polymorphus* e, em vermelho, a mesma amostra *spiked* com padrão de MDA-TBA₂ (200 nM). No detalhe, um gráfico *Box plot* dos níveis de MDA – (TBA)₂ (nM) determinados em extratos de cultura de microalga com 48h de exposição ao OxF (IC₅₀ 0,24 µg.mL⁻¹) ao BaP (IC₅₀ 0,99 µg.mL⁻¹). Todos os tratamentos e controles n=3 com 3 repetições por réplica. (*) Indica diferença significativa (P<0,05) entre o controle e amostra para um mesmo tratamento. (#) Indica diferença significativa (P<0,05) entre amostras sob tratamentos diferentes.

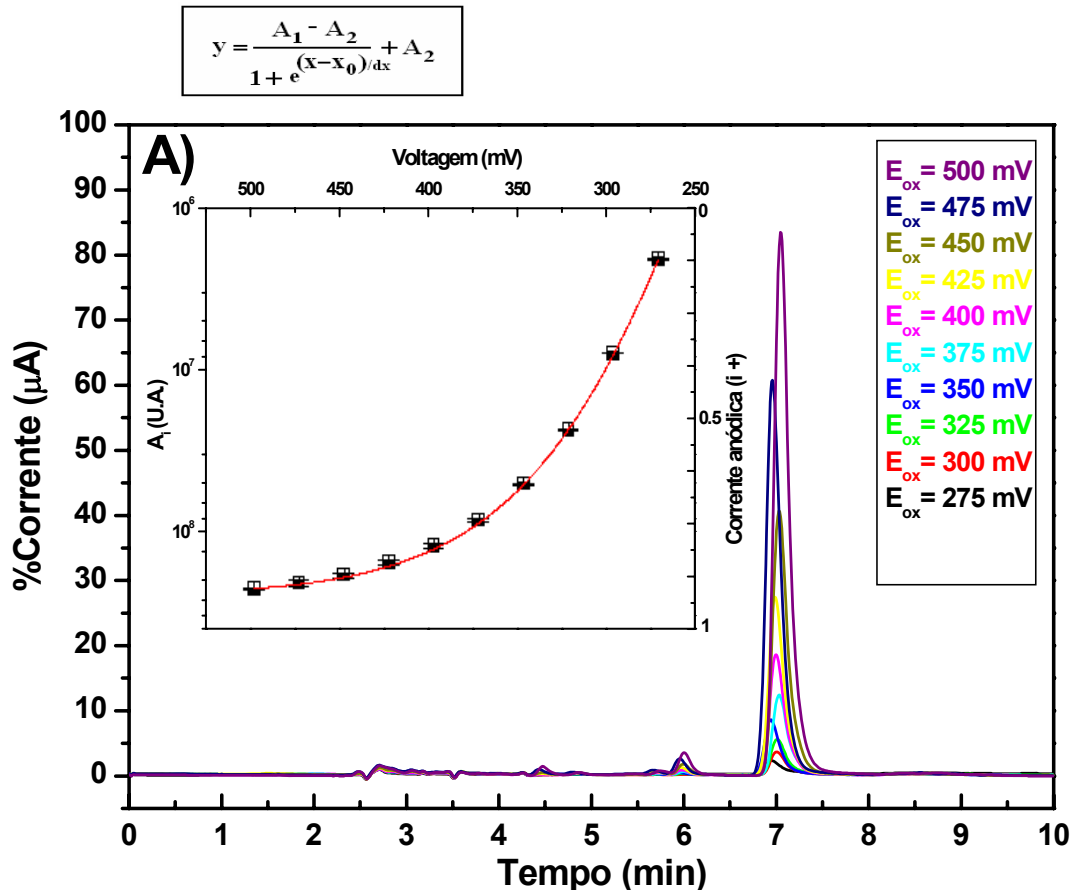
4.7 Níveis de GSH e GSSG

A seguir, os resultados referentes à avaliação dos níveis de GSH e GSSG nas de células de *M. polymorphus* em cultura e sob 48h de exposição ao OxF (IC₅₀= 0,24 µg.L⁻¹) e ao BaP (IC₅₀= 0,99 µg.L⁻¹). Os resultados encontrados para os controles com e sem metanol também não apresentaram diferenças e foram denominados apenas de controles (C₁ – controle dos ensaios com OxF e C₂ controles dos ensaios com BaP).

4.7.1 Voltamograma hidrodinâmico

Antes da avaliação, por detecção eletroquímica, dos níveis de GSH e GSSG em *M. polymorphus* expostas aos tratamentos, foi necessário fazer um estudo do potencial de oxidação dessas espécies. A elaboração de uma curva corrente-voltagem (voltamograma hidrodinâmico - HV) para as espécies GSH e GSSG foi importante, na medida em que nos forneceu informações a cerca do potencial de oxidação ideal para as duas moléculas, a saber, 550 mV para GSH e 850 mV para GSSG (Fig. 34). Após injeções em HPLC de 10 μ L (em triplicatas) de concentrações fixas de 10 μ M para os padrões GSH e GSSG e com ajustes sucessivos e crescentes dos potenciais de oxidação a cada injeção, obtivemos os pontos necessários para construção do HV. Os pontos obtidos foram ajustados com uma equação sigmoidal (Eq. 4) (Função de *Boltzmann*).

Equação 4 – Equação sigmoidal para corrente – voltagem (HV)



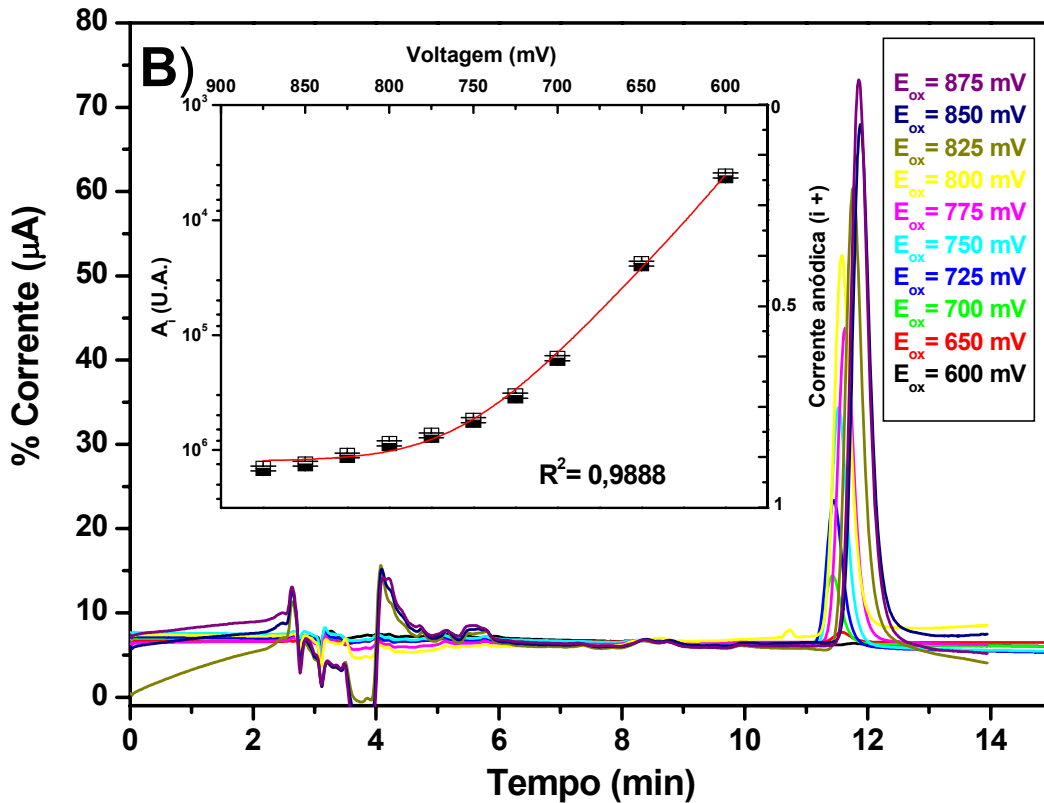


Figura. 34 – Cromatogramas sobrepostos (vol. inj. 10 µL, fluxo 0,5 mL.min⁻¹) dos padrões de 10 µM de GSH (A) e GSSG (B) (tempo de reten. 7,2 e 11,8 min respectivamente). Obtido por detecção eletroquímica em um detector coulométrico *Flow-through* segundo aumentos sucessivos dos potenciais de oxidação. No detalhe, construção da curva Corrente (A_i) - Voltagem (mV) para GSH e GSSG. Os dados foram ajustados a uma equação sigmoideal (Eq.4) gerando os pontos nos quais o potencial de oxidação fornece o máximo de corrente (i): E₁= 495 a 600 mV para GSH geram 80% da corrente máxima e E₂= 850 à 900 mV para GSSG geram 70% da corrente máxima. (A_i) Integral da corrente.

4.7.2 Curva de calibração

Os resultados em triplicatas, obtidos na curva de calibração, indicaram boa correlação (R= 0,9955 e 0,9969 respectivamente) para GSH e GSSG entre os intervalos de 1,0 a 100,0 µM e a integral da intensidade da corrente correspondente, obtida em HPLC (Fig. 35).

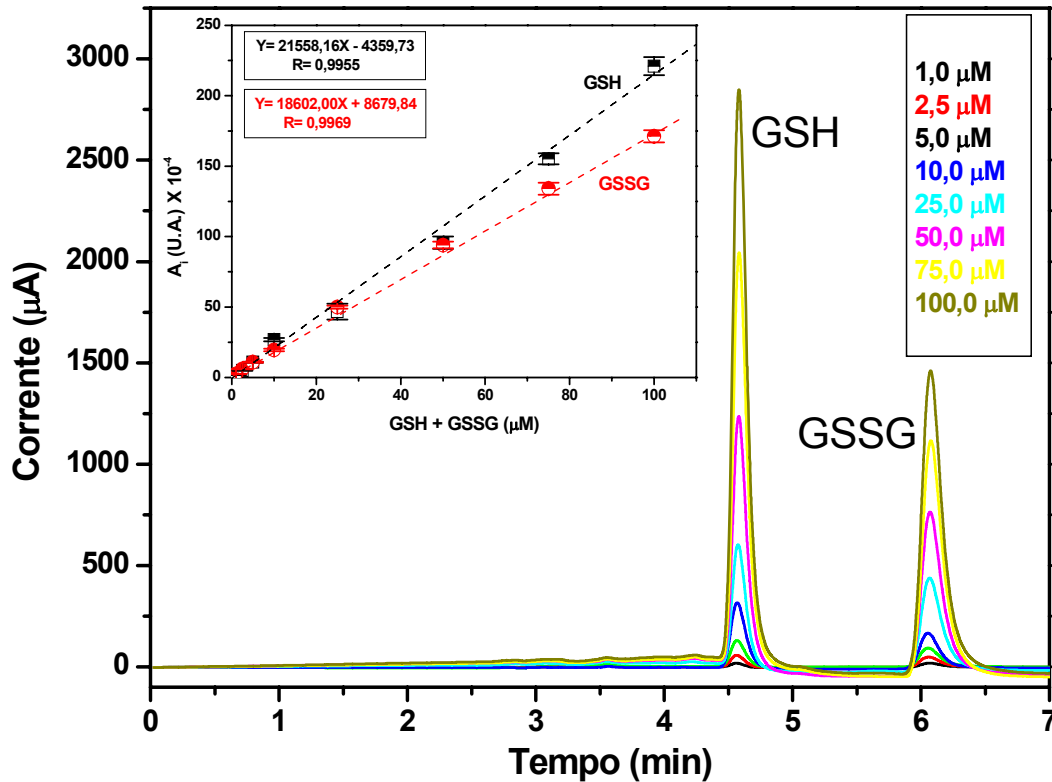


Figura 35 – Cromatogramas sobrepostos (vol. inj. 10 µL, fluxo 1,0 mL.min⁻¹) de padrões GSH e GSSG (tempo de reten. de 4,6 e 6,1 min respectivamente) obtido por detecção eletroquímica em um detector coulométrico *Flow-through* com 550 mV para GSH e 850 mV para GSSG a partir das concentrações (em triplicatas) (1,0; 2,5; 5,0; 10,0; 25,0; 50,0; 75,0 e 100,0 µM). No detalhe, a correlação entre a concentração das espécies e as respectivas integrais das correntes geradas (A_i).

4.7.3 Determinação do índice redox IR (%) nas amostras

A estequiometria de formação de GSSG a partir de GSH é 2:1 e, portanto a glutatona total na célula (GSH_{total}) pode ser considerada como $[GSH] + 2.[GSSG]$. Essa relação forneceu o índice redox (IR), ou seja, a %GSH na forma do persulfeto GSSG frente ao total de glutatona. Correlacionaram-se então, os efeitos dos tratamentos com o índice redox (IR). As variações de IR frente aos ensaios toxicológicos foram avaliadas pela relação $IR = 100 \times (2GSSG/GSH_{total})$.

Os resultados para GSH e GSSG (Fig. 36) obtidos em extratos de algas *M. polymorphus*, apresentaram cromatogramas com definição satisfatória. Apesar das

amostras expostas ao OxF terem apresentado um IR próximo a 60% ($0,9 \pm 0,2 \mu\text{M}$ de GSSG e $3,2 \pm 0,3 \mu\text{M}$ de $\text{GSH}_{\text{total}}$) e o grupo exposto ao BaP ter apresentado um IR de 80% ($0,9 \pm 0,1 \mu\text{M}$ de GSSG e $2,4 \pm 0,4 \mu\text{M}$ e $\text{GSH}_{\text{total}}$), ambos os controles apresentaram um IR relativamente alto, em torno de 35% (com $1 \pm 0,1 \mu\text{M}$ para GSSG e $5 \pm 0,5 \mu\text{M}$ para $\text{GSH}_{\text{total}}$).

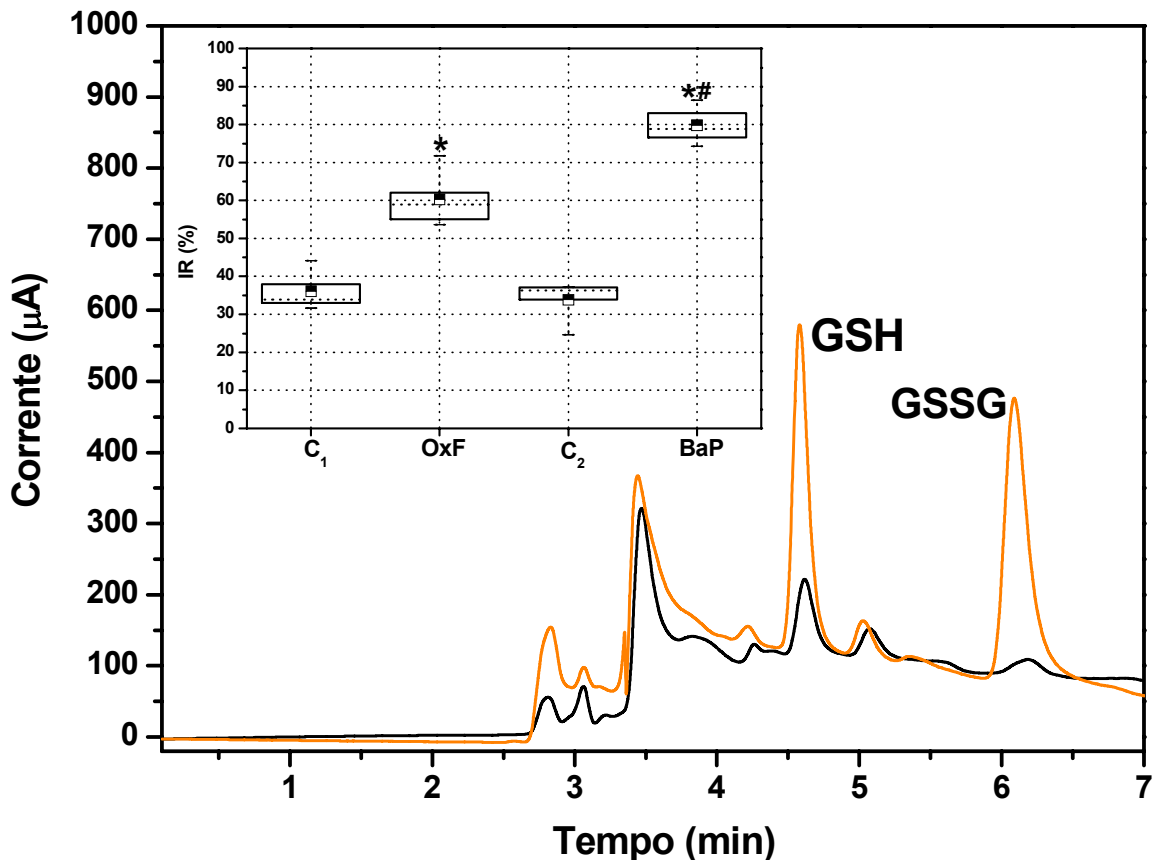


Figura. 36 – Em preto, um cromatograma de uma amostra de extrato de *M. polymorphus* e, em laranja, a mesma amostra *spiked* com padrão de GSH e GSSG ($15 \mu\text{M}$). No detalhe, um gráfico *Box plot* do IR (%) determinado em extratos de cultura de microalga com 48h de exposição ao OxF (IC_{50} $0,24 \mu\text{g.mL}^{-1}$) ao BaP (IC_{50} $0,99 \mu\text{g.mL}^{-1}$). Todos os tratamentos e controles (C₁ e C₂) n=3 com 3 repetições por réplica. (*) Indica diferença significativa ($P < 0,05$) entre o controle e amostra para um mesmo tratamento. (#) Indica diferença significativa ($P < 0,05$) entre amostras sob tratamentos diferentes.

4.7.4 Resumo geral

A seguir, no gráfico de barras abaixo, os resultados dos níveis de GSH e GSSG frente aos dois tratamentos. Os extratos das culturas de *M. polymorphus*

submetidas aos ensaios com OxF tiveram os níveis de GSH_{total} diminuídos em 38% ao serem comparados aos grupos controle ($3,2 \pm 0,5$ e $5,2 \pm 0,6$ μM respectivamente). Nos grupos tratados com BaP a redução foi de 53%, frente aos controles ($2,5 \pm 1$ e $5,4 \pm 0,8$ μM respectivamente). Os níveis de GSH em culturas sob tratamento com OxF decresceram cerca de 61,5% quando confrontada com o grupo controle ($1,28 \pm 0,3$ e $3,3 \pm 0,5$ μM respectivamente). Nos grupos sob tratamento com BaP a redução nos níveis de GSH chegou a 86% comparados aos controles ($0,5 \pm 0,2$ e $3,6 \pm 0,7$ μM respectivamente). Ainda que elevados, os valores de GSSG não variaram, tanto nos grupos controles como nos grupos tratados ($1 \pm 0,2$ μM). Finalmente, a redução dos níveis de GSH nos grupos tratados com BaP foi 25% maior que a redução de GSH nos grupos tratados com OxF ($0,51 \pm 0,2$ (86%) e $1,28 \pm 0,3$ (61%) μM respectivamente) (Fig. 37).

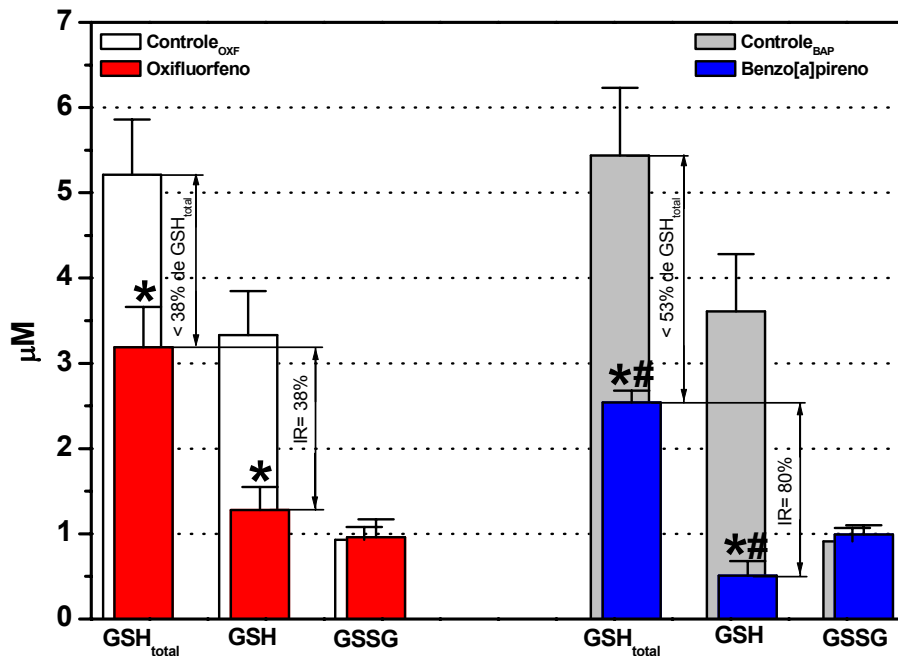


Figura. 37 – Gráfico de barras dos níveis de GSH e GSSG em extratos de cultura de microalga *M. polymorphus* em 48h de ensaio. Em vermelho, as amostras em exposição ao OxF e, em azul, em exposição ao BaP. (*) Indica diferença significativa ($P < 0,05$) entre o controle e amostra para um mesmo tratamento. (#) Indica diferença significativa ($P < 0,05$) entre amostras sob tratamentos diferentes.

4.8 Níveis de Asc⁻

4.8.1 Voltamograma hidrodinâmico

Após injeções em HPLC de 10 µL (em triplicatas) de concentrações fixas de 100 µM para o padrão de Asc⁻ e com ajustes sucessivos e crescentes dos potenciais de oxidação a cada injeção, obtivemos os pontos necessários para construção do HV (Fig. 38). Os pontos obtidos foram ajustados com uma equação sigmoidal (Eq. 5) (Função de *Boltzmann*).

Equação 05 – Equação sigmoidal para corrente – voltagem (HV)

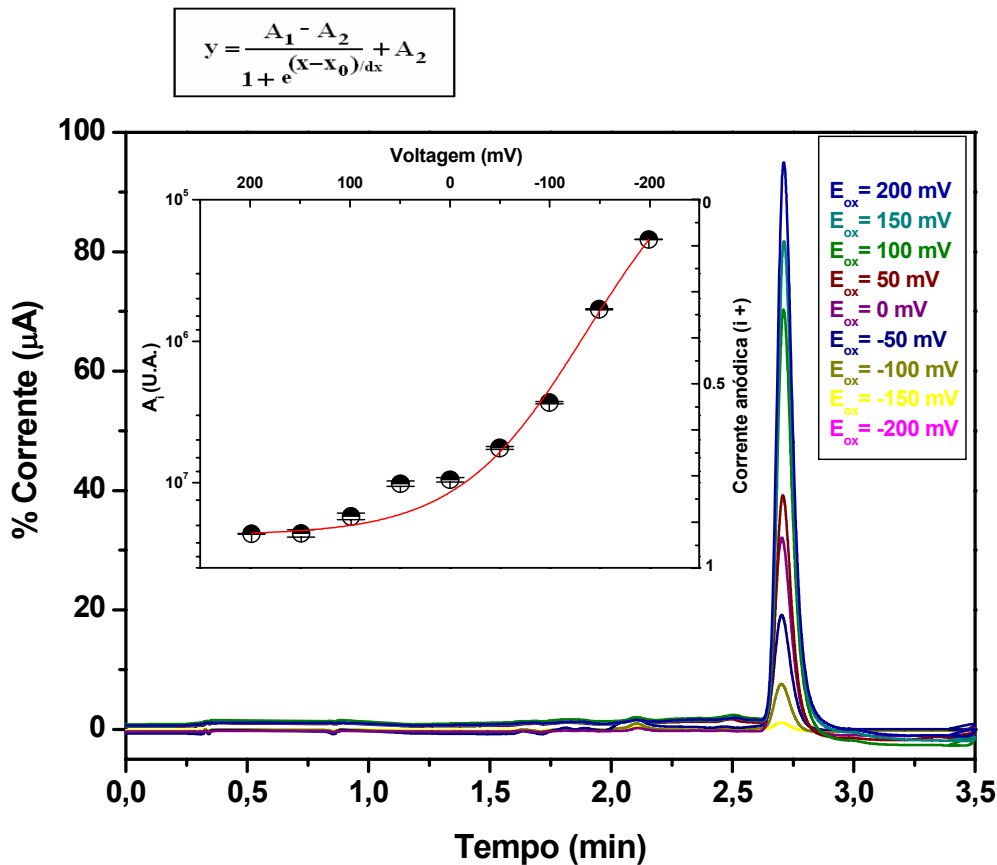


Figura. 38 – Cromatogramas sobrepostos (vol. inj. 10 µL, fluxo 0,5 mL.min⁻¹) dos padrões de 100 µM de Asc⁻ (tempo de reten. 2,7 min). Obtido por detecção eletroquímica em um detector coulométrico *Flow-through* segundo aumentos sucessivos dos potenciais de oxidação. No detalhe, construção da curva Corrente (A_i) - Voltagem (mV) para Asc⁻. Os dados foram ajustados a uma equação sigmoidal (Eq.5) gerando os pontos nos quais o potencial de oxidação fornece o máximo de corrente (i): E_{i1} = 100 a 200 mV para Asc⁻ geram 90% da corrente máxima. (A_i) Integral da corrente.

4.8.2 Curva de calibração

Os resultados em triplicatas, obtidos na curva de calibração, indicaram boa correlação ($R= 0,9981$) para Asc^- entre os intervalos de 5,0 a 100,0 μM e a integral da intensidade da corrente correspondente, obtida em HPLC (Fig. 39).

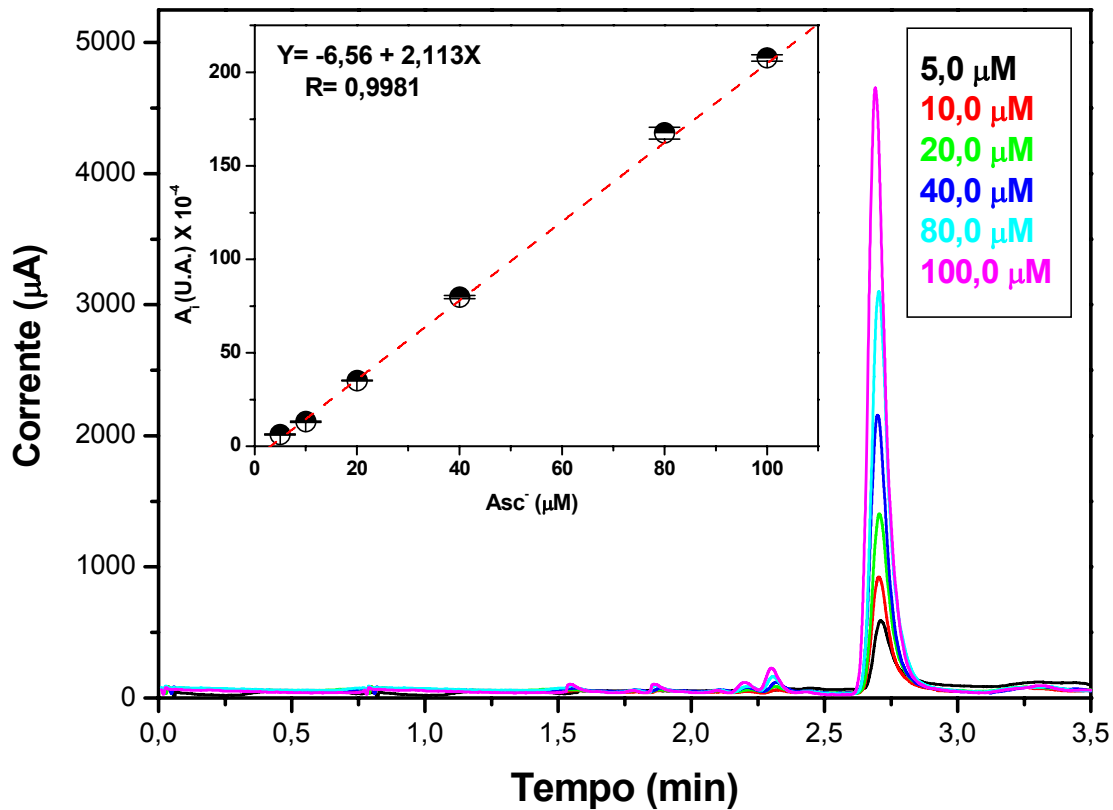


Figura 39 – Cromatogramas sobrepostos (vol. inj. 10 μL , fluxo 0,5 $mL \cdot min^{-1}$) de padrões Asc^- (tempo de reten. 2,7 min) obtido por detecção eletroquímica em um detector coulométrico *Flow-through* com 100 mV a partir das concentrações (em triplicatas) (5,0; 10,0; 20,0; 40,0; 80,0 e 100,0 μM). No detalhe, a correlação entre a concentração de Asc^- e as respectivas integrais das correntes geradas (A_i).

4.8.3 Resultados obtidos nas amostras

Os resultados para Asc^- e Asc^-_{total} obtidos de extratos de algas *M. polymorphus* com protocolos de extração MPA 10%, forneceram cromatogramas com boa definição (Fig. 40). Valores relacionados aos níveis de Asc^-_{total} ,

encontrados nas culturas submetidas ao ensaio com o OxF e BaP, não tiveram diferenças estatisticamente significativas entre si (46 ± 2 e 47 ± 2 nM respectivamente) e entre seus respectivos controles (48 ± 3 e 48 ± 7 nM respectivamente). Por sua vez, os níveis de Asc^- nas amostras submetidas ao OxF tiveram um decréscimo de 45% quando comparados às amostras do grupo controle (27 ± 4 e 48 ± 3 nM respectivamente). Entretanto, nas amostras submetidas ao BaP, os níveis de Asc^- decresceram pouco mais de 15% quando comparadas aos seus controles (46 ± 9 e 38 ± 3 nM respectivamente).

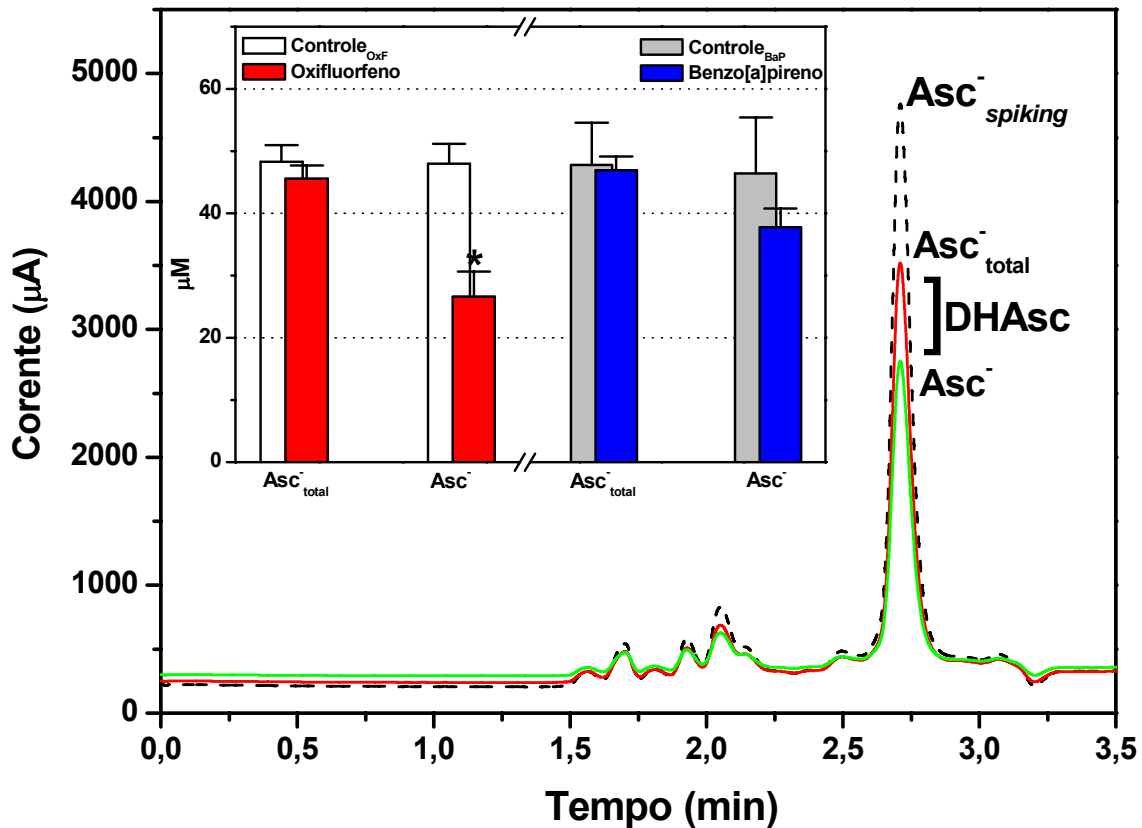


Figura. 40 – Em verde, um cromatograma de uma amostra de extrato de *M. polymorphus*. A mesma amostra, em preto tracejado, *spiked* com padrão de Asc^- (40 μ M) e, em vermelho, após o procedimento de redução de DHAsc, com DTT, formando Asc^-_{total} . No detalhe, um gráfico de barras dos níveis de Asc^- e Asc^-_{total} determinados em extratos de cultura de microalga com 48h de exposição ao OxF (IC_{50} 0,24 μ g.mL⁻¹) ao BaP (IC_{50} 0,99 μ g.mL⁻¹). Todos os tratamentos e controles n=3 com 3 repetições por réplica. (*) Indica diferença significativa ($P < 0,05$) entre o controle e amostra para um mesmo tratamento.

4.9 Níveis de liberação *in vivo* de H₂O₂

Os resultados dos experimentos envolvendo *M. polymorphus* e a liberação de H₂O₂ frente a diferentes concentrações tanto de OxF como BaP em tempos previamente estabelecidos, apontam efeitos diferentes, de ambas as drogas, nos metabolismos das diatomáceas (Fig. 41A e B). Os ensaios com luminol revelaram uma liberação de H₂O₂ cerca de 20 vezes maior nas células submetidas ao OxF frente aos grupos tratados com BaP (88 ± 1 e 4,3 ± 0,2 nM respectivamente), quando expostos a uma concentração próxima aos valores de IC₅₀ para ambos. Além disso, o grupo tratado com o OxF apresentou uma intensa liberação de H₂O₂ por volta de 1 hora após o ensaio (Fig. 41A). No entanto, o grupo exposto ao BaP apresentou uma liberação tardia de H₂O₂, aproximadamente 1h e 45 min após o ensaio e quando expostos à concentração próxima a letalidade (Fig. 41B).

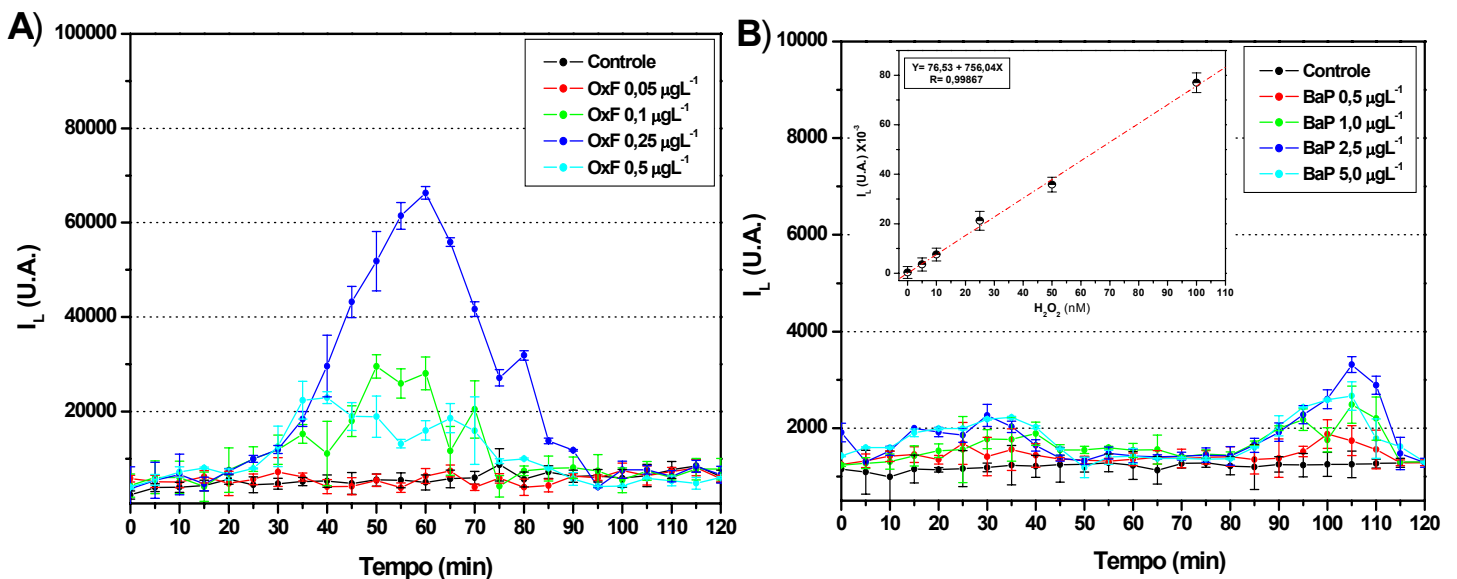


Figura. 41 – Perfil cinético de liberação de H₂O₂ em culturas de *M. polymorphus* com 48 h de crescimento. (A) Culturas expostas a concentrações de OxF (0; 0,05; 0,1; 0,25 e 0,5 µgL⁻¹) (n= 3 por concentração) com liberação máxima de H₂O₂ (88 ± 1 nM) após uma hora de contato com o herbicida. (B) Culturas expostas a concentrações de BaP (0; 0,5; 1,0; 2,5 e 5 µgL⁻¹) (n= 3 por concentração) com liberação tardia de H₂O₂ (4,3 ± 0,2 nM) após 1 h e 45 min de contato com o benzo[a]pireno. No detalhe em B, uma curva de calibração de H₂O₂.

4.10 Experimentos com *K. alvarezii*

Dada a necessidade do experimento, com vistas à padronização das técnicas para caracterizar a presença do sistema CYP450, obtivemos exemplares da alga vermelha *K. alvarezii* em nosso laboratório. Historicamente, esses exemplares, provenientes de cultivo em mar aberto na região de Ubatuba/SP, foram passiva e cronicamente expostos a hidrocarbonetos aromáticos lançados por embarcações ou pelas marinas nos arredores. Apesar de passarem oito semanas sob condições controladas de laboratório, os resultados obtidos revelam a presença do sistema P450 (Fig. 42) na concentração de $6,94 \text{ pmol.mg.prot}^{-1}$.

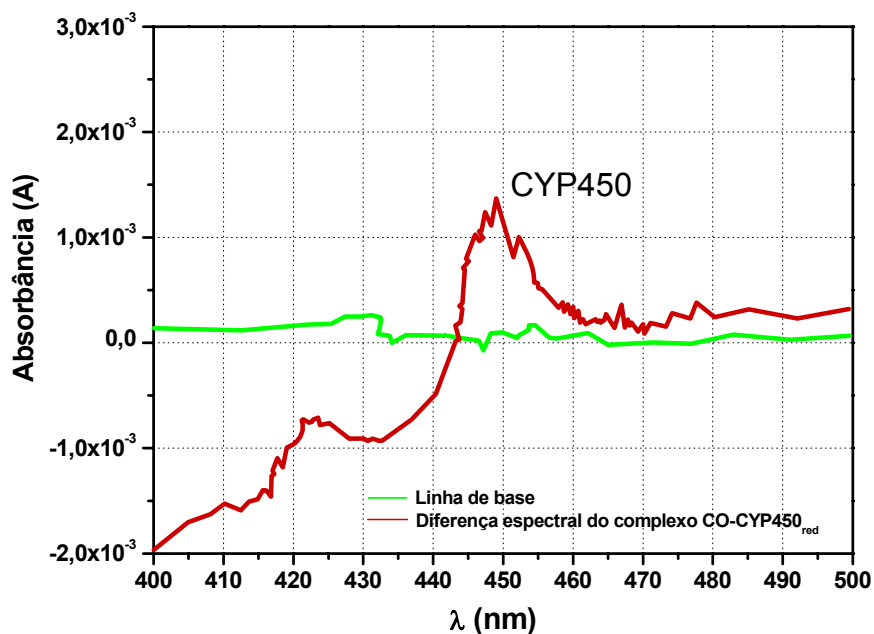


Figura 42 – Diferença espectral induzida na fração microsomal ($1,7 \text{ mg de proteína.mL}^{-1}$) após redução com ditonito de sódio seguido de saturação com monóxido de carbono em amostras da macro alga *K. alvarezii*.

No entanto, fatores como a necessidade de elevada biomassa e presença de grupos fenólicos nos extratos, tornam o método convencional, um tanto quanto inapropriado para ensaios de exposição sub-crônica (48h) em microalgas.

5. DISCUSSÃO

5.1 Culturas e curvas de crescimento

5.1.1 Utilização de *M. polymorphus* e meio f/2

Um dos fatores mais importantes para um ensaio toxicológico adequado, é o bom estado fisiológico do indicador biológico, garantindo a obtenção das respostas frente aos agentes xenobiontes.³⁴⁰ Os protocolos oficiais recomendam a utilização de culturas axênicas, isto é, uma cultura pura e monoespecífica e que o inóculo seja realizado, a partir da cultura-mãe na fase exponencial de crescimento.³⁴¹ Muito embora, recomende-se o uso de organismos (Chlorophyta) específicos como *S. capricornutum*,^{341,342} *Scenedesmus subspicatus* e *Chlorella vulgaris*,^{341,343} *Chlorella pyrenoidosa*,³⁴⁴ *Chlamydomonas eugametos*³⁴⁵ e *C. reinhardtii*,^{340,341,346} optou-se, pelo uso de diatomáceas (Heterokontophyta), a exemplo dos testes com *Skeletonema costatum*³⁴⁷ e *Thalassiosira pseudonana*,^{343,348} utilizando-se a *M. polymorphus* por sua característica cosmopolita e hábito marinho e, além disso, por seu ineditismo.³⁴⁹ Optamos ainda, pela utilização de um meio de cultura específico *Gillard f/2*, ao contrário do que as normas internacionais recomendam para os testes toxicológicos padronizados,³²⁴ por ser o meio de cultura mais adequado para o desenvolvimento de diatomáceas (*vide* item 4.1).³⁵⁰ No entanto, considerou-se a importância da concentração salina 32‰ no meio. Apesar das variações de concentrações iônicas terem profunda influência na toxicidade por metais,³⁵¹ flutuações na salinidade do meio de cultura podem causar alterações na toxicidade por poluentes orgânicos em função do desequilíbrio osmótico originados pelos íons cloreto.³⁵²

5.1.2 Curva de crescimento: fluorescência da clorofila *versus* contagem celular

A escolha do método para a determinação da concentração das células no meio de cultura, depende de fatores como a praticidade na execução da metodologia, a disponibilidade de equipamentos e de possíveis interferências causadas pela característica dos agentes xenobióticos envolvidos.^{324,340} Muitos trabalhos avaliam o progresso do aumento populacional de uma cultura através de contagem celular ao microscópio óptico. Assim, os experimentos foram iniciados com a utilização desse protocolo (*vide* apêndice C),²⁷⁰ porém, tal prática mostrou-se extremamente morosa, com alto grau de subjetividade e de enorme demanda de tempo. Por essas razões, optamos pelo desenvolvimento e padronização da técnica de monitoramento do crescimento populacional pela fluorescência da clorofila, uma metodologia bastante consolidada³⁵³ e amplamente utilizada em ensaios toxicológicos,^{354,355} sendo recomendada em normas internacionais (*vide* item 3.1.2).^{322,324} No entanto, alguns cuidados tiveram de ser tomados para execução adequada do protocolo, uma vez que partículas ou turvações presentes na amostra podem atenuar a radiação de excitação ou emissão, causando alterações nos resultados.³⁵⁶ Após análise do espectro de excitação (Fig. 22A), optou-se pelo comprimento de onda em 440 nm (λ_{ex} = 440 nm) cuja emissão em 680 nm (λ_{em} = 680 nm) teve boa definição (Fig. 22B) e pode ser monitorado durante todo o ensaio de crescimento algal. O monitoramento do aumento da concentração das células nas culturas foi feito durante 30 dias com análises diárias^{270,324} da fluorescência da clorofila. (Tab. 3a) Sendo posteriormente, confrontado com os valores obtidos pelo protocolo de contagem ao microscópio (Tab. 3b). Após ajustar os pontos com uma curva exponencial (Eq. 2), os resultados apontaram uma dinâmica de crescimento algal obtida pelos dois métodos muito semelhantes com um período de crescimento exponencial bem definido e, compreendido nos

primeiros cinco dias (Fig. 23). Apesar da elevada correlação entre as duas metodologias, deve-se ponderar o fato de que ensaios toxicológicos envolvem a leitura e análise de um número elevado de amostras.³⁴⁰ O que, na prática, deve ser considerado, levando-se em conta, o trabalho e a quantidade de pessoas envolvidas durante as análises. Além disso, a curva de crescimento por fluorescência da clorofila permitiu um número maior de pontos amostrais sendo, portanto, estatisticamente é mais apropriada.

5.2 Teste toxicológico e concentração efetiva - IC₅₀

É imprescindível o controle na concentração do poluente através da definição adequada do indicador de toxicidade, bem como, a concentração do inóculo e o estabelecimento do tempo de exposição em que as culturas, serão expostas. Devendo esses parâmetros proporcionar alterações fisiológicas passíveis de serem mensuradas sem, no entanto, comprometer a integridade do organismo.^{323,341}

5.2.1 Tempo de exposição

Culturas submetidas a ensaios toxicológicos têm suas respostas à tolerância ao agente agressor, alteradas em função do tempo destinado ao ensaio.³⁵⁷ Muito embora as normas internacionais^{322,324,341,343} recomendem um período de exposição amplo, dependente do organismo, como na bactéria *Vibrio fisheri* que necessita apenas de 15 min sob exposição aguda³⁵⁸ ou como na planta vascular *Lemna minor* que necessita de 7 dias em exposição crônica.³⁵⁹ Foi estabelecido o período de 48h para os ensaios de toxicidade com *M. polymorphus*. Uma vez que, nesse espaço de tempo as células estão fisiologicamente bem adaptadas e não há

produção de metabólitos prejudiciais ao desenvolvimento da alga (*vide* período exponencial da Fig. 23).³⁶⁰ Culturas muito antigas e senescentes entram num período estacionário e podem, em função do longo tempo de permanência, sofrer a influência de metabólitos tóxicos por elas mesmas produzidas ou estar sujeitas a subprodutos decorrentes da degradação ou metabolismo de xenobióticos.³⁶¹ Além disso, por estarem em plena fase exponencial com μ próximo a 0,45 células.dia⁻¹ a exposição de xenobióticos em 48h tem caráter agudo, por envolver, no caso de *M. polymorphus*, um ciclo de uma geração.

5.2.2 Concentração do inóculo

A maioria dos ensaios padronizados sugere 10^3 a 10^5 células.mL⁻¹ (EPA³⁶² e ABNT³²³ respectivamente). A utilização de concentrações mais baixas de alga apresenta vantagens, uma vez que, concentrações elevadas em ensaios com tempo de exposição acima de 72h provocam mudanças físico-químicas do meio (*e.g.* aumento do pH) o que poderia provocar mudanças no comportamento da cultura (*e.g.* diminuição de μ , encistamento, morte prematura, *etc.*)³⁶³ ou mudanças do próprio agente xenobiótico (*e.g.* protonação, degradação, precipitação, *etc.*).³⁶⁴ Assim, decidiu-se que os inóculos de *M. polymorphus* começariam as culturas na concentração de 1×10^6 células.mL⁻¹. Considerando o fato de que a exposição aguda de 48h que é relativamente curta para gerar mudanças drásticas no pH do meio de cultura *f/2* (*vide* Tab. 3a e b) e, da necessidade de aquisição biomassa ao final do experimento, suficiente para os ensaios bioquímicos posteriores. (*vide* item 3.1.4.1)

5.2.3 Indicador de toxicidade (μ)

Marcadores bioquímicos como indicadores de estresse em testes *in vitro*, podem responder de forma diversa e imprecisa quando organismos são submetidos a concentrações de xenobiótico em excesso ou insuficientes.³⁶⁵ Dessa forma, o IC₅₀ dos agentes tóxicos empregados no ensaio foi definido com base na %inib.μ (vide item 3.1.3 e Fig. 16), conforme indicam várias normas internacionais a exemplo da ISO 8692³²⁴ e OECD 201.³⁴¹ Apesar da possibilidade de usar outros critérios (e.g. cálculo da área sob a curva de crescimento), sob o ponto de vista da dinâmica de populações, a taxa de crescimento é muito mais significativa, uma vez que representa o crescimento logarítmico da população de algas.³⁶⁶

5.2.3.1 Toxicidade de OxF

Os testes de toxicidade (Tab. 4a) demonstraram que *M. polymorphus* tem elevada sensibilidade ao OxF, apresentando um IC₅₀ de 0,24 μg.L⁻¹.(Fig. 24A) Esses valores ganham notoriedade quando comparados, por exemplo, com os valores de IC₅₀ de 274,3 μg.L⁻¹ encontrados em testes de efeito algistático em *Chlamydomonas reinhardtii*³⁶⁷ ou quando comparados com os valores encontrados em testes toxicológicos apresentando um IC₅₀ de 0,7 μg.L⁻¹ com *Scenedesmus subspicatus*³⁶⁷ ambos os testes sob exposição em 72h. Há, no entanto, uma série de respostas intermediárias de IC₅₀ frente ao oxifluorfenol apontados em outros representantes fitoplanctônicos, como os valores de 22,5 μg.L⁻¹ encontrados em *Scenedesmus obliquus*⁶² expostas em 48h ou, de 38,4 μg.L⁻¹ em *Chlorella kessleri*, 11,1 μg.L⁻¹ em *Stichococcus bacillaris*, 26,3 μg.L⁻¹ em *Selenastrum capricornutum* e 2,2 μg.L⁻¹ em *Scenedesmus quadricauda*, quando expostas em 72h.³⁶⁷ E, também os valores de 49,7 μg.L⁻¹ em *Synechococcus leopoliensis*,³⁶⁷ 5,1 μg.L⁻¹ em *Scenedesmus actus*,³⁶⁸ 4,1 μg.L⁻¹ em *Chlorella pyrenoidosa*³⁶⁹ e 1,5 μg.L⁻¹ em

*Chlorella vulgaris*³⁷⁰ quando expostas em 96h. Além disso, alguns trabalhos com outros herbicidas da família DFE como (e.g cloronitrofen, nitrofen e bifenox) mostram toxicidade considerável, apresentando um IC₅₀ de 9,8 µg.L⁻¹ para *S. capricornutum*,³⁷¹ de 1,0 µg.L⁻¹ *C. pyrenoidosa*³⁷² ambas sob 72h de exposição e *Chlamydomonas eugametos* com 3,0 µg.L⁻¹ durante 48h de ensaio.³⁷³ A sensibilidade apurada a agentes xenobiontes pode garantir um bom lugar no ranking de espécies potencialmente bioindicadoras de poluição aquática. Espécies de elevada tolerância a poluentes, fatalmente terão suas alterações apreciadas quando uma vasta gama de organismos já tiverem sido gravemente afetados ou, aniquilados.³⁷⁴

a) Influência de OxF no parâmetro fluorescência da clorofila

Herbicidas DFE estão diretamente relacionados com a diminuição da síntese de clorofila, pela inibição da PROTOX. Com base nisso, têm-se sugerido discrepâncias na %inib.µ, nos ensaios com OxF, entre a fluorescência da clorofila para a determinação da concentração das células no meio de cultura, e a concentração celular obtida por contagem ao microscópio.^{340,353} Trabalhos com *Scenedesmus obliquus* mostraram que sob um tempo de exposição de 48h em uma concentração de OxF que inibe 50% de µ, houve uma inibição da síntese de clorofila de quase 96%, no entanto a concentração de células diminuiu a metade quando comparada ao controle. Entretanto, o mesmo artigo mostrou que, sob IC₅₀ em um tempo de exposição de 24h, ou, sob IC₂₀ em 48h, a %inib.µ com base na concentração celular obtida por fluorescência da clorofila equivaleu à obtida por contagem ao microscópio.⁶² Em nossos experimentos com *M. polymorphus*, o efeito algistático com o IC₅₀, baseados na diminuição da síntese de clorofila, foram

confirmados pelo monitoramento de contagem de células ao microscópio. O que denota que tais discrepâncias podem ocorrer em decorrência da concentração do xenobiótico ou em função dos tempos de exposição. Entretanto, o presente trabalho, com IC₅₀ de 0,24 µg.mL⁻¹ de OxF em 48h de exposição, ao que parece, não causou discrepâncias entre as duas metodologias de obtenção da concentração celular.

b) Influência da irradiância luminosa na ação de OxF

Culturas de *M. polymorphus* ensaiadas com OxF ficaram expostas durante 48h sob uma irradiação luminosa de 120 µmol de fótons.m⁻².s⁻¹ (63 W.m⁻² de energia solar). Considerando essa característica do ensaio, alguns trabalhos usando simuladores solar ou fontes de radiação UV apontam, sob essas condições, além de uma meia vida de dias para o OxF, a formação de compostos mais reativos decorrente de reduções (e.g. quando o grupo nitro é transformado em um aminogruppo) e substituições (e.g. quando o grupo etoxi é substituído por um grupamento hidroxila) através de fotoativação.^{64,375} Tal suscetibilidade à luz e mudança de estrutura química, poderia comprometer os modelos propostos de ação do OxF, ou seja inibição da PROTOX e fotosensibilização de PpIX e, por conseguinte, os resultados dos testes toxicológicos. Todavia, é importante ressaltar que as condições necessárias para a rápida degradação e fototransformação de OxF no experimento acima citado, foram decorrentes de ensaios feitos em solventes orgânicos (*i.e.* metanol, acetonitrila e n-hexano) e além disso, sob uma irradiância solar de 750 W.m⁻², ou seja, mais de dez vezes a irradiância usada no ensaio com *M. polymorphus*.

5.2.3.2 Toxicidade de BaP

Os testes com BaP (Tab. 4b) mostraram-se de considerável toxicidade para a diatomácea *M. polymorphus*, uma vez que resultaram em IC₅₀ de 0,99 µg.L⁻¹ (Fig. 24B), também confirmado pelo protocolo de contagem celular. Apesar da escassez de testes toxicológicos envolvendo algas e BaP, os ensaios com *Scenedesmus subspicatus* em exposição a uma série de HPAs durante sete dias, mostraram um efeito algistático proporcional ao aumento do peso molecular e do número de anéis envolvidos nas moléculas em testes. Assim, os resultados de IC₅₀ com base na redução da população de células variaram de 68,2 mg.L⁻¹ para o naftaleto até 1,5 µg.L⁻¹ para o BaP.¹⁰³ Outros trabalhos, no entanto, mostram tolerâncias bastante divergentes, utilizando HPAs correlatos, porém, com dependência direta da intensidade de PAR durante 24h. A exposição de *Scenedesmus armatus* a 500 µg.L⁻¹ de antraceno revelou uma inibição de µ próxima a 60% em culturas sob 12 W.m⁻² de irradiância. Entretanto, o mesmo grau de toxicidade é obtido com apenas 75 µg.L⁻¹, mas, com 64 W.m⁻² de irradiância.³⁷⁶ Outros experimentos com HPAs contendo heteroátomos (*i.e.* acridina) envolvendo a exposição da diatomácea *Nitzschia sigma* e da alga verde *Chlamydomonas eugametos* mostraram diminuição de 50% da população com dosagens de 80 µg.L⁻¹ e 800 µg.L⁻¹, respectivamente.³⁷⁷ Assim, a alta sensibilidade ao BaP por parte de *M. polymorphus* pode ser atrelada ao fato de possuir um hábito de vida muito próximo à interface ar-água, e ao número menor de pigmentos quando comparado com Chlorophyta.³⁴⁹ Tais fatores contribuiriam para uma exposição maior a radiação luminosa com conseqüente geração de metabólitos fototóxicos quando na presença de xenobióticos como BaP.

a) Influências da foto/bioativação espécie-específica de BaP

Embora os resultados com *M. polymorphus* apontem alta sensibilidade ao BaP, os limites de toxicidade e a habilidade de degradação de HPAs por algas, tem profunda dependência de uma série de fatores. Aventando as hipóteses: da fotoativação de BaP com produção de intermediários oxigenados, em decorrência da fonte de energia luminosa ou, da bioativação em função da atividade enzimática. Alguns estudos com *Selenastrum capricornutum* sob elevadas concentrações de BaP (1200 µg.L⁻¹), ultrapassando os limites de solubilidade em água, durante 48h e sob luz fluorescente de coloração dourada, mostraram a produção do metabólito BaP-11,12-dihidrodiol sem, no entanto, efeito algistático considerável. Entretanto, sob concentrações 250 vezes mais baixas, sob luz fluorescente branca, o principal produto formado foi BaP-9,10-dihidrodiol e quinonas na proporção 2:1 com notável redução da população. Quando, no entanto, uma fonte de radiação UV-A foi usada houve produção intensa de BaP-quinonas, reconhecidamente de grande ação tóxica, inibindo quase que completamente o crescimento populacional das algas.³⁷⁸⁻³⁸⁰

Paralelamente, outro experimento sugere a bioativação de BaP, no entanto, prioritariamente espécie-específica. Culturas de *Selenastrum capricornutum*, *Scenedesmus actus* e *Ankistrodesmus braunii* biotransformaram BaP à dihidrodiois e quinonas. Contrariamente, as algas *Chlamydomonas reinhardtii*, *Ochromonas malhamensis* e a cianobactéria *Anabaena flos-aquae* praticamente não produziram nenhum metabólito.³⁸¹

Embora a influência da luz nos processos de foto/bioativação pareça incontestável, reações fotoquímicas de fotosensibilização, elevando HPAs a

estados excitados de maior energia com produção, como decorrência, de oxigênio singlete e EROs também merecem ser consideradas.^{382,383}

b) Influências da disponibilidade de carbono na toxicidade de BaP em culturas não aeradas

As células de *M. polymorphus* desenvolveram-se em culturas sob meio *f/2* sem aeração prévia. A literatura sugere que as condições de cultivo podem mudar a afinidade das algas por CO₂.³⁸⁴ Cultivos não aerados, em condições de baixa disponibilidade de CO₂ (o K_m para CO₂ em Rubisco de diatomáceas é de 60 μM)^{385,386} e, com nitrato como fonte de nitrogênio, podem levar a uma rápida alcalinização do meio.³⁸⁷ Nessas condições, a acessibilidade ao carbono (DIC, *dissolved inorganic carbon*)³⁸⁸ pelas células mudaria drasticamente, uma vez que as espécies de DIC estão profundamente relacionadas com o pH.³⁸⁹ Assim, em culturas de laboratório, a densidade celular pode atingir níveis nos quais a demanda por carbono, pode exceder os limites de CO₂ (*i.e.* pCO₂ 15 μM a 20 °C) dissolvido em água, fazendo com que a disponibilidade de carbono seja um fator limitante para o crescimento das algas, ocasionando profunda influência nos resultados de testes toxicológicos. Para evitar mudanças no pH e restrições no suprimento de carbono, alguns autores defendem o enriquecimento dos meios de cultura com 2 a 4% de CO₂.³⁷⁶ No entanto, as microalgas desenvolveram um sistema de acumulação de carbono (CCM, *inorganic-carbon concentration mechanism*) para manter a fotossíntese a partir de concentrações de DIC no meio, em detrimento da fotorrespiração.³⁹⁰⁻³⁹² (*vide* apêndice D) Todavia, tais sistemas são inibidos na presença de concentrações elevadas de CO₂ (*i.e.* >1%).³⁸⁸ Além disso, aerações artificiais com borbulhamento de CO₂, poderiam acelerar as taxas

de volatilização de BaP nas culturas, comprometendo o ensaio. Dada às implicações do suprimento artificial de CO₂ e da baixa variação de pH da cultura *M. polymorphus* em 48h (vide Tab. 3a e b), optou-se por manter os ensaios sob desenvolvimento não aerado.

Apesar da grande variabilidade e múltiplas fontes de resposta a xenobióticos por parte de organismos fotossintetizantes fitoplanctônicos, a determinação dos valores de tolerância ao BaP é uma informação muito importante na medida em que se tem relatado crescente preocupação com a presença desses agentes em ambientes aquáticos. A análise de HPAs, especificamente BaP, revelou níveis de aproximadamente 10 ng.L⁻¹ de BaP nas águas do Mar Báltico²⁵ e chegando a 4 µg.g⁻¹ nos sedimentos da Baía de Todos os Santos.¹⁰² A julgar pelo ritmo intenso da industrialização mundial e crescente demanda por combustíveis fósseis nos países emergentes, esses níveis irremediavelmente devem sobrepujar tais marcas e os organismos de base da cadeia trófica, fatalmente devem refletir tais mudanças.

5.3 Estresse oxidativo

5.3.1 A Ação do OxF

Mesmo sendo um herbicida amplamente usado nas culturas e reconhecidamente ter grande eficiência na atividade pré-emergente, o OxF, uma vez atingindo corpos d'água, pode representar um risco aos organismos fotossintetizantes *não-alvo*, na medida em que é um potente inibidor da enzima PROTOX,⁷⁷ responsável por um passo importante na biossíntese de clorofila.⁶⁸ O acúmulo de PpIX no citosol, decorrente dessa inibição, pode levar ao aumento da produção de EROs (vide item 1.3.1.1).^{67,393} A julgar pelos resultados obtidos com a

atividade da SOD em culturas de *M. polymorphus* expostas ao OXF, pode-se notar grande produção de EROs (Tab. 5). Muito embora, haja escassez nos dados de análises de estresse oxidativo em organismos fotossintetizantes submetidos a herbicidas DFE, alguns trabalhos com *S. obliquus* expostas a um IC₅₀ de 22,5 µg.L⁻¹ relatam aumentos consideráveis nas atividades de peroxidases, mais especificamente CAT, com aumentos na atividade de quase 100% em relação controle, como decorrência de um aumento na produção de H₂O₂.⁶² Os resultados obtidos com *M. polymorphus* seguem as mesmas tendências para CAT (Fig. 25A) e, com menor evidência, para Apx (Fig. 28A). Embora a possibilidade de geração de O₂^{•-}, a partir de um potente fotosensibilizador como PpIX por transferência de elétrons (*vide* item 1.3.1.1 e Fig. 2), seja plausível, a maioria dos autores sugere que esse não é um caminho preferencial, conferindo apenas 1% da produção, frente aos 99% de ¹Δ_gO₂ *via* transferência de energia (*vide* item 1.6.1 Fig. 7).²²⁹ Apesar da ação lesiva de ¹Δ_gO₂ nas membranas celulares, da implicação deste no desempenho da célula e, do fato que, a produção de ¹Δ_gO₂ é o principal mecanismo de ação tóxica de OxF.^{67,393} Há a necessidade, no entanto, de propor outras fontes de produção de EROs durante a ação de OxF, de forma a entender as respostas antioxidantes enzimáticas e não enzimáticas obtidas após o tratamento.

Primeiramente, as implicações relacionadas à inibição da formação dos pigmentos fotossintetizantes pelo OxF, podem alterar as funções dos complexos de antena coletores de luz (LHC, *light harvesting complex*) e, comprometer a transferência de energia dentro e entre o fotossistema II (PSII) e fotossistema I (PSI), impedindo a fixação de carbono.³⁹⁴ Muito embora haja, por parte dos organismos fotossintetizantes, várias estratégias empregadas para minimizar os impactos das reações oxigenase da Rubisco,³⁹⁵ a evolução na produção de O₂ e o

comprometimento de PSII, podem influenciar na interação competitiva entre as atividades oxigenase e carboxilase dessa enzima.³⁹⁶

Em segundo lugar, a evolução de O₂, decorrente da fotooxidação da H₂O no PSII, pode acionar as reações de fotorrespiração iniciadas pela Rubisco oxigenase nos tilacóides e, posteriormente terminadas pela glicolato oxidase, nos peroxissomos com grande produção de H₂O₂ (*vide* apêndice D).³⁹⁷ Todavia, semelhantemente às plantas com fotossíntese C₄, as algas, provavelmente devido ao sistema CCM de acúmulo de DIC,³⁹⁸ mantém um Km elevado para Rubisco oxidase. Além disso, outros mecanismos adaptativos como a glicolato desidrogenases, uma enzima tilacoidal que impede a exportação de glicolato para os peroxissomos³⁹⁷ e a cloro-respiração, que reduz o O₂ à H₂O através de oxidases membranares tilacoidais,³⁹⁸ colaboram para manter as taxas de fotorrespiração bem diminuídas (*vide* apêndice D). De fato, em algas, mecanismos como a oxidação de glicolato, e cloro-respiração, figuram como mecanismos preferenciais frente à fotorrespiração.³⁹⁵

Finalmente, como alternativa a esses sistemas energeticamente caros, o O₂ produzido pelo PSII, pode ser reduzido mais ordinariamente, através das reações de *Mehler* no PSI e com grande produção de O₂^{•-}.^{232,396} Num primeiro momento, interagindo com centros FeS das proteínas do PSI³⁹⁹ ou, com componentes do estroma como ferredoxinas (FD) ou o FAD de centros catalíticos da Ferredoxina NADPH redutase (FNR) que aceitam elétrons do PSI.³⁹⁵ Como decorrência, tanto no estroma como nas regiões tilacoidais, há um arsenal de defesas antioxidantes frente à produção de O₂^{•-} como a SOD²⁴⁴ e, por conseguinte, APx,²⁴³ DHAR, GR juntamente com GSH e Asc⁻ com o objetivo de manter sob controle a formação de EROs (*vide* itens 1.6.1.1 e 2 e Fig. 8 e 9).²³⁸ Assim, o *ciclo água-água* (elétrons

são extraídos da H₂O pelo PSII no tilacóide e, usados para reduzir o O₂ à H₂O pela APx no estroma), decorrente da interação das reações de *Mehler* e *Asa-Halliwel-Foyer*, figura como o principal agente gerador de EROs nos sistemas fotossintetizantes.^{395,396} Os resultados obtidos com *M. polymorphus* mostram elevada atividade de SOD, cinco vezes mais ativa nas culturas submetidas ao OxF do que nas culturas controle, o que caracteriza a prevenção do extravasamento de O₂^{•-} para o estroma (Fig. 30A). No entanto, diferentemente da SOD, os resultados de APx, a enzima mais importante na aniquilação de H₂O₂ nos cloroplastos,²⁴³ tiveram um aumento ainda que estatisticamente significativo, pouco expressivo (Fig. 28A). A mesma tendência foi observada com a GPx (Fig. 26A) e, embora CAT tenha tido uma atividade pronunciadamente maior, cerca de 1 vez a atividade do controle, seus sítios de ação são restritos e provavelmente não revelam a produção total de H₂O₂ (Fig.25A). Resultados mostrando tendências semelhantes também foram encontrados em culturas de *S. obliquus* expostas ao OxF por 48h⁶² e, esses achados também estão de acordo com os resultados de culturas de células de soja⁴⁰⁰ e tabaco⁴⁰¹ expostas a um herbicida DFE correlato.

Esses resultados podem ser avaliados, tomando como pressuposto o fato de se tratar de proteínas que possuem grupos heme como centros prostéticos, sabidamente, alvo da ação de OxF. Além disso, as enzimas auxiliares no processo catalíticos como a GR que reconstitui os níveis de GSH a partir de GSSG usando NADPH como agente redutor e, DHAR envolvida na reação *Asa-Halliwel-Foyer* que catalisa a restituição de Asc⁻ a partir de DHAsc *via* GSH, encontravam-se também inibidas (Fig. 27A e 29A). A inibição de enzimas importantes na diminuição dos níveis de H₂O₂ próximos aos sítios de origem pode levar ao extravasamento dessas espécies para o estroma. Muito embora, os organismos fotossintetizantes

sejam mais tolerantes ao H₂O₂ do que os animais,^{232,395} funcionando muitas vezes como um *hormônio mestre* que controla uma variedade de respostas ao estresse e, monitora uma série de ajustes fisiológicos,⁴⁰² essas moléculas podem, na presença de metais de transição, catalisar a formação de EROs altamente lesivas às células.²³⁷ Assim, os resultados relacionados aos níveis de MDA-TBA₂, evidenciados nas culturas de *M. Polymorphus* expostas ao OxF, mostraram vulnerabilidade frente à produção de EROs (Fig. 33). Obviamente a produção de ¹Δ_gO₂ colabora com parte importante no aumento do dano lipídico encontrados nesses organismos. Trabalhos expondo cotilédones de plântulas de pepino (*Cucumis sativus*) a 1 μM de um herbicida DFE correlato, sob 300 W.m⁻² de PAR, mostraram, por microscopia de transmissão, grande dano à membrana plasmática e aos envelopes cloroplastidiais.⁷⁵

A reação *Asa-Halliwel-Foyer* também é conhecida como *ciclo ascorbato-glutationa* por envolver os dois mais importantes agentes antioxidantes não enzimáticos em organismos fotossintetizantes, presentes em grande quantidade no cloroplasto (*i.e.* 25 e 5 mM respectivamente),^{245,263} (*vide* item 1.6.1.1 e Fig. 8). A diminuição em quase 40% dos níveis de GSH_{total} nas células de *M. polymorphus* ensaiadas com OxF demonstra um consumo de GSH (Fig. 37), em reações envolvendo glutatiolção protéica ou, reações envolvendo a transferência de grupos tiois através da atividade da GST durante as reações enzimáticas em processos de biotransformação. Embora glutatiolações protéicas sejam mecanismos amplamente estudados e caracterizados em células animais, em organismos fotossintetizantes, mais estudos ainda precisam ser feitos. No entanto, a argumentação da biotransformação ganha certa sustentabilidade considerando-se o aumento da atividade de GST em quase três vezes (Fig. 31), quando comparada ao controle. E,

pelos valores dos níveis de GSSG que se mantiveram muito semelhantes aos controles durante todo o experimento o que poderia caracterizar um desvio de GSH para reações de conjugação com posterior excreção ou estoque em vacúolos (Fig. 37). Porém, há a necessidade de se ponderar sobre o fato de que, em organismos fotossintetizantes, a atividade de GST não é muito bem definida, se prestando, essa enzima, a uma série de outros processos metabólicos. Assim, GST pode catalisar a transferência de grupos GSH com formação de GS-conjugados em processos de desintoxicação de xenobióticos, estabilização de flavonóides e, ter um papel de peroxidase participando da redução de hidroperóxidos orgânicos.^{310,313} O que talvez pudesse responder pela inoperância de GPx (Fig. 26A). De qualquer forma, o importante é que a elevada atividade de GST pode estar diretamente ligada com a diminuição dos níveis de GSH. Trabalhos envolvendo *S. obliquus* em exposição ao OxF, sustentam esses resultados mostrando também aumento, embora menor (c.a. 50% apenas) da atividade de GST.⁶²

Alem disso, a inibição de PSII e PSI pode contribuir diretamente para a diminuição dos níveis de NADPH,³⁹⁶ o que, além de causar implicações no *ciclo de Calvin*, pode estar relacionado com a diminuição da atividade de GR (Fig. 27A), contribuindo ainda mais para a elevação do IR de GSH (Fig. 36 e 37). Concomitantemente às reduções dos níveis de GSH, os experimentos com *M. polymorphus* também evidenciaram a diminuição dos níveis de Asc⁻ (Fig. 40) o que poderia, estar associado à diminuição dos níveis enzimáticos de DHAR (Fig. 29A). Alem disso, trabalhos utilizando plântulas de *C. sativus* em exposição a um herbicida DFE correlato, mostraram substancial queda na produção de GSH que foi acompanhado também pelos níveis diminuídos de Asc⁻. O mesmo experimento

ainda relata que os níveis de GR e DHAR também tiveram suas atividades minoradas em cerca de 50% frente aos valores encontrados nas plântulas controles.⁴⁰³ Muito embora, o mecanismo de ação do OxF seja muito bem descrito, as implicações na produção de EROs, durante a inibição dos fotossistemas, pode se refletir nas respostas das defesas antioxidantes enzimáticas e não enzimáticas, causando inúmeras alterações na célula e levando a situações extremas de adaptação. Assim, alternativamente aos mecanismos descritos, tem-se notado, em algas, uma elevada resistência á uma inativação por H₂O₂³⁹⁵ e a extraordinária capacidade de excretar H₂O₂ diretamente no meio circundante (vide item 1.6.1.2 e Fig. 9).^{395,404} Os resultados obtidos nos ensaios com *M. Polymorphus* submetidas ao OxF mostraram aumentos substanciais de H₂O₂ produzidos no meio após 60 min de exposição (Fig. 41A). Trabalhos utilizando a macro alga *K. alvarezii* expostas por 72h sob a ação de clofibrado, um estimulador de produção de H₂O₂ através da β-oxidação em peroxissomos, mostrou grande produção dessa molécula no meio circundante após as primeiras 4h de exposição.²⁷² Outros trabalhos sobre a capacidade fotossintética de *Euglena* sp. e *Chlamydomonas* sp. Quando comparadas aos cloroplastos de folhas de espinafre mostraram pouca inibição da fixação de CO₂ sob concentrações de 10⁻⁴ M de H₂O₂, indicando mecanismos de excreção e/ou resistência.⁴⁰⁴ Algumas pesquisas com a macro alga *Ulva rigida* mostraram excreção de H₂O₂ no meio de cultura, sob dependência de elevada irradiância (400 W.m⁻²) e em estrita condição de pH (9,0).⁴⁰⁵ Finalmente, os resultados de trabalhos com as algas verdes *Enteromorpha ahlnneriana* e *Cladophora glomerata* sugerem que as duas espécies têm diferentes estratégias para a remoção de H₂O₂, enquanto *C. glomerata* utiliza mecanismos enzimáticos, a alga *E. ahlnneriana* utiliza dos mecanismos de excreção.⁴⁰⁶ Mesmo sendo

permeável às membranas lipídicas, difundindo-se a partir dos sítios de origem no cloroplasto, até o citoplasma ou além, algumas pesquisas apontam difusão facilitada de H₂O₂ por meio de peroxiporinas e/ou aquaporinas viabilizando o acesso de dessas moléculas ao núcleo da célula durante os mecanismos de sinalização celular.^{407,408} Os resultados de todas essas pesquisas sugerem um metabolismo ativo frente ao O₂, diferente das plantas superiores, as quais são extremamente susceptíveis a quantidades ínfimas de H₂O₂.^{395,396,399}

5.3.2 A Ação do BaP

Fazendo parte de uma numerosa classe de compostos químicos, conhecida como HPAs, o BaP é especificamente considerado, por seu amplo e suficiente conjunto de evidências toxicológicas.⁸⁶ Apesar de se originar de fontes naturais, essa molécula figura entre os principais compostos HPAs de origem antropogênicas.⁸⁷ Normalmente associados com material particulado, podem encontrar na atmosfera, o principal veículo de deposição em ecossistemas aquáticos.⁴⁰⁹ E, uma vez na presença de organismos fotossintetizantes, o BaP, por seu efeito pode resultar no aumento da produção de EROs.^{137,139} Os resultados com *M. polymorphus* após exposição ao BaP, apontam considerável atividade da SOD seguida de uma pronunciada e evidente atividade tanto de CAT como de APx. O que denota, a julgar pelos valores das atividades enzimáticas frente aos controles, produção intensa de EROs (*i.e* H₂O₂ e O₂^{•-}) por parte das células (Tab. 5). Embora haja uma peculiar escassez de informações, decorrente da falta de experimentos envolvendo organismos fotossintetizantes e repostas antioxidantes frente à exposição aos HPAs. É importante ressaltar outros trabalhos evidenciando a SOD como um importante biomarcador de estresse em microalgas quando

desafiadas a diferentes metais (e.g. *L. polyedrum*,²⁷¹ *T. gracillis* e *Ditylum brightwelli*⁴¹⁰ frente ao Cd^{2+} e *S. bijugatus*⁴¹¹ sob ação de Cu^{2+}) ou quando sob exposição a poluentes orgânicos (e.g. *C. sorokiniana*⁴¹² frente ao paraquat). Os resultados obtidos com *M. polymorphus*, sob exposição ao BaP (Fig. 30B), seguem as mesmas tendências dos resultados com *S. armatus* expostas por 24h a 0,5 e 10 mg.L^{-1} de antraceno e fenantreno respectivamente, mostrando aumentos de atividade de SOD em até 200% em relação aos controles. Porém, esses valores foram dependentes da irradiância e da concentração de CO_2 quando tratadas com antraceno e, apenas dependente da irradiância quando sob ação do fenantreno.³⁷⁶ Um outro estudo envolvendo a alga *E. intestinalis* exposta a uma solução de BaP por 60 min, mostrou 40% remoção de BaP do meio de cultura, no entanto na presença de inibidores de CAT e peroxidases a remoção não passou de 20%, o que nos leva a crer, na dependência de enzimas antioxidantes durante o processo de metabolização de BaP.²⁵ Contrariamente, experimentos envolvendo quatro diferentes espécies de microalgas expostas a 0,1 e 1,0 mg.L^{-1} de pireno, durante sete dias, não mostraram variações estatisticamente significativas nas atividades de SOD.⁴¹³ No entanto, uma leitura mais atenta do referido trabalho mostra que os autores não consideraram concentrações efetivas de inibição do crescimento durante o ensaio, o que pode resultar no uso de dosagens ineficientes. Os resultados antioxidantes obtidos nos ensaios com *M. polymorphus* revelam respostas fisiológicas da diatomácea frente a uma produção considerável de EROs. Cabe aqui, portanto, uma discussão a cerca dos sítios preferenciais de produção de EROs, em organismos fotossintetizantes submetidas a ação de HPAs.

A literatura tem apontado sistemas de biotransformação de fase I em algas, como decorrente de ação de dioxigenases,^{381,414} aos moldes do que ocorre com

procariontes.⁴¹⁵ Uma vez que, alguns trabalhos utilizando HPLC-MS apontam a produção de derivados biotransformados de BaP com dihidrodiois vicinais na posição *cis* (e.g. *cis*-BaP-11-12-dihidrodiol, *cis*-BaP-7,8-dihidrodiol e *cis*-BaP-4,5-dihidrodiol).⁴¹⁴ Reações de incorporações de oxigênio em anéis aromáticos com estereoquímica *cis* são bastante características de dioxigenases (e.g. catecol dioxigenase) bacterianas.³⁷⁸ As dioxigenases multicomponentes de bactérias, diferentemente das monooxigenases (e.g. CYP450) não possuem um grupamento heme no sitio catalítico, ao contrário, possuem agregados ferro-enxofre que são coordenados por histidinas e cisteínas. Entretanto, processos de ativação para inserção de O₂ na molécula xenobiótica, podem resultar em centros com capacidade de formação de O₂^{•-}.^{416,417} Apesar das evidências aparentemente incontestáveis acerca dos processos de biotransformação de HPAs *via* catálise dioxigenásica em algas, alguns trabalhos mostram evidências, mesmo que tênues, da ação de sistemas monooxigenásicos *via* CYP450 (*vide* item 1.3.2.1 e Fig. 3).³⁰⁴ Primeiramente, os experimentos com macro algas da região ártica, especialmente a Phaeophyta *Laminaria saccharina* que, após reações de hidroxilação, converteu o PCB 3-cloro bifenila em nonohidroximonocloro bifenila.²¹¹ E, finalmente os trabalhos envolvendo *C. sorokiniana* e *C. fusca* que na presença do pró-herbicida metflurazon, após reação de *N*-desmetilação, tornou-se extremamente tóxico para as algas. Porém, no mesmo experimento, o uso de inibidores de CYP450 (e.g. piperonilbutoxido) manteve as algas intactas. Além disso, testes adicionais com anticorpos policlonais anti-etoxicumarina-*o*-dealquilase, sugerem fortemente a presença de distintas famílias de CYP450 no processo de biotransformação de metflurazon.³⁰⁵ A despeito da disputa científica acerca dos processos de biotransformação *via* dioxigenases ou monooxigenases, o importante a ser

considerado é que os dois processos podem figurar como fonte importante de EROs, o primeiro como produção direta de $O_2^{\bullet-}$ e o segundo produzindo $O_2^{\bullet-}$ e H_2O_2 (*vide* item 1.6.2.1 e Fig. 12).

Além da biotransformação de HPAs figurar como importante fonte de geração de EROs, contribuindo para as respostas antioxidantes encontradas nos ensaios de *M. polymorphus*, a interferência de HPAs na fotossíntese também precisam ser consideradas nesse contexto. Alguns trabalhos com comunidades fitoplactônicas provenientes do Lago Eire nos EUA, quando submetida a dosagens de antraceno variando de 0,2 a 2 mg.L⁻¹ ou, quando expostas ao seu produto fotoativado 1,2-dihidroxi-antraquinona, tem mostrado forte inibição na eficiência de PSII.⁴¹⁸ A interferência de HPAs nos sistemas fotossintéticos também tem sido confirmada em tilacóides isolados em experimentos com a planta aquática *Lemna gibba*. Nesse experimento, o estresse oxidativo foi caracterizado quando essas plantas, na presença também de 1,2-dihidroxi-antraquinona, mostraram uma total inibição da cadeia de transporte de elétrons tilacoidal.⁴¹⁹ Mantendo-se o *pool* de plastoquinona completamente reduzido pela inibição do citocromo *b6/f*, a situação torna-se extremamente favorável para geração de ROS, uma vez que, Me^{n+} liberados na condição de estresse, podem catalisar a transferência desses elétrons da plastoquinona para o O_2 , formando espécies como $O_2^{\bullet-}$, H_2O_2 e mesmo $\bullet OH$.⁴¹⁹ Além disso, é sabido que na presença de HPAs a fixação de carbono no *ciclo de Calvin* pode ficar comprometida, uma vez que a alteração do transporte de prótons pelo PSII pode levar a acidificação do espaço tilacoidal induzindo a um incremento nas taxas de redução do O_2 com formação de $O_2^{\bullet-}$ através das reações de *Mehler*.³⁷⁶

Uma resposta complementar a esse quadro complexo de fontes de produção de EROs na presença HPAs, foi verificada ao observar-se que os resultados das atividades de GR e DHAR nos ensaios com *M. polymorphus* mantiveram-se semelhantes ao controle. A manutenção dos níveis dessas enzimas merece atenção, considerando-se o papel dos antioxidantes não enzimáticos GSH e Asc⁻ (vide item 1.6.1.1 e Fig. 8) na depleção de EROs contra lipoperoxidação (vide item 1.6.1.3. e Fig. 10) e, a importância no funcionamento do *ciclo ascorbato-glutationa* durante a atividade de APx (vide item 1.6.1.2 e Fig 9). Assim, diferentemente do que ocorreu com as culturas tratadas com OxF, as culturas de *M. polymorphus* sob a ação de BaP, apresentaram níveis de MDA-TBA₂, significativamente menores (Fig. 33).

No entanto, cabe aqui ressaltar o fato da fotoativação de HPAs com produção de intermediários altamente reativos (e.g. BaP-3,6-quinona, BaP-6-hidroxi, etc.). Experimentos usando *S. capricornutum*, mostram forte inibição de crescimento da cultura exposta ao BaP em função da fonte de luz.³⁷⁹ Inúmeros trabalhos usando plantas superiores, também demonstram diminuição de crescimento⁴²⁰ ou, formação de quadros necróticos foliares⁴²¹ quando expostas a antraceno ou HPAs correlatos na presença de irradiação solar intensa. Paralelamente a ação lesiva de HPAs fotoativados, alguns trabalhos em lipossomos mostraram a ação sinérgica entre os antioxidantes Asc⁻ e α -tocoferol para impedir a propagação de reações de lipoperoxidação.⁴²² Embora as análises de α -tocoferol não tenha feito parte do escopo desse trabalho, os resultados das análises dos níveis de Asc⁻ em *M. polymorphus* expostas ao BaP, mostraram que, diferentemente das culturas tratadas com OxF, as células não apresentaram variação significativa no conteúdo de Asc⁻ frente ao controle. Esses dados são

sustentados por trabalhos que correlacionam a manutenção dos níveis de Asc⁻, com a diminuição do dano na membrana lipídica em plantas superiores (Fig. 40).⁴²³

Como parte integrante do sistema de biotransformação de fase I (via dioxigenases ou monooxigenases) os organismos fotossintetizantes ainda utilizam a enzimas de conjugação como protagonistas nos estágios de biotransformação de fase II (*vide* item 1.6.2.2 e Fig.13).³¹⁰ Apresentando-se mais ativa do que nos teste com OxF, a atividade de GST em *M. polymorphus* expostas ao BaP, pode estar relacionada com a diminuição de mais de 50% dos níveis de GSH, (Fig. 37) provavelmente usada nas reações de conjugação, o que denota um aumento no IR de GSH em 75% (fig. 36 e 37). Todavia, é importante lembrar as múltiplas funções de GST em organismos fotossintetizantes, tal característica atribui a essa enzima, a utilização de GSH também na eliminação de peróxidos.^{311,313} Essa característica ganha mais notoriedade na medida em que *M. polymorphus*, diferentemente dos resultados obtidos na exposição ao OxF, não utiliza a estratégia de excreção de H₂O₂ quando sob ação de BaP (Fig. 41). Embora, alguns trabalhos, envolvendo diferentes espécies de algas verdes, mostrem diversidade nas respostas fisiológicas frente ao estresse,⁴⁰⁶ nossos resultados apontam diferentes soluções fisiológicas em um mesmo organismo frente a compostos com propriedades químicas diversas.

5.4 Experimentos *K. alvarezii*

Apesar do caráter inédito de quantificar e caracterizar o CYP450 em *K. alvarezii* (Fig.42). A metodologia atual se mostrou pouco adaptável mesmo para o estudo com macro algas. A elevada quantidade necessária de material biológico fresco, associado a um protocolo de de extração de grupos fenólicos pouco

eficiente resultou, na maioria das vezes, em uma fração microsomal inadequada para leitura em espectrofotômetro. Apesar dessas dificuldades, os resultados do espectro de absorção de CYP450, obtidos com *K. alvarezii* mostraram-se muito semelhantes aos resultados encontrados em outros grupos trabalhando com algas²¹¹ e plantas.³⁰⁶ Obviamente que a presença de CYP450 em organismos fotossintetizantes é algo esperado, uma vez que se trata de um complexo enzimático com múltiplas famílias e com inúmeras participações em processos metabólicos.²⁸⁸ No entanto, ao contrário do que acontece em mamíferos, algumas famílias de CYP450 (e.g. CYP 450 1A1) são expressas na presença de xenobióticos (e.g. HPAs, Herbicidas, PCBs, Dioxinas, etc), possuindo uma atividade EROD/ECOD característica.¹⁹¹ Assim, além da caracterização do espectro de CYP450, um ensaio da atividade, poderia nos dar mais informações acerca das famílias envolvidas na transformação de xenobiótico. Todavia, dada a dificuldade em se desenhar ensaios ecotoxicológicos com macro algas na presença de xenobióticos, de forma a induzir famílias com essas propriedades catalíticas, optou-se por postergar esses projetos para um tempo futuro.

5.5 Algas como indicadores universais

Os resultados de avaliações toxicológicas em invertebrados e peixes, são considerados por muitos órgãos de regulamentação e, por alguns setores da comunidade científica, como dados representativos da biota marinha.¹⁹⁴ Entretanto, alguns estudos contrastando essas tendências apontam, algas sendo mais sensíveis quando na presença de poluentes (e.g. metais pesados, efluentes industriais, herbicidas, hidrocarbonetos aromáticos, etc.).¹⁹⁶⁻¹⁹⁹ No entanto, a ideia de uma espécie (animal ou vegetal) como modelo ideal e bioindicador universal,

não é de fato realista.²¹⁸ Tão pouco razoável é porém, assumir que dados de toxicidade obtidos em animais possam ser estendidos para flora aquática marinha ou de água-doce. Uma vez, que as sensibilidades relativas, entre animais e plantas tem se mostrado espécie-química específicas, sendo assim, de difícil interpolação. Conseqüentemente, dados sobre a fitotoxicidade são igualmente necessários, e contribuem para no melhor delineamento na avaliação do impacto de potenciais contaminantes no ambiente aquático.

6. CONCLUSÕES

6.1 Ensaio toxicológico

- As culturas de *M. polymorphus* em meio *f/2* mostraram-se adequadas para ensaios toxicológicos. Além disso, a substituição do protocolo de contagem pela fluorescência *in vivo* da clorofila, resultou em mais rapidez na análise e um maior número de pontos amostrais. Nem o BaP nem o OxF absorvem no comprimento de onda de excitação da clorofila;
- Os testes toxicológicos, feitos em 48h de exposição com uma concentração inicial de 1×10^6 células.mL⁻¹, produziram pouca variação no pH e uma massa de células, ao final do experimento, suficiente para os ensaios enzimáticos e em HPLC;
- A concentração efetiva dos agentes tóxicos determinados com base na inibição em 50% da taxa (μ) de crescimento celular diária (IC₅₀), se mostrou equivalente tanto pela fluorescência como por contagem celular. Os resultados revelam elevada sensibilidade da alga aos dois xenobióticos, sendo o OxF mais tóxico que o BaP;
- Durante os testes de toxicidade o OxF não provocou discrepâncias estatisticamente significativas entre a fluorescência da clorofila e a densidade celular e a intensidade luminosa de 60 W.m⁻² durante os ensaios, supõe-se não suficiente para causar fotodecomposição acentuada da molécula. Os ensaios toxicológicos com BaP em meio de cultura sem suplemento adicional de CO₂ gasoso, não desenvolveram qualquer alcalinidade do meio que pudesse comprometer o teste toxicológico;
- As reações fotoquímicas e/ou de biotransformação e, as reações de fotorredução durante evolução do O₂, supõe-se vias responsáveis pelo incremento de EROs nas culturas expostas ao BaP e OxF respectivamente;

6.2 Marcadores de estresse oxidativo

- As culturas de *M. polymorphus* expostas ao OxF e ao BaP tiveram respostas enzimáticas distintas. Sob exposição ao OxF a SOD teve uma maior participação e, sob a ação de BaP as respostas maiores foram da CAT e APx;
- As células expostas ao OxF e ao BaP tiveram respostas diferentes frente ao consumo de antioxidantes não enzimáticos. Houve um menor consumo de GSH associado a um maior consumo de Asc⁻ nas células expostas ao OxF. E, um comportamento inverso foi observado nas células expostas ao BaP;
- As células de *M. polymorphus* tiveram respostas dicotômicas frente à produção de H₂O₂. Quando sob exposição ao OxF a regulação da evolução de H₂O₂ intracelular foi feita por mecanismos de excreção/extravasamento diretamente no meio celular. Nas células expostas ao BaP o mecanismo foi através de eliminação enzimática;
- As culturas de *M. polymorphus* expostas ao OxF apresentaram um maior nível de MDA-TBA₂ supondo-se mais susceptíveis a ação dos efeitos do herbicida quando comparadas as culturas expostas ao BaP;
- A análise do aparato enzimático e não-enzimático frente à geração de EROs em organismos expostos a xenobióticos, mostrou-se uma ferramenta importante em estudos toxicológicos, revelando diferentes alternativas de um mesmo organismo frente a compostos químicos com propriedades distintas.

7. BIBLIOGRAFIA

- ¹ Schindler, D. W. (1996) Ecosystems and ecotoxicology: a personal perspective. In *Ecotoxicology. A Hierarchical Treatment*. (Newman, M.C. e Jagoe, H. Eds.), CRC, Boca Raton, Florida. pp. 371-398.
- ² Rand, G.M.; Wells, P.G. e McCarty, L.S. (1995) Introduction to aquatic toxicology. In *Fundamentals of Aquatic Toxicology – Effects, Environmental Fate, and Risk Assessment*. (Rand, G.M. Ed.), 2nd ed. Taylor & Francis, Londres. pp.3-67.
- ³ Ward, G.S. (1995) Salt water tests. In *Fundamentals of Aquatic Toxicology – Effects, Environmental Fate, and Risk Assessment* (Rand, G.M. Ed.), 2nd ed. Taylor & Francis, Londres. pp. 103–133.
- ⁴ Goldberg, E.D. (1995) Emerging problems in the coastal zone for the twenty-first century. *Mar. Pollut. Bull.* **31**, 152-158.
- ⁵ Torres, M.A.; Barros, M.P.; Campos, S.C.G.; Pinto, E.; Rajamani, S.; Sayre, R. e Colepicolo, P. (2008) Biochemical biomarkers in algae and marine pollution: A review. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **71**, 1-15.
- ⁶ Moore, M.N.; Depledge, M.H.; Readmen, J.W. e Leonard, D.R.P. (2004) An integrated biomarker-based strategy for ecotoxicological evaluation of risk in environmental management. *Mutat. Res.* **552**, 247–268.
- ⁷ His, E.; Beiras, R. e Seaman, M.N.L. (1999) The assessment of marine pollution. In *Advances in Marine Pollution* (Southward, A.J.; Tyler, P.A. e Young, C.M. Eds.) Academic Press, Londres. pp. 2 – 139.
- ⁸ Swaminathan, M.S. (2003) Bio-diversity: an effective safety net against environmental pollution. *Environ. Pollut.* **126**, 287–291.
- ⁹ Islam, Md. S. e Tanaka, M. (2004) Impacts of pollution on coastal and marine ecosystem including coastal and marine fisheries and approach for management: a review and synthesis. *Mar. Pollut. Bull.* **48**, 624-649.
- ¹⁰ Quayle, D.V. (1992) Plastic in the marine environment: problems and solutions. *Chem. Ecol.* **6**, 69-78.
- ¹¹ Cloern, J.E. (2001) Our evolving conceptual model of the coastal eutrophication problem. *Mar. Ecol. Progr. Ser.* **210**, 223-253.
- ¹² Li, Y.F. e Macdonald, R.W. (2005) Sources and pathways of selected organochlorine pesticides to the Arctic and the effect of pathway divergence on HCH trends in biota: a review. *Sci. Total Environ.* **342**, 87-106.
- ¹³ Haynes, D. e Johnson, J.E. (2000) Organochlorine, heavy metal and polyaromatic hydrocarbon pollutant concentrations in the Great Barrier Reef (Australia) environment: a review. *Mar. Pollut. Bull.* **41**, 7–12.
- ¹⁴ Almeida, E.A. (2003) *Avaliação de Variações Bioquímicas em Moluscos Bivalves em Resposta ao Estresse Ambiental*. Tese de Doutorado. Instituto de Química, USP, São Paulo, SP, Brasil.
- ¹⁵ IBGE (2005) Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - Pesquisa de informações básicas municipais. Perfil dos Municípios Brasileiros – Meio Ambiente 2002. Ministério do Planejamento, Orçamento e Gestão. Rio de Janeiro. pp 185 – 217.
- ¹⁶ Farinaccio, A. (2008) *Impactos na Dinâmica Costeira Decorrentes de Intervenções em Praias Arenosas e Canais Estuarinos de Áreas Densamente Ocupadas no Litoral de São Paulo, Uma Aplicação do Conhecimento às Áreas Não Ocupadas*. Tese de Doutorado, Instituto Oceanográfico, USP, São Paulo, Brasil.

- ¹⁷ Lovejoy, T.E. (1997) Biodiversity: What is it? In *Biodiversity II: Understanding and Protecting Our Biological Resources* (Reaka-Kuda, M.K.; Wilson, D.E. e Wilson, E.O. Eds.) Joseph Henry Press, Washington DC. pp. 7-14.
- ¹⁸ Derraik, J.G.B. (2002) The pollution of the marine environment by plastic debris: a review. *Mar. Pollut. Bull.* **44**, 842-852.
- ¹⁹ Rice, J. (2003) Environmental health indicators. *Ocean Coast. Man.* **46**, 235–259.
- ²⁰ Williams, C. (1996) Combating marine pollution from land-based activities: Australian initiatives. *Ocean Coast. Man.* **33**, 87-112.
- ²¹ Shen, L.; Wania, F.; Lei, Y.D.; Teixeira, C.; Muir, D.C.G. e Bidleman, T.F. (2005) Atmospheric distribution and long-range transport behavior of organochlorine pesticides in North America. *Environ. Sci. Technol.* **39**, 409–420.
- ²² Spacie, A. e Hamelink, J.L. (1985) Bioaccumulation. In *Fundamentals of Aquatic Toxicology* (Rand, G.M. e Petrocelli, S.R. Eds.) Hemisphere Publishing, Washington DC. pp. 495-525.
- ²³ Wania, F. e Mackay, D. (1996) Tracking the distribution of persistent organic pollutants. *Environ. Sci. Technol.* **30**, 390-396.
- ²⁴ Montone, R.C.; Taniguchi, S.; Sericano, J. Weber, R.R. e Iara, W.H. (2001) Determination of polychlorinated biphenyls in antarctic macroalgae *Desmarestia* sp. *Sci. Total Environ.* **277**, 181-186.
- ²⁵ Kirso, U. e Irha, N. (1998) Role of algae in fate of carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons in the aquatic environment. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **41**, 83-89.
- ²⁶ Dachs, J.; Eisenreich, S.J.; Baker, J.E.; Ko, F.-C. e Jeremiason, J.D. (1999) Coupling of phytoplankton uptake and air-water exchange of persistent organic pollutants. *Environ. Sci. Technol.* **33**, 3653–3660.
- ²⁷ Binelli, A. e Provini, A. (2003) The PCB pollution of Lake Iseo (N. Italy) and the role of biomagnification in the pelagic food web. *Chemosphere* **53**, 143-151.
- ²⁸ Okay, O.S.; Donkin, P.; Peters, L.D. e Livingstone, D.R. (2000) The role of algae *Isochrysis galbana* enrichment on the bioaccumulation of benzo[a]pyrene and its effects on the blue mussel *Mytilus edulis*. *Environ. Pollut.* **110**, 103-113.
- ²⁹ HELCOM (2001) Helsinki Commission - Baltic marine environment protection commission - Polychlorinated biphenyls, Helsinki, Finlândia, 25pp.
- ³⁰ Tanabe, S. (1988) PCB problems in the future: foresight from current knowledge. *Environ. Pollut.* **50**, 5-28.
- ³¹ GESAMP (1990) Group of Experts on the Scientific Aspect of Marine Pollution - The state of the marine environment. *UNEP Reg. Seas Report Studies* No. **115**.
- ³² Geyer, H.; Freitag, D. e Korte, F. (1984) Polychlorinated biphenyls (PCBs) in the marine environment, particularly in the Mediterranean. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **8**, 129-151.
- ³³ Jeong, G.H.; Kim, H.J.; Joo, Y.J.; Kim, Y.B. e So, H.Y. (2001) Distribution characteristics of PCBs in the sediments of lower Nakdong River, Korea. *Chemosphere*. **44**, 1403-1411.

- ³⁴ Brumley, C.M.; Haritos, V.S.; Ahokas, J.T. e Holdway, D.A. (1995) Validation of biomarkers of marine pollution exposure in sand flathead using Arochlor 1254. *Aquat. Toxicol.* **31**, 249-262.
- ³⁵ Nhan, D.D.; Carvalho, F.P.; Am, N.M.; Tuan, N.Q.; Yen, N.T.; Villeneuve, J.P. e Cattini, C. (2001) Chlorinated pesticides and PCBs in sediments and mollusks from freshwater canals in the Hanoi region. *Environ. Pollut.* **112**, 311-320.
- ³⁶ Miao, X.S.; Swenson, C.; Woodward, L.A. e Li, Q.X. (2000) Distribution of polychlorinated biphenyls in marine species from French Frigate Shoals, North Pacific Ocean. *Sci. Total Environ.* **257**, 17-28.
- ³⁷ Bush, B.; Streeter, R.W. e Sloan, R.J. (1990) Polychlorobiphenyl (PCB) congeners in striped bass *Morone saxatilis* from marine and estuarine waters of New York state determined by capillary gas chromatography. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **19**, 46-61.
- ³⁸ Leitão, M.A.S.; Cardozo, K.H.M.; Pinto, E. e Colepicolo, P. (2003) PCB-induced oxidative stress in the unicellular marine dinoflagellate *Lingulodinium polyedrum*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **45**, 59-65.
- ³⁹ Najdek, M. e Bazulic, D. (1988) Chlorinated hydrocarbons in mussels and some benthic organisms from the northern Adriatic sea. *Mar. Pollut. Bull.* **19**, 37-38.
- ⁴⁰ Sáenz, M.E.; Alberdi, J.L.; Di Marzio, W.D.; Accorinti, J. M. C. e Tortorelli, M.C. (1997) Paraquat toxicity in different green algae. *Environ. Cont. Toxicol.* **58**, 922-928.
- ⁴¹ Okamura, H.; Aoyama, I.; Liu, D.; Maguire, R.J.; Pacepavicius, G.J. e Lau, Y.L. (2000) Fate and ecotoxicity of the new antifouling compound Irgarol 1051 in the aquatic environment. *Wat. Res.* **34**, 3523-3530.
- ⁴² Ma, J.; Zheng, R.; Xu, L. e Wang, S. (2002) Differential sensitivity of two green algae, *Scenedesmus obliquus* and *Chlorella pyrenoidosa*, to 12 pesticides. *Ecotox. Environ. Saf.* **52**, 57-61.
- ⁴³ Geoffroy, L.; Frankart, C. e Eullaffroy, P. (2004) Comparison of different physiological parameter responses in *Lemna minor* and *Scenedesmus obliquus* exposed to herbicide flumioxazin. *Environ. Pollut.* **131**, 233-241.
- ⁴⁴ Strandberg, M.T. e Scott-Fordsmand, J.J. (2002) Field effects of simazine at lower trophic levels – a review. *Sci. Total Environ.* **296**, 117-137.
- ⁴⁵ Traunspurger, W.; Schäfer, H. e Remde, A. (1996) Comparative investigation on the effect of a herbicide on aquatic organisms in single species tests and aquatic microcosms. *Chemosphere* **33**, 1129-1141.
- ⁴⁶ Duursna, E.K. e Marchand, M. (1974) Aspects of organic marine pollution. *Ocean. Mar. Biol. Ann. Rev.* **12**, 315- 431.
- ⁴⁷ Barr, D.B. e Needham, L.L. (2002) Analytical methods for biological monitoring of exposure to pesticides: a review. *J. Chrom. B* **778**, 5-29.
- ⁴⁸ Lei Nº 7.802 11 de julho (1989) Regulamento dispõe sobre a pesquisa, a experimentação, a produção, a embalagem e rotulagem, o transporte, o armazenamento, a comercialização, a propaganda comercial, a utilização, a importação, a exportação, o destino final dos resíduos e embalagens, o registro, a classificação, o controle, a inspeção e a fiscalização de agrotóxicos, seus componentes e afins, e dá outras providências. *Diário Oficial da República Federativa do Brasil*, Brasília.
- ⁴⁹ Lydy, M.J.; Lohner, T.W. e Fisher, S.W. (1990) Influence of pH, temperature and sediment type on the toxicity, accumulation and degradation of parathion in aquatic systems. *Aquat. Toxicol.* **17**, 27-44.

-
- ⁵⁰ Warren, N.; Allan, I.J.; Carter, J.E.; House, W.A. e Parker, A. (2003) Pesticides and other micro-organic contaminants in freshwater sedimentary – a review. *Apl. Geochem.* **18**, 159-194.
- ⁵¹ Bromilow, R.H.; Carvalho, R.F.; Evans, A.A. e Nichols, P.H. (2006) Behavior of pesticides in sediment/water systems in outdoor mesocosms. *J. Environ. Sci. Health B.* **41**, 1-16.
- ⁵² Navarro, S.; Vela, N. e Navarro, G. (2007) An overview on the environmental behavior of pesticide residues in soils. *Spanish J. Agric. Res.* **5**, 357-375.
- ⁵³ Zi-Wei, Y.; Gui-Bin, J.; Heng-Zhen, X. (2002) Distribution of organochlorine pesticides in seawater of the Bering and Chukchi Sea. *Environ. Pollut.* **116**, 49-56.
- ⁵⁴ Jonsson, C.M. (2005) *Fosfatase ácida da microalga Selenastrum capricornutum: Extração, caracterização e efeito de poluentes de origem agrícola*. Tese de Doutorado. Instituto de Biociências, UNICAMP, Campinas, SP, Brasil.
- ⁵⁵ Larson, S.J.; Capel, P.D.; Goolsby, D.A.; Zaugg, S.D. e Sandstorm, M.W. (1995) Relations between pesticide use and riverine flux in the Mississippi River basin. *Chemosphere.* **31**, 3305-3321.
- ⁵⁶ Pereira, W.S.P. (1987) Herbicida de pré-emergência – Oxifluorfen. *Ser. Tec. IPEF.* **12**, 45-60.
- ⁵⁷ USEPA (2002) US Environmental Protection Agency - Oxyfluorfen: registration eligibility decision (RED). Report No. EPA 738-R-02-014. Washington, DC.
- ⁵⁸ PIDPID (1987) CAN Pesticide Information Division of the Plant Industry Directorate - Food production and inspection branch: Oxyfluorfen. Discussion Doc. D087-01
- ⁵⁹ Resgalla, C.; Noldin, J.A.; Santos, A.L.; Sato, G. e Eberhardt, D.S. (2002) Toxicidade aguda de herbicidas e inseticidas utilizados na cultura do arroz irrigado sobre juvenis de carpa *Cyprinus carpio*. *Rev. Ecotox. Meio Amb.* **12**, 59-68.
- ⁶⁰ Theodoridis, G.; Bahr, J.T.; Hotzman, F.W.; Sehgel, S. e Suarez, D.P. (2000) New generation of PROTOX-inhibiting herbicides. *Crop Protec.* **19**, 533-535.
- ⁶¹ Cassamassimo, R.E. (2005) Dissipação e mobilidade dos herbicidas glifosato e oxifluorfen em um solo manejado no sistema de cultivo mínimo e florestado com *Eucalyptus grandis*. Dissertação de mestrado. ESALQ, Piracicaba, SP, Brasil.
- ⁶² Geoffroy, L.; Dewez, D.; Vernet, G. e Popovic, R. (2003) Oxyfluorfen toxic effect on *S. obliquus* evaluated by different photosynthetic and enzymatic biomarkers. *Environ. Cont. Toxicol.* **45**, 445-452.
- ⁶³ Sandmann, G.; Reck, H. e Böger, P. (1984) Herbicidal mode of action on chlorophyll formation. *J. Agric. Food Chem.* **32**, 868-872.
- ⁶⁴ Scrano, L.; Bufo, S.A.; D'Auria, M. e Emmelin, C. (1999) Photochemical behavior of oxyfluorfen: a diphenyl-ether herbicide. *J. Photochem. Photobiol.* **129**, 65-70.
- ⁶⁵ Matsumoto, H.; Lee, J.J. e Ishizuka, K. (1993) A rapid and strong inhibition of protoporphyrinogen oxidase from several plant species by oxyfluorfen. *Pest. Biochem. Physiol.* **47**, 113-118.

- ⁶⁶ Choi, J.S.; Lee, H.J.; Hwang, I.T.; Pyon, J.Y. e Cho, K.Y. (1999) Differential susceptibilities of wheat and barley to diphenyl ether herbicide oxyfluorfen. *Pest. Biochem. Physiol.* **65**, 62-72.
- ⁶⁷ Geoffroy, L.; Teisseire, H.; Couderchet, M. e Vernet, G. (2002) Effect of oxyfluorfen and diuron alone and mixture on antioxidative enzymes of *Scenedesmus obliquus*. *Pesticide* **72**, 178-185.
- ⁶⁸ Eckhardt, U.; Grimm, B. e Hortensteiner, S. (2004) Recent advances in chlorophyll biosynthesis and breakdown in higher plants. *Plant Mol. Biol.* **56**, 1-14.
- ⁶⁹ Brusslan, J.D. e Peterson, M.P. (2002) Tetrapyrrole regulation of nuclear gene expression. *Photosynth. Res.* **71**, 185-194.
- ⁷⁰ Beale, S.J. (1999) Enzymes of chlorophyll biosynthesis. *Photosynth. Res.* **60**, 43-73.
- ⁷¹ Rytter, S.W. e Tyrrel, R.M. (2000) The heme synthesis and degradation pathways: role in oxidant sensitivity. *Free Rad. Biol. Med.* **28**, 289-309.
- ⁷² Pornprom, T.; Matsumoto, H.; Usui, K. e Ishizuka, K. (1994) Characterization of oxyfluorfen tolerance in selected soybean cell line. *Pest. Biochem. Physiol.* **50**, 107-114.
- ⁷³ Matsumoto, H.; Kashimoto, Y. e Warabi, E. (1999) Basis for common chickweed *Stellaria media* tolerance to oxyfluorfen. *Pest. Biochem. Physiol.* **64**, 47-53.
- ⁷⁴ Warabi, E.; Usui, K.; Tanaka, Y. e Matsumoto, H. (2001) Resistance of a soybean cell line to oxyfluorfen by overproduction of mitochondrial protoporphyrinogen oxidase. *Pest. Manag. Sci.* **57**, 743-748.
- ⁷⁵ Orr, G.L. e Hess, F. D. (1982) Mechanism of action of diphenyl ether herbicide acifluorfen-methyl in excised cucumber *Cucumis sativus* L. *Plant Physiol.* **69**, 502-507.
- ⁷⁶ Jacobs, J.M.; Jacobs, N.J.; Sherman, T.D. e Duke, S.O. (1991) Effect of diphenyl ether herbicides on oxidation of protoporphyrin in organellar and plasma membrane enriched fractions of barley. *Plant Physiol.* **97**, 197-203.
- ⁷⁷ Jacobs, M.J. e Jacobs, N.J. (1993) Porphyrin accumulation and export by isolated barley *Hordeum vulgare* plastids. *Plant Physiol.* **101**, 1181-1187.
- ⁷⁸ Aizawa, H. e Brown, H.M. (1999) Metabolism and degradation of porphyrin biosynthesis herbicides. In *Peroxidizing Herbicides* (Börger, P e Wakabayashi, K. Eds.) Springer-Verlag, Berlin. pp. 348-381.
- ⁷⁹ Watanabe, K.; Otori, Y.; Sato, Y.; Börger, P. e Wakabayashi, K. (2001) Changes in fatty acid composition of neutral lipid in mug bean cotyledons by oxyfluorfen-induced peroxidation. *Pest. Biochem. Physiol.* **69**, 166-173.
- ⁸⁰ Halliwell, B. (1987) Oxidative damage, lipid peroxidation and antioxidant protection in chloroplast. *Chem. Phys. Lip.* **44**, 327-339.
- ⁸¹ Owen, J. (1999) The environmental management of oil tanker routes in UK waters. *Mar. Policy.* **23**, 289-306.
- ⁸² Wake, H. (2005) Oil refineries: a review of their ecological impacts on the aquatic environment. *Est. Coast. Shelf Sci.* **62**, 131-140.
- ⁸³ Brekke, C. e Solberg, A.H.S. (2005) Oil spill detection by satellite remote sensing. *Rem. Sens. Environ.* **95**, 1013.

- ⁸⁴ Wang, Z. e Fingas, M.F. (2003) Development of oil hydrocarbon fingerprinting and identification techniques. *Mar. Pollut. Bull.* **47**, 423-452.
- ⁸⁵ Neff, J.M. (1990) Composition and fate of petroleum and spill-treating agents in the marine environment. In: *Seal Mammals and Oil: Confronting the Risks*. (Geraci, J.R. e St. Aubin, D.J. Eds.). Academic Press, San Diego, pp. 1-34.
- ⁸⁶ Xue, W. e Warshawsky, D. (2004) Metabolic activation of polycyclic and heterocyclic aromatic hydrocarbons and DNA damage: A review. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **206**, 73-93.
- ⁸⁷ USDHHS (1995) US Department of Health and Human Service - Toxicological profile for polycyclic aromatic hydrocarbon. ATSDR – Agency for Toxic Substances and Diseases Registry. pp. 497.
- ⁸⁸ Menzie, C.A.; Potocki, B.B.; Santodaonato, J. (1992) Exposure to carcinogenic PAHs in the environmental. *Environ. Sci. Technol.* **26**, 1278-1284.
- ⁸⁹ Coombs, M.M.; Dixon, C. e Kissonerghis, A.M. (1976) Evaluation of the mutagenicity of compounds of known carcinogenicity, belonging to the benz[a]anthracene, chrisene, and cyclopenta[a]phenanthrene series, using Ames's test. *Canc. Res.* **36**, 4525-4529.
- ⁹⁰ Bachechi, E. e Polcaro, C. (1999) Crystal structures of trans-tetrahydrotols of benz[a]pyrene and chrisene: a possible structure-activity relationship in quasi-planar bay-region polycyclic aromatic hydrocarbons. *Struc. Chem.* **10**, 135-148.
- ⁹¹ Sviháková-Sindlerová, L.; Machala, M.; Pencíková, K.; Marvanová, S.; Neca, J.; Topinka, J.; Sevastyanova, O.; Kozubík, A. e Vondráček, J. (2007) Dibenzanthracenes and benzochrysenes elicit both genotoxic and nongenotoxic events in rat liver 'stem-like' cells. *Toxicology.* **232**, 147-159.
- ⁹² Dai, J.; Xu, M.; Chen, J.; Yang, X. e Ke, Z. (2007) PCDD/F, PAH and heavy metals in the sewage sludge from six wastewater treatment plants in Beijing, China. *Chemosphere.* **66**, 353-361.
- ⁹³ Pan, L.; Ren, J. e Liu, J. (2005) Effects of benzo[k]fluoranthene exposure on the biomarkers of scallop *Chlamys farreri*. *Comp. Biochem. Physiol. C.* **141**, 248-256.
- ⁹⁴ Woo, S.; Kim, S.; Yum, S.; Yim, U.H. e Lee, T.K. (2006) Comet assay for the detection of genotoxicity in blood cells of flounder *Paralichthys olivaceus* exposed to sediments and polycyclic aromatic hydrocarbons. *Mar. Pollut. Bull.* **52**, 1768-1775.
- ⁹⁵ Kim, J.Y.; Chung, J.Y.; Park, J.E.; Lee, S.G.; Kim, Y.J.; Cha, M.S.; Han, M.S.; Lee, H.J.; Yoo, Y.H. e Kim, J.M. (2007) Benzo[a]pyrene induces apoptosis in RL95-2 human endometrial cancer cells by cytochrome P450 1A1 activation. *Endocrinology.* **148**, 5112-5122.
- ⁹⁶ Chakravarti, D.; Venugopal, D.; Mailander, P.C.; Meza, J.L.; Higginbotham, S.; Cavalieri, E.L. e Rogan, E.G. (2008) The role of polycyclic aromatic hydrocarbon-DNA adducts in inducing mutations in mouse skin. *Mut. Res.* **649**, 161-178.
- ⁹⁷ Warshawsky, D. e Xue, W. (2005) Metabolic activation of polycyclic and heterocyclic aromatic hydrocarbons and DNA damage: a review. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **206**, 73-93.
- ⁹⁸ Bevan, D.R.; Riemer, S.C. e Lakowicz, J.R. (1981) Effects of particulate matter on rates of membrane uptake of polynuclear aromatic hydrocarbons. *J. Toxicol. Environ. Health.* **8**, 241-250.

- ⁹⁹ Sheu, H.L.; Lee, W.J.; Lin, S.J.; Fang, G.C.; Chang, H.C. e You, W.C. (1997) Particle-bound PAH content in ambient air. *Environ. Pollut.* **96**, 369-382.
- ¹⁰⁰ Broman, D.; Näf, C.; Lundbergh, I. e Zebühr, Y. (1990) An *in situ* study on the distribution, biotransformation and flux of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in the aquatic food chain (seston – *Mytilus edulis* L. – *Somateria mollissima* L.) from the Baltic: An ecotoxicological perspective. *Environ. Toxicol. Chem.* **9**, 429-442.
- ¹⁰¹ Kowalewska, G. (199) Phytoplakton – the main factor responsible for transport of polynuclear aromatic hydrocarbons from water to sediments in the Southern Baltic ecosystem (Extended abstract). *J. Mar. Sci.* **56** (Supl.), 219-222.
- ¹⁰² Venturini, N. e Tommasi, L.R. (2004) Polycyclic aromatic hydrocarbons and changes in the trophic structure of polychaete assemblages in sediments of Todos os Santos Bay, Northeastern, Brazil. *Mar. Pollut. Bull.* **48**, 97-107.
- ¹⁰³ Djomo, J.E.; Dauta, A.; Ferrier, V.; Narbonne, J.F.; Monkiedje, A.; Njine, T. e Garrigues, P. (2004) Toxic effects of some major polyaromatic hydrocarbons found in crude oil and aquatic sediments on *Scenedesmus subspicatus*. *Water Res.* **38**, 1817-1821.
- ¹⁰⁴ Meijer, S.N.; Sweetman, A.J.; Halsall, C.J. e Jones, K.C. (2008) Temporal trends of polycyclic aromatic hydrocarbons in the U.K. atmosphere: 1991-2005. *Environ. Sci. Technol.* **42**, 3213-3218.
- ¹⁰⁵ Manzo, S.; Nicola, F.; Picione, F.; Maisto, G. e Alfani, A. (2008) Assessment of the effects of soil PAH accumulation by a battery of ecotoxicological tests. *Chemosphere.* **71**, 1937-1944.
- ¹⁰⁶ Muri, G.; Wakeham, S.G. e Faganeli, J. (2003) Polycyclic aromatic hydrocarbons and black carbon in sediments of a remote alpine lake (Lake Planina, northwest Slovenia). *Environ. Toxicol. Chem.* **22**, 1009-1016.
- ¹⁰⁷ Martí, S.; Bayona, J.M. e Albaigés, J. (2001) A potential source of organic pollutants into the northeastern Atlantic: the outflow of the Mediterranean deep-lying waters through the Gibraltar Strait. *Environ. Sci. Technol.* **35**, 2682-2689.
- ¹⁰⁸ Botello, A.V.; García-Ruelas, C. e Ponce-Vélez, G. (2002) PAH levels in bivalve mollusks from the Mexican subtropical Pacific. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **69**, 486-493.
- ¹⁰⁹ Tian, Y.; Liu, H.J.; Zheng, T.L.; Kwon, K.K. Kim, S.J. e Yan, C.L. (2008) PAHs contamination and bacterial communities in mangrove surface sediments of the Jiulong River Estuary, China. *Mar. Pollut. Bull.* **57**, 707-715.
- ¹¹⁰ Lin, H.; Tao, S.; Zuo, Q. e Coveney, R.M. (2007) Uptake of polycyclic aromatic hydrocarbons by maize plants. *Environ. Pollut.* **148**, 614-619.
- ¹¹¹ Chen, G. e White, P.A. (2004). The mutagenic hazards of aquatic sediments: a review. *Mut. Res.* **567**, 151-225.
- ¹¹² Olajire, A.A.; Altenburger, R.; Küster, E. e Brack, W. (2005) Chemical and ecotoxicological assessment of polycyclic aromatic hydrocarbon - contaminated sediments of the Niger Delta, Southern Nigeria. *Sci. Total Environ.* **340**, 123-136.
- ¹¹³ Medeiros, P.M. e Bicego, M.C. (2004) Investigation of natural and anthropogenic hydrocarbon inputs in sediments using geochemical markers. II. Sao Sebastião, SP-Brazil. *Mar. Pollut. Bull.* **49**, 892-899.
- ¹¹⁴ Warshawsky, D.; Cody, T.; Radike, M.; Reilman, R.; Schumann, B.; LaDow, K. e Schneider, J. (1995) Biotransformation of benzo[a]pireno and other polycyclic aromatic hydrocarbons and heterocyclic analogs by several green algae and other algal species under gold and white light. *Chem. Biol. Interact.* **81**, 131-147.

- ¹¹⁵ Barra, R.; Castillo, C. e Torres, J.P. (2007) Polycyclic aromatic hydrocarbons in the South American environment. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* **191**,1-22.
- ¹¹⁶ Netto, A.D.; Cunha, I.F.; Muniz, F.C. e Rego, E.C. (2004) Polycyclic aromatic hydrocarbons in street dust of Niterói City, RJ, Brazil. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **72**, 829-835.
- ¹¹⁷ Martins, C.C.; Mahiques, M.M.; Bicego, M.C.; Fukumoto, M.M. e Montone R.C. (2007) Comparison between anthropogenic hydrocarbons and magnetic susceptibility in sediment cores from the Santos Estuary, Brazil. *Mar. Pollut. Bull.* **54**, 240-246.
- ¹¹⁸ Andrade, V.M.; Silva, J.; Silva, F.R.; Heuser, V.D.; Dias, J.F.; Yoneama, M.L. e Freitas, T.R. (2004) Fish as bioindicators to assess the effects of pollution in two southern Brazilian rivers using the comet assay and micronucleus test. *Environ. Mol. Mutagen.* **44**, 459-468.
- ¹¹⁹ Bainy, A.C.D. (2007) Nuclear receptors and susceptibility to chemical exposure in aquatic organisms. *Environ. Int.* **33**, 571-575.
- ¹²⁰ Beischlag, T.V.; Morales, J.; Hollingshead, B.D. e Perdew, G.H. (2008) The aryl hydrocarbon receptor complex and the control of gene expression. *Crit. Rev. Eukaryot. Gene Expr.* **18**, 207-250.
- ¹²¹ Kim, E.Y.; Iwata, H.; Suda, T.; Tanabe, S.; Amano, M.; Miyazaki, N. e Petrov E.A. (2005) Aryl hydrocarbon receptor (AHR) and AHR nuclear translocator (ARNT) expression in Baikal seal *Pusa sibirica* and association with 2,3,7,8-TCDD toxic equivalents and CYP1 expression levels. *Comp. Biochem. Physiol. C.* **141**, 281-291.
- ¹²² Detmar, J.; Rabaglino, T.; Taniuchi, Y.; Oh, J.; Acton, B.M.; Benito, A.; Nunez, G. e Jurisicova, A. (2006) Embryonic loss due to exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons is mediated by Bax. *Apoptosis.* **11**, 1413-1425.
- ¹²³ Karchner, S.I.; Franks, D.G. e Hahn, M.E. (2005) AHR1B, a new functional aryl hydrocarbon receptor in zebrafish: tandem arrangement of *ahr1b* and *ahr2* genes. *Biochem. J.* **392**(P1), 153-161.
- ¹²⁴ Cherng, S.H.; Lin, P.; Yang, J.L.; Hsu, S.L. e Lee, H. (2001) Benzo[*g,h,i*]perylene synergistically transactivates benzo[*a*]pyrene-induced CYP1A1 gene expression by aryl hydrocarbon receptor pathway. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **170**, 63-68.
- ¹²⁵ Harrigan, J.A.; McGarrigle, B.P.; Sutter, T.R. e Olson, J.R. (2006) Tissue specific induction of cytochrome P450 (CYP) 1A1 and 1B1 in rat liver and lung following in vitro (tissue slice) and in vivo exposure to benzo[*a*]pyrene. *Toxicol. In Vitro.* **20**:426-438.
- ¹²⁶ Jönsson, E.M.; Abrahamson, A.; Brunström, B. e Brandt, I. (2006) Cytochrome P4501A induction in rainbow trout gills and liver following exposure to waterborne indigo, benzo[*a*]pyrene and 3,3',4,4',5-pentachlorobiphenyl. *Aquat Toxicol.* **79**, 226-232.
- ¹²⁷ Binelli, A.; Ricciardi, F.; Riva, C. e Provini A. (2006) Integrated use of biomarkers and bioaccumulation data in Zebra mussel *Dreissena polymorpha* for site-specific quality assessment. *Biomarkers.* **11**, 428-448.
- ¹²⁸ Warshawsky, D. e Lindquist, B. (1985) Stereospecificity in algal oxidation of carcinogen benzo[*a*]pyrene. *Cell. Mol. Life Sci.* **41**, 767-769.
- ¹²⁹ Okazaki, T.; Laali, K.K.; Zajc, B.; Lakshman, M.K.; Kumar, S.; Baird, W.M. e Dashwood, W.M. (2003) Stable ion study of benzo[*a*]pyrene (BaP) derivatives: 7,8-dihydro-BaP, 9,10-dihydro-BaP and its 6-halo derivatives, 1- and 3-methoxy-9,10-

dihydro-BaP-7(8H)-one, as well as the proximate carcinogen BaP 7,8-dihydrodiol and its dibenzoate, combined with a comparative DNA binding study of regioisomeric (1-, 4-, 2-) pyrenylcarbinols. *Org. Biomol. Chem.* **1**:1509-1516.

¹³⁰ Shimada, T. e Fuji-Kuriyama, Y. (2004) Metabolic activation of polycyclic aromatic hydrocarbons to carcinogens by cytochromes P450 1A1 and 1B1. *Canc. Sci.* **95**, 1-6.

¹³¹ Liao, K.H.; Dobrev, I.D.; Dennison, J.E. Jr.; Andersen, M.E.; Reisfeld, B.; Reardon, K.F.; Campain, J.A.; Wei, W.; Klein, M.T.; Quann, R.J. e Yang, R.S. (2002) Application of biologically based computer modeling to simple or complex mixtures. *Environ Health Perspect.* **110** (Supl), 957-963.

¹³² Werck-Reichhart, D. e Feyereisen, R. (2000) Cytochrome P450: a success story. *Gen. Biol.* **6**, 3003.1-3003.9.

¹³³ Hamdane, D.; Zhang, H. e Hollenberg, P. (2008) Oxygen activation by cytochrome P450 monooxygenase. *Photosynth. Res.* (Publicação eletrônica)

¹³⁴ Levin, W.; Wood, A.W.; Yagi, H.; Dansette, P.M.; Jerina, D.M. e Conney AH. (1976) Carcinogenicity of benzo[a]pyrene 4,5-, 7,8-, and 9,10-oxides on mouse skin. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **73**, 243-247.

¹³⁵ Wood, A.W.; Levin, W.; Lu, A.Y.; Ryan, D.; West, S.B.; Lehr, R.E.; Schaefer-Ridder, M.; Jerina, D.M. e Conney, A.H. (1976) Mutagenicity of metabolically activated benzo[a]anthracene 3,4-dihydrodiol: evidence for bay region activation of carcinogenic polycyclic hydrocarbons. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **72**, 680-686.

¹³⁶ Szentpaly, L. e Shamovsky, I. (1995) Modeling intercalated PAH metabolites: Explanation for the bay region methyl effect. *Int. J. Quantum Chem.* **56**, 191-199.

¹³⁷ Penning, T.M.; Ohnishi, S.T.; Ohnishi, T. e Harvey, R.G. (1996) Generation of reactive oxygen species during the enzymatic oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbon trans-dihydrodiols catalyzed by dihydrodiol dehydrogenase. *Chem. Res. Toxicol.* **9**, 84-92.

¹³⁸ McCoull, K.D.; Rindgen, D.; Blair, I.A. e Penning, T.M. (1999) Synthesis and characterization of polycyclic aromatic hydrocarbon o-quinone depurinating N7-guanine adducts. *Chem. Res. Toxicol.* **12**, 237-246.

¹³⁹ Zangar, R.C.; Davydov, D.R. e Verma, S. (2004) Mechanisms that regulate production of reactive oxygen species by cytochrome P450. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **199**, 316-331.

¹⁴⁰ OPEC (2008) Organization of the Petroleum Exporting Countries - World oil outlook, section one: oil supply and demand outlook 2030. 125 pp.

¹⁴¹ UNEP (2007) United Nations Environment Program - Annual report. 121 pp.

¹⁴² Thompson, H.M. e Greig-Smith, P.W. (1991) Monitoring the effects of agricultural pesticides on wildlife. In *Bioindicators and Environmental Management* (Jeffrey, D.W e Madden, B. Eds.) Academic Press, Londres. pp. 79-94.

¹⁴³ Baird, C. (1999) *Environmental Chemistry*. 2nd ed. W.H. Freeman and Company, Nova York. pp. 293-418.

¹⁴⁴ Van der Oost, R.; Beyer, J. e Vermeulen, N.P.E. (2003) Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* **13**, 57-149.

- ¹⁴⁵ Arp, H.P.; Schwarzenbach, R.P. e Goss, K.U. (2008) Ambient gas/particle partitioning. 1. Sorption mechanisms of apolar, polar, and ionizable organic compounds. *Environ. Sci. Technol.* **42**, 5541-5547.
- ¹⁴⁶ Perez-Ruzafa, A.; Navarro, S.; Barba, A.; Marco, C.; Câmara, M.A.; Salas, S. e Gutierrez, J.M. (2000) Presence of pesticides throughout trophic compartments of the food web in the Mar Menor lagoon (SE Spain). *Mar. Pollut. Bull.* **40**, 140-151.
- ¹⁴⁷ Furumai, H.; Balmer, H. e Boller, M. (2002) Dynamic behavior of suspended pollutants and particle size distribution in highway runoff. *Water Sci. Technol.* **46**, 413-418.
- ¹⁴⁸ Davidson, D.A.; Wilkinson, A.C.; Kimpe, L.E. e Blais, J.M. (2004) Persistent organic pollutants in air and vegetation from the Canadian Rocky Mountains. *Environ. Toxicol. Chem.* **23**, 540-549.
- ¹⁴⁹ Cooper, K. (1991) Effects of pesticides on wildlife. In *Handbook of Pesticide Toxicology, vol. 1, General Principles* (Hayes, W.J. e Laws, E.R. Eds.) Academic Press, Nova York. pp. 463-496.
- ¹⁵⁰ Labud, V.; Garcia, C. e Hernandez, T. (2007) Effect of hydrocarbon pollution on the microbial properties of a sandy and a clay soil. *Chemosphere.* **66**, 1863-1871.
- ¹⁵¹ Blankenberg, A.G.; Haarstad, K. e Braskerud, B.C. (2007) Pesticide retention in an experimental wetland treating non-point source pollution from agriculture runoff. *Water Sci. Technol.* **55**, 37-44.
- ¹⁵² Leo, P.; Eijsackers, H.J.; Koelmans, A.A. e Vijver, M.G. (2008) Ecological effects of diffuse mixed pollution are site-specific and require higher-tier risk assessment to improve site management decisions: A discussion paper. *Sci. Total. Environ.* (Publicação eletrônica)
- ¹⁵³ Lam, P.K.S. e Gray, J.S. (2003) The use of biomarkers in environmental monitoring programmes. *Mar. pollut. Bull.* **46**, 182-186.
- ¹⁵⁴ Briggs, G.B. (1996) Risk assessment policy for evaluating reproductive system toxicants and the impact of responses on sensitive populations. *Toxicology.* **111**, 305-13.
- ¹⁵⁵ Mills, A. e Foureman, G.L. (1998) US EPA's IRIS pilot program: establishing IRIS as a centralized, peer-reviewed data base with agency consensus. Integrated Risk Information System. *Toxicology.* **127**, 85-95.
- ¹⁵⁶ Duda, A.M. e Sherman, K. (2002) A new imperative for improving management of large marine ecosystems. *Ocean Coast. Man.* **45**, 797-833.
- ¹⁵⁷ Cronin, M.T.; Walker, J.D.; Jaworska, J.S.; Comber, M.H.; Watts, C.D. e Worth, A.P. (2003) Use of QSARs in international decision-making frameworks to predict ecologic effects and environmental fate of chemical substances. *Environ. Health Perspect.* **111**, 1376-1390.
- ¹⁵⁸ Tremolada, P.; Finizio A.; Villa S.; Gaggi, C. e Vighi, M. (2004) Quantitative inter-specific chemical activity relationships of pesticides in the aquatic environment. *Aquat. Toxicol.* **67**, 87-103.
- ¹⁵⁹ Cross, J.H. e Hose, J.E. (1988) Evidence for impaired reproduction in white croaker *Genyonemus lineatus* from contaminated areas of southern California. *Mar. Environ. Res.* **24**, 185-188.

- ¹⁶⁰ Szefer, P. (2000) Possible priorities for future research in the field of marine environmental pollution. *Sci. Total Environ.* **249**, 385-394.
- ¹⁶¹ Cairns, J. Jr. (2005) Biomonitoring: the crucial link between natural systems and society. *Mank. Quarter.* **65**, 289-308.
- ¹⁶² Spacie, A.; McCarty, L.S. e Rand, G.M. (1995) Bioaccumulation and biodiversity in multiphase systems. In *Fundamentals of Aquatic Toxicology – Effects, Environmental Fate, and Risk Assessment*. (Rand, G.M. Ed.), 2nd ed. Taylor & Francis, Londres. pp.493 - 521.
- ¹⁶³ Goldberg, E. (1975) The Mussel Watch – a first step in global marine monitoring. *Mar. Pollut. Bull.* **6**, 111.
- ¹⁶⁴ Tripp, B.W.; Farrington, J.W.; Goldberg, E.D. e Sericano, J. (1992) International Mussel Watch: the initial implementation phase. *Mar. Pollut. Bull.* **24**, 371-373.
- ¹⁶⁵ Tanabe, S. (2000) Asia-Pacific Mussel Watch progress report. *Mar. Pollut. Bull.* **40**, 651.
- ¹⁶⁶ Cairns, J.Jr. (1992) Paradigms flossed: the coming of age of environmental toxicology. *Environ. Toxicol. Chem.* **11**, 285-287.
- ¹⁶⁷ Matthews, R.A.; Buikema Jr. A.L.; Cairns, J. Jr. e Rodgers, Jr. J.H. (1982) Biological monitoring part IIa – receiving system functional methods. Relationships and indices. *Water Res.* **16**, 129-139.
- ¹⁶⁸ Janardan, S.K.; Olson, C.S. e Shaffer, D.J. (1984) Quantitative comparison of acute toxicity of organic chemicals to rat and fish. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **8**, 531-539.
- ¹⁶⁹ Devier, M.H.; Augagneur, S.; Budzinski, H.; Le Menach, K.; Mora, P.; Narbonne, J.F. e Garrigues, P.J. (2005) One-year monitoring survey of organic compounds (PAHs, PCBs, TBT), heavy metals and biomarkers in blue mussels from the Arcachon Bay, France. *Environ. Monit.* **7**, 224-240.
- ¹⁷⁰ Yap, C.K.; Tan, S.G.; Ismail, A. e Omar, H. (2004) Allozyme polymorphisms and heavy metal levels in the green-lipped mussel *Perna viridis* (Linnaeus) collected from contaminated and uncontaminated sites in Malaysia. *Environ. Intern.* **30**, 39-46.
- ¹⁷¹ Torres, M. A.; Testa, C. P.; Gaspari, C.; Masutti, M. B.; Panitz, C. M. N.; Pedrosa, R. C.; Almeida, E. A.; Mascio, P. and Wilhelm Filho, D. (2002) Oxidative stress in the mussel *Mytella guayanensis* from polluted mangroves on Santa Catarina Island, Brazil. *Mar. Pollut. Bull.* **44**, 923-932.
- ¹⁷² Watson, G.M.; Andersen, O-K.; Galloway, T.S. e Depledge, M.H. (2004) Rapid assessment of polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) exposure in decapod crustaceans by fluorimetric analysis of urine and haemolymph. *Aquat. Toxicol.* **67**, 127-142.
- ¹⁷³ Mirto, S. e Danovaro, R. (2004) Meiofaunal colonization on artificial substrates: a tool for biomonitoring the environmental quality on coastal marine systems. *Mar. Pollut. Bull.* **48**, 919-926.
- ¹⁷⁴ Förlin, L.; Lemaireb, P. e Livingstone, D.R. (1998) Comparative studies of hepatic xenobiotic metabolizing and antioxidant enzymes in different fish species. *Mar. Environ. Res.* **39**, 201-204.
- ¹⁷⁵ Guhathakurta, S. e Bhattacharya, S. (1988) Target and nontarget actions of phenthoate and carbofuran: brain acetylcholinesterase, kidney iodide peroxidase, and blood thyroxine profiles in *Channa punctatus*. *Biomed. Environ. Sci.* **1**, 59-63.

- ¹⁷⁶ David R. Thompson, D.R.; Furness, R.W. e Monteiro, L.R. (1998) Seabirds as biomonitors of mercury inputs to epipelagic and mesopelagic marine food chains. *Sci. Total Environ.* **213**, 299-305.
- ¹⁷⁷ Reijnders, P.J.H. (1986) perspectives for studies of pollution in cetaceans. *Mar. Pollut. Bull.* **17**, 58-59.
- ¹⁷⁸ Reijnders, P.J.H. (1986) Reproductive failure in common seals feeding on fish from polluted coastal waters. *Nature.* **324**, 456-457.
- ¹⁷⁹ Kucklicka, J.R.; William, D.J.; Struntza, P. R.; Beckera, York, G.W.; O'Harac, T.M. e Bohonowychd, J.E. (2002) Persistent organochlorine pollutants in ringed seals and polar bears collected from northern Alaska. *Sci. Total Environ.* **287**, 45-59.
- ¹⁸⁰ Narro, M.L.; Cerniglia, C.E.; Van Baalen. C. e Gibson, D.T. (1992) Metabolism of phenanthrene by the marine cyanobacterium *Agmenellum quadruplicatum*, strain PR-6. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**, 1351-1359.
- ¹⁸¹ Xu, K.; Choi, J.K.; Yang, E.J.; Lee, K.C. e Lei, Y. (2002) Biomonitoring of coastal pollution status using protozoan communities with a modified PFU method. *Mar. Pollut. Bull.* **44**, 877-886.
- ¹⁸² Campanella, L.; Cubbada, F.; Sammartino, M.P. e Saoncella, A. (2000) An algal biosensor for the monitoring of water toxicity in estuarine environments. *Wat. Res.* **35**, 69-76.
- ¹⁸³ Burridge, T.R. e Bidwell, J. (2002) Review of the potential use of brown algal ecotoxicological assays in monitoring effluent discharge and pollution in southern Australia. *Mar. Pollut. Bull.* **45**, 140-147.
- ¹⁸⁴ Fytianos, K.; Evgenidou, E. e Zacharidis, G. (1999) Use of macroalgae as biological indicators of heavy metal pollution in Thermaikos Gulf, Greece. *Bull. Environ. Toxicol.* **62**, 630-637.
- ¹⁸⁵ Headley, J.V.; Peru, K.M.; Du, J.L.; (2008) Gurprasad, N. e McMartin, D.W. Evaluation of the apparent phytodegradation of pentachlorophenol by *Chlorella pyrenoidosa*. *J. Environ. Sci. Health. A.* **43**, 361-4.
- ¹⁸⁶ Conti, M.E. e Cecchetti, G. (2003) A biomonitoring study: trace metal in algae and mollusks from Tyrrhenian coastal areas. *Environ. Res.* **93**, 99-112.
- ¹⁸⁷ Crespo, M.O.P. e Yusty, M.A.L. (2004) Determination of aliphatic hydrocarbons in the alga *Himantalia elongate*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **57**, 226-230.
- ¹⁸⁸ Swackhamer, D.L. and Skoglund, R.S. (1993) Bioaccumulation of PCBs by algae: kinetics versus equilibrium. *Environ. Toxicol. Chem.* **12**, 831-838.
- ¹⁸⁹ Wang, S.J.; Chou, H.N.; Fan, J-J. e Chen, C-M. (1998) Uptake and transfer of high PCB concentrations from phytoplankton to aquatic biota. *Chemosphere* **36**, 1201-1210.
- ¹⁹⁰ Sánchez-Rodríguez, I.; Huerta-Díaz, M.A.; Choumiline, E.; Holguín-Quiñones, O. e Zertruche-González, J.A. (2001) Elemental concentrations in different species of seaweeds from Loreto Bay, Baja California Sur, Mexico: implications for the geochemical control of metal in algal tissue. *Environ. Pollut.* **114**, 145-160.
- ¹⁹¹ Werck-Reichhart, D.; Gabriac, B.; Teutsch, H. e Durst, F. (1990) Two cytochrome P450 isoforms catalysing O-de-ethylation of ethoxycoumarin and ethoxyresorufin in higher plants. *Biochem J.* **270**, 729-735.

- ¹⁹² Wang, W. e Freemark, K. (1995) The use of plants for environmental monitoring and assessment. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **30**, 289-301.
- ¹⁹³ Baumard, P.; Budzinski, H.; Garrigues, P.; Sorbe, J.C.; Burgeot, T. e Bellocq, J. (1998) Concentrations of PAHs (Polycyclic Aromatic Hydrocarbons) in various marine organisms in relation to those in sediments and to trophic level. *Mar. Pollut. Bull.* **36**, 951-960.
- ¹⁹⁴ Kenaga, E. e Moolenaar, R. (1979) Fish and daphnia toxicity as surrogates for aquatic and vascular plants and algae. *Environ. Sci. Technol.* **13**, 1479-1480.
- ¹⁹⁵ Walsh, G.E.; Bahner, L.H. e Horning, W.B. (1980) Toxicity of textile mill effluents to freshwater and estuarine algae, crustaceans, and fishes. *Environ. Pollut.* **21**, 169-179.
- ¹⁹⁶ Walsh, G.E.; Duke, K.M. e Foster, R.B. (1982) Algae and crustaceans as indicators of bioactivity of industrial wastes. *Water Res.* **16**, 879-883.
- ¹⁹⁷ Bringmann, G. e Kühn, R. (1980) Comparison of toxicity thresholds of water pollutants to bacteria, algae, and protozoa in the cell multiplication test. *Water Res.* **14**, 231-141.
- ¹⁹⁸ Roberts, M.H.; Warinner, J.E.; Tsai, C.F.; Wright, D. e Cronin, L.E. (1982) Comparison of estuarine species sensitivities to three toxicants. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **11**, 681-692.
- ¹⁹⁹ Galassi, S.; Guzzela, L.; Mingazzini, M.; Vigano, L.; Capri, S. e Sora, S. (1992) Toxicological and chemical characterization of organic micropollutants in River Po water (Italy). *Water Res.* **26**, 19-27.
- ²⁰⁰ Thomas, J.M.; Skalski, J.R.; Cline, J.F.; Mcshane, M.C.; Miller, W.E.; Peterson, S.A.; Callahan, C.A. e Greene, J.C. (1986) Characterization of chemical waste site contamination and determination of its extent using bioassays. *Environ. Toxicol. Chem.* **5**, 487-501.
- ²⁰¹ Meyerhoff, R.D.; Grothe, D.W.; Sauter, S. e Dorulla, G. (1985) Chronic toxicity of tebutiuron to an alga *Selenastrum capricornutum* a cladoceran *Daphnia magna* and the fathead minnow *Pimephales promelas*. *Environ. Toxicol. Chem.* **4**, 695-701.
- ²⁰² Okamoto, O.K.; Shao, L.; Hastings, J.W. e Colepicolo, P. (1999) Acute and chronic effects of toxic metals on viability, encystment and bioluminescence in the dinoflagellate *Gonyaulax polyedra*. *Comp. Biochem. Physiol. C.* **123**, 75-83.
- ²⁰³ Rico, M.C.; Hernández, L.; Fernández, M.; González, M.J. e Montero, M. (1989) Organochlorine contamination in water of the Donana National Park. *Water Res.* **23**, 57-60.
- ²⁰⁴ Hans, G.P.; Cdine, B.; Kathryn, E. F. e Pamela A.M. (1997) Toxicity of hexazinone and diquat to green algae, diatoms, cyanobacteria and duckweed. *Aquat. Toxicol.* **39**, 111-114.
- ²⁰⁵ Sundaram, K.M. S. (1997) Persistence of tebufenozide in aquatic ecosystems under laboratory and field conditions. *Pest. Sci.* **51**, 7-20.
- ²⁰⁶ Ramesh, A.; Tanabe, S.; Iwata, H.; Tatsukawa, R.; Subramanian, A.N.; Mohan, D. e Venugopalan, V.K. (1990) Seasonal variation of persistent organochlorine insecticide residues in Vellar river waters in Tamil Nadu, South India. *Environ. Pollut.* **67**, 289-304.

- ²⁰⁷ Hadfeld, S.T.; Sadler, J.K.; Bolygo, E.; Hill, S. e Hill, I.R. (1993) Pyrethroid residues in sediment and eater samples from mesocosm and farm pond studies of simulated accidental aquatic exposure. *Pest. Sci.* **38**, 283-294.
- ²⁰⁸ Ostroumov, S.A. (1998) Biological filtering and ecological machinery for self-purification and bioremediation in aquatic ecosystems: towards a holistic view. *Riv. Biol.* **91**, 221-32.
- ²⁰⁹ Muñoz, R.; Alvarez, M.T.; Muñoz, A.; Terrazas, E.; Guieysse, B. e Mattiasson B. (2006) Sequential removal of heavy metals ions and organic pollutants using an algal-bacterial consortium. *Chemosphere.* **63**, 903-911.
- ²¹⁰ Volkman, j. K.; Barrett, S.M.; Blackburn, S.I.; Mansour, M.P.; Sikes, E.L. e Gelin, F. (1998) Microalgal biomarkers: A review of recent research developments. *Org. Geochem.* **29**, 1163-1179.
- ²¹¹ Pflugmacher, S.; Wiencke, C. e Sandermann Jr., H. (1999) Activity of phase I and phase II detoxification enzymes in Antarctic and Arctic macroalgae. *Mar. Environ. Res.* **48**, 23-36.
- ²¹² Morel, F.M.M. e Price, N.M. (2003) The biogeochemical cycles of trace metals in the oceans. *Science* **300**, 944-947.
- ²¹³ Hanikenne, M.; Matagne, R.F. e Lppes, R. (2001) Pleiotropic mutants hypersensitive to heavy metals and oxidative stress in *Chlamydomonas reinhardtii*. *FEMS Microbiol. Lett.* **196**, 107-111.
- ²¹⁴ Pinto, E.; Sigaud-Kutner, T.C.S.; Leitão, M.A.S.; Okamoto, O.K.; Morse, D. e Colepicolo, P. (2003) Heavy metal-induced oxidative stress in algae. *J. Phycol.* **39**, 1-11.
- ²¹⁵ Törnqvist, L. e Claesson, A. (1987) The influence of aluminium on the cell-size distribution of two green algae. *Environ. Exp. Bot.* **27**, 481-488.
- ²¹⁶ Imer, U.; Wachholtz, I.; Schäfer, H. e Lorch, D.W. (1986) Influence of lead on *Chlamydomonas reinhardtii* danegard (volvocales, chlorophyta): Accumulation, toxicity and ultrastructural changes. *Environ. Exp. Bot.* **26**, 97-105.
- ²¹⁷ Nishikawa, K.; Yamakoshi, Y.; Uemura, I. e Tominaga, N. (2003) Ultrastructural changes in *Chlamydomonas acidophila* (Chlorophyta) induced by heavy metals and polyphosphate metabolism. *FEMS Microbiol. Ecol.* **44**, 253-259.
- ²¹⁸ Lewis, M. A. (1995) Use of freshwater plants for phytotoxicity testing: A review. *Environ. Pollut.* **87**, 319-336.
- ²¹⁹ Ma, J.; Xu, L.; Wang, S.; Zheng, R.; Jin, S.; Huang, S. e Huang, Y. (2002) Toxicity of 40 herbicides to the green alga *Chlorella vulgaris*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **51**, 128-132.
- ²²⁰ Nyström, B.; Slooten, K. B-V.; Bérard, A.; Grandjean, D.; Druart, J-C. e Le Boulanger, C. (2002) Toxic effects of Irgarol 1051 on phytoplankton and macrophytes in Lake Genova. *Water Res.* **36**, 2020-2028.
- ²²¹ Cody, T.E.; Radike, M.J. e Warshawsky, D. (1984) The phototoxicity of benzo[a]pyrene in the green algae *Selenastrum capricornutum*. *Environ. Res.* **35**, 122-132.
- ²²² Stronkhorst, J.; Vos, P.C. e Misdorp, R. (1994) Trace metals, PCBs, and PAHs in bentic (epipelagic) diatoms from intertidal sediments; a pilot study. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **52**, 818-824.
- ²²³ Walsh, G.E.; McLaughlin, L.L.; Yoder, M.J.; Moody, P.H.; Lores, E.M.; Forester, J. e Wessinger-Duvall, P.B. (1988) *Minutocellus polymorphus*: a new marine diatom for use in algal toxicity tests. *Environ. Toxicol. Chem.* **7**, 925-929.

- ²²⁴ Lewis, M. A. (1995) Algae and vascular plants. In *Fundamentals of Aquatic Toxicology – Effects, Environmental Fate, and Risk Assessment*. (Rand, G.M. Ed.), 2nd ed. Taylor & Francis, Londres. pp.135-169.
- ²²⁵ Besten, P.J. (1998) Concepts for the implementation of biomarkers in environment monitoring. *Mar. Environ. Res.* **46**, 253-256.
- ²²⁶ Huggett, R.J.; Kimerle, R.A.; Mehrle, P.M. e Bergman, H.L. (1992) Biomarkers: biochemical, physiological and histological markers of anthropogenic stress. Boca Raton, Florida. 347 pp.
- ²²⁷ Hendry, G.A.F. (1994) Oxygen and environmental stress in plants: an evolutionary context. *Proc. Royal Soc. Edinburgh B.* **102**, 155–165.
- ²²⁸ Rawlyer, A.; Arpagus, S. e Braendle, R. (2002) Impact of oxygen stress and energy availability on membranes stability of plant cells. *Ann. Bot.* **90**, 499-507.
- ²²⁹ Rytter, S. W. e Tyrrel, R. M. (1998) Singlet molecular oxygen (1O_2): a possible effectors of eukaryotic gene expression. *Free Rad. Biol. Med.* **24**, 1520-1534.
- ²³⁰ Halliwell, B. e Gutteridge, J.M.C. (2007) *Free Radicals in Biology and Medicine*. 4rd ed., Clarendon Press, Oxford. 851 pp.
- ²³¹ Martinez, G.R.; Medeiros, M.H.G.; Di Mascio, P. (2000) Utilização de endoperóxidos de derivados de naftaleno como fontes químicas de oxigênio singlete em sistemas biológicos. *Quim. Nova.* **23**, 686-689.
- ²³² Apel, K. e Hirt, H. (2004) Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Ann. Rev. Plant Biol.* **55**, 373-99.
- ²³³ Edreva, A. (2005) Generation and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts: a submolecular approach. *Agri. Ecosys. Environ.* **106**, 119-133.
- ²³⁴ Fridovich, I. (1978) The biology of oxygen radicals. *Science* **201**, 875-880.
- ²³⁵ Chaudière, J. e Ferrari-Iliou, R. (1999) Intracellular antioxidants: from chemical to biochemical mechanisms. *Food Chem. Toxicol.* **37**, 949-962.
- ²³⁶ Pryor, W.A. (1966) *Introduction to Free Radical Chemistry*. Prentice-Hall, New Jersey. 245 pp.
- ²³⁷ Asada, K. (2006) Production and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts and their functions. *Plant Physiol.* **141**, 391-396.
- ²³⁸ Scandalios, J.G. (2005) Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. *Braz. J. Med. Biol. Res.* **38**, 995-1014.
- ²³⁹ Boveris, A. e Chance, B. (1973) The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen. *Biochem. J.* **34**, 707-717.
- ²⁴⁰ Horton, A.A. e Fairhurst, S. (1987) Lipid peroxidation and mechanisms of toxicity. *CRC Crit. Rev. Toxicol.* **18**, 27-79.
- ²⁴¹ Shao, H-B.; Chu, L-Y.; Lu Z-H. e Kang, C-M. (2008) Primary antioxidant scavenging and redox signaling pathways in higher plant cells. *Int. J. Biol. Sci.* **4**, 8-14.

-
- ²⁴² Di Giulio, R.T.; Benson, W.H.; Sanders, B.M. e Van Veld, P.A. (1995) Biochemical mechanisms: metabolism, adaptation, and toxicity. In *Fundamentals of Aquatic Toxicology – Effects, Environmental Fate, and Risk Assessment*. (Rand, G.M. Ed.), 2nd ed. Taylor & Francis, Londres. pp.523-561.
- ²⁴³ Shigeoka, S.; Ishikawa, T.; Tamoi, M.; Miyagawa, Y.; Takeda, T.; Yabuta, Y. e Yoshimura, K. (2002) Regulation and function of ascorbate peroxidase isoenzymes. *J. Exp. Bot.* **53**, 1305-1319.
- ²⁴⁴ Alscher, R.G.; Erturk, N. e Heath, L.S. (2002) Role of superoxide dismutase (SODs) in controlling oxidative stress in plants. *J. Exp. Bot.* **53**, 1331-1341.
- ²⁴⁵ Noctor, G. e Foyer, C.H. (1998) Ascorbate and Glutathione: keeping active oxygen under control. *Ann. Rev. Plant Mol. Biol.* **49**, 249-279.
- ²⁴⁶ Cnubben, N.H.P.; Rietjens, I.M.C.M.; Wortelboer, H.; Zanden, J. e Bladeren, P.J. (2001) The interplay of glutathione-related process in antioxidant defense. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* **10**, 141-152.
- ²⁴⁷ Paradiso, A.; Tommasi, F.; de Gara, L. e Pinto, M.C. (2005) Alteration in ascorbate and ascorbate peroxidase in programmed cell death and oxidative stress. *BMC Plant Biol.* **5**(Supl), S28.
- ²⁴⁸ Barros, M.P.; Pinto, E.; Sigaud-Kutner, T.C.S.; Cardozo, K.H.M. e Colepicolo, P. (2005) Rhythmicity and oxidative/nitrosative stress in algae. *Biol. Rhythm Res.* **36**, 67-82.
- ²⁴⁹ Loft, S.; Høgh, D. P.; Mikkelsen, L.; Risom, L.; Forchhammer, L. e Møller, P. (2008) Biomarkers of oxidative damage to DNA and repair. *Biochem. Soc. Trans.* **36**(P5),1071-6.
- ²⁵⁰ Wang, C.; Wang, X.; Tian, Y.; Xue, Y.; Xu, X.; Sui, Y. e Yu, H. (2008) Oxidative stress and potential biomarkers in tomato seedlings subjected to soil lead contamination. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* (Publicação eletrônica)
- ²⁵¹ Randhawa, V.K.; Zhou, F.; Jin, X.; Nalewajko, C. e Kshner, D.J. (2001) Role of oxidative stress and tiol antioxidant enzymes in nickel toxicity and resistance in strains of the green algae *Scenedesmus actus* f. *alternans*. *Can. J. Microbiol.* **47**, 987-993.
- ²⁵² Lei, A.; Hu, Z.; Wong, Y. e Tam, N.F. (2006) Antioxidant responses of microalgal species to pyrene. *J. Appl. Phycol.* **18**, 67-78.
- ²⁵³ Okamoto, O.K.; Pinto, E.; Latorre, L.R.; Bechara, E.J.H. e Colepicolo, P. (2001) Antioxidant modulation in response to metal-induced oxidative stress in algal chloroplasts. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **40**, 18-24.
- ²⁵⁴ Reed, D.J. (1990) Glutathione: toxicological implications. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **30**, 601-630.
- ²⁵⁵ Margis, R.; Dunand, C.; Teixeira, F.K. e Margis-Pinheiro, M. (2008) Glutathione peroxidase – an evolutionary overview. *FEBS J.* **275**, 3959-3970.
- ²⁵⁶ Muscat, J.E.; Kleinman, W.; Colosimo, S.; Muir, A.; Lazarus, P.; Park, J. e Richie, J.P. Jr. (2004) Enhanced protein glutathiolation and oxidative stress in cigarette smokers. *Free Radic. Biol. Med.* **36**, 464-470.
- ²⁵⁷ Tausz, M.; Sircelj, H. e Grill, D. (2004) The glutathione system as a stress marker in plant ecophysiology: is a stress-response concept valid? *J. Exp. Bot.* **55**, 1955-1962.

- ²⁵⁸ Noctor, G.; Gomez, L.; Vanacker, H. e Foyer, C.H. (2002) Interactions between biosynthesis, compartmentation and transport in the control of glutathione homeostasis and signaling. *J. Exp. Bot.* **53**, 1283-1304.
- ²⁵⁹ Pflugmacher, S.; Schröder, P. e sandermann, H. (2000) Taxonomic distribution of plant glutathione s-transferase acting on xenobiotics. *Phytochemistry*. **54**, 267-273.
- ²⁶⁰ Armstrong, R.N. (1987) Enzyme-catalyzed detoxication reactions: mechanism and stereochemistry. *CRC Crit. Rev. Biochem.* **22**, 39-88.
- ²⁶¹ Munné-Bosh, S. (2005) The role of alfa-tocopherol in plant stress tolerance. *J. Plant physiol.* **162**, 743-748.
- ²⁶² Smirnov, N. (2000) Ascorbate biosynthesis and function in photoprotection. *Philos. Trans. R. Lond. B.* **355**, 1455-1464.
- ²⁶³ Smirnov, N. e Wheeler, G.L. (2000) Ascorbic acid in plants: biosynthesis and function. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **35**, 291-314.
- ²⁶⁴ Ishikawa, T. e Shigeoka, S. (2008) Recent advances in ascorbate biosynthesis and the physiological significance of ascorbate peroxidase in photosynthesizing organisms. *Biosci. Biotech. Biochem.* **72**, 1143-1154.
- ²⁶⁵ Alscher, R.G. e Amthor, J.S. (1988) The physiology of free radical scavenging: maintenance and repair processes. In *Air Pollution and Plant Metabolism*. (Schulte-Hosted, S.; Darall, N.M.; Blank, L.W. e Welburn, A.R. Eds.), Elsevier, Nova York, pp. 95-115.
- ²⁶⁶ Pinto, E.; catalane, L.H.; Lopes, N.P.; Di Mascio, P. e Colepicolo, P. (2000) Piridinín as the major biological carotenoid quencher of singlet oxygen in marine algae *Gonyaulax polyedra*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **268**, 496-500.
- ²⁶⁷ Barros, M.P.; Pinto, E.; Colepicolo, P. e Pedersen, M. (2001) Astaxanthin and piridinín inhibit oxidative damage in Fe²⁺-loaded liposomes: scavenging oxyradicals or changing membrane permeability? *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **288**, 225-232.
- ²⁶⁸ Okamoto, K.O.; Robertson, D.L.; Fang, T.F.; Hastings, J.W. e Colepicolo, P. (2001) Different regulatory mechanisms modulate the expression of a dinoflagellate iron-superoxide dismutase. *J. Biol. Chem.* **276**, 19989-19993.
- ²⁶⁹ Colepicolo, P.; Camarero, V.C.P.C. e Hastings, J.W. (1992) A circadian rhythm in the activity of superoxide dismutase in the photosynthetic algae *Gonyaulax polyedra*. *Chronobiol. Int.* **9**, 266-268.
- ²⁷⁰ Sigaud-Kutner, T.C.S.; Pinto, E.; Okamoto, O.K.; Latorre, L.R. e Colepicolo, P. (2002) Changes in superoxide dismutase activity and photosynthetic pigment content during growth of marine Phytoplankton in batch-cultures. *Physiol. Plant.* **114**, 566-571.
- ²⁷¹ Okamoto, O.K. e Colepicolo, P. (1998) Response of superoxide dismutase to pollutant metal stress in marine dinoflagellate *Gonyaulax polyedra*. *Comp. Biochem. Physiol. C.* **119**, 67-73.
- ²⁷² Barros, M.P.; Granbom, M.; Colepicolo, P. e Pedersén, M. (2003) Temporal mismatch between induction of superoxide dismutase and ascorbate peroxidase correlates with high H₂O₂ concentration in seawater from clofibrate-treated red algae *Kappaphycus alvarezii*. *Arch. Biophys. Biochem.* **420**, 161-168.

- ²⁷³ Ishikawa, T.; Takeda, T.; Kohono, H. e Shigeoka, S. (1996) Purification and characterization of cytosolic ascorbate peroxidase from Komatsuna *Brassica rapa*. *Plant Sci.* **120**, 11-18.
- ²⁷⁴ Chen, G-X. e Asada, K. (1989) Ascorbate peroxidase in tea leaves: occurrence of two isozymes and differences in their enzymatic and molecular properties. *Plant Cell Physiol.* **30**, 987-998.
- ²⁷⁵ Miyake, C.; Cao, W-H. e Asada, K. (1993) Purification and molecular properties of thylacoidal-bound ascorbate peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant Cell Physiol.* **34**, 881-889.
- ²⁷⁶ Yamaguchi, K.; Mori, H. e Nishimura, M. (1995) A novel isoenzyme of ascorbate peroxidase localize on glioxysomal and peroxisomal membranes in pumpkin. *Plant Cell Physiol.* **36**, 1157-1162.
- ²⁷⁷ Leonardis, S.D.; Dipierro, N. e Dipierro, S. (2000) Purification and characterization of an ascorbate peroxidase from potato tuber mitochondria. *Plant Physiol. Biochem.* **38**, 773-779.
- ²⁷⁸ Mallick, N.; Mohn, F.H.; Soeder, C.J. e Grobbelaar, J.U. (2002) Ameliorative role of nitric oxide on H₂O₂ toxicity to a chlorophycean alga *Scenedesmus obliquus*. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **48**, 1-7.
- ²⁷⁹ Vardi, A.; Berman, F.I.; Rozenberg, T.; Hadas, O.; Kaplan, A. e Levine, A. (1999) Programmed cell death of the dinoflagellate *Peridinium gatunense* is mediated by CO₂ limitation and oxidative stress. *Curr. Biol.* **18**, 1061-1064.
- ²⁸⁰ Dietz, K-J.; Jacob, S.; Oelze, M-L.; L., M.; Tognetti, V.; Miranda, S.M.N.; Baier, M. e Finkmeier, I. (2006) The function of peroxiredoxins in plant organelle redox metabolism. *J. Exp. Bot.* **57**, 1697-1709.
- ²⁸¹ Barros, M.P.; Pedersén, M.; Colepicolo, P. e Snoeijis, P. (2003) Self-shading protects phytoplankton communities against H₂O₂-induced oxidative damage. *Aquat. Microb. Ecol.* **30**, 275-282.
- ²⁸² Yoshida, S. (2003) Molecular regulation of leaf senescence. *Curr. Opin. Plant. Biol.* **6**, 79-84.
- ²⁸³ Yamazaki, I. (1993) Hydroxyl radical formation in biological systems. *Quim. Nova* **16**, 365-369.
- ²⁸⁴ Lima, E.S. e Abdala, D.S.P. (2001) Peroxidação lipídica: mecanismos e avaliação em amostras biológicas. *Rev. Bras. Cie. Farm.* **37**, 293-303.
- ²⁸⁵ Zwart, L.L.; Meerman, J.H.; Commandeur, J.N. e Vermeulen, N.P. (1999) Biomarkers of free radical damage applications in experimental animals and in humans. *Free Radic. Biol. Med.* **26**, 202-226.
- ²⁸⁶ Niki, E. (2001) Lipid peroxidation and its inhibition: overview and perspectives. *J. Oleo Sci.* **50**, 313-320.
- ²⁸⁷ Buhler, D.R. e Williams, D.E. (1988) The hole of biotransformation in the toxicity of chemicals. *Aquat. Toxicol.* **11**, 19-28.
- ²⁸⁸ Sandermann Jr., H. (1992) Plant metabolism of xenobiotics. *Trends. Biochem. Sci.* **17**, 82-84.
- ²⁸⁹ Lee, R.F.; Singer, S.C. e Page, D.S. (1981) Responses of cytochrome P450 systems in marine crabs and polychaets to organic pollutants. *Aquat. Toxicol.* **1**, 355-365.
- ²⁹⁰ Livigstone, D.R.; Kirchin, M.A. e Wiseman, A. (1989) Cytochrome P450 and oxidative metabolism in mollusks. *Xenobiotica.* **19**, 1041-1062.

- ²⁹¹ Stegman, J.J. (1989) Cytochrome P450 forms in fish: catalytic immunological and sequence similarities. *Xenobiotica*. **19**, 1093-110.
- ²⁹² Bowell, G.P.; Bozak, K. e Zimmerlin, A. (1994) Plant cytochrome P450. *Phytochemistry*. **37**, 1491-1506.
- ²⁹³ Hodgson, E. e Goldstein, J.A. (2001) Metabolism of toxicants: Phase I reactions and pharmacogenetics. In *Introduction to Biochemical Toxicology* (Hodgson, E. e Smart, R.C. Eds.), Willey-Interscience, Nova York, pp. 67-85.
- ²⁹⁴ Coon, M. (2005) Cytochrome P450: Nature's most versatile biological catalyst. *Ann. Rev. Pharm. Toxicol* **45**, 1-25.
- ²⁹⁵ Archacov, A.L. e Bachmanova, G.I. (1990) *Cytochrome P450 and Active Oxygen*. Taylor & Francis, Londres.
- ²⁹⁶ Halkier, B. (1996) Catalytic reactivities and structure/function relationships of cytochrome P450 enzymes. *Phytochemistry*. **43**, 1-21.
- ²⁹⁷ Black, S.D. e Coon, M.J. (1987) P-450 cytochromes: structure and function. *Adv. Enzimol.* **60**, 35-67.
- ²⁹⁸ Bainy, A.C.D.; Woodin, B.R. e Stegman, J.J. (1999) Elevated levels of multiple cytochromes P450 forms in tilapia from Billings Reservoir – São Paulo, Brazil. *Aquat. Toxicol.* **44**, 289-305.
- ²⁹⁹ Shuler, M.A. (1996) Plant cytochrome P450 monooxygenases. *Crit. Rev. Plant Sci.* **15**, 235-284.
- ³⁰⁰ Barret, M. (1995) Metabolism of herbicides by cytochrome P450 in corn. *Drug Metab. Drug Interact.* **12**, 299-315.
- ³⁰¹ Fonné-Pfister, R.; Simon, A.; Salaun, J.P. e Durst, F. (1988) Xenobiotic metabolism in higher plants. Involvement of microsomal cytochrome P450 in aminopyrine N-demethylation. *Plant Sci.* **55**, 9-20.
- ³⁰² Batard, Y.; Zimmerlin, A.; Le Ret, M.; Durst, F. e Werck-Reichhart, D. (1995) Multiple xenobiotic-inducible P450s are involved in alkoxy coumarin and alkoxyresorufin metabolism in higher plants. *Plant Cell Environ.* **18**, 523-533.
- ³⁰³ Mougin, C.; Cabanne, F.; Canivec, M. e scalla, R. (1990) Hydroxylation and N-demethylation of chlorotoluron by wheat microsomal enzymes. *Plant Sci.* **66**, 195-203.
- ³⁰⁴ Pflugmacher, S. e Sandermann Jr., H. (1998) Cytochrome P450 monooxygenases for fatty acids and xenobiotics in marine macroalgae. *Plant Physiol.* **117**, 123-128.
- ³⁰⁵ Thies, F.; Backhaus, T.; Bossmann, B. e Grimme, H. (1996) Xenobiotic biotransformation in unicellular green algae – Involvement of cytochrome P450 in the activation and selectivity of the pyridazinone pro-herbicide Metflurazon. *Plant Physiol.* **112**, 361-370.
- ³⁰⁶ Robineau, T.; Batard, Y.; Nedelkina, S.; Cabello-Hurtado, F.; LeRet, M.; Sorokine, O.; Didierjean, L. e Werck-Reichhart, D. (1998) The chemically inducible plant cytochrome P450 CYP76B1 actively metabolizes phenylureas and others xenobiotics. *Plant Physiol.* **118**, 1049-1056.
- ³⁰⁷ Siminszky, B.; Corbin, F.T.; Ward, E.R.; Fleischmann, T.J. e Dewey, R.E. (1999) Expression of a soybean cytochrome P450 monooxygenase cDNA in yeast and tobacco enhances the metabolism of phenylurea herbicides. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **96**, 1750-1755.

- ³⁰⁸ Thies, F. e Grimme, L.H. (1994) In vivo O-dealkylation of resorufin and coumarin ethers by the green alga *Chlorella fusca* analysed by a rapid and sensitive high-performance liquid chromatographic assay. *J. Chrom. A.* **684**, 168-173.
- ³⁰⁹ Edwards, R.; Dixon, D.P. e Walbot, V. (2000) Plant glutathione s-transferase: enzymes with multiple functions in sickness and health. *Trends Plant Sci.* **5**, 193-198.
- ³¹⁰ Dixon, D.P.; Laphorn, A. e Edwards, R. (2002) Plant glutathione transferases. *Gen. Biol.* **3**, 3004.1-3004.10.
- ³¹¹ Wilce, M.C.J. e Parker, M.W. (1994) Structure and function of glutathione s-transferases. *Biochem. Biophys. Acta.* **1205**, 1-18.
- ³¹² Sheehan, D.; Meade, G.; Foley, V.M. e Dowd, C. (2001) Structure, function and evolution of glutathione transferases: implications for classification of non-mammalian members of an ancient enzyme superfamily. *Biochem. J.* **360**, 1-16.
- ³¹³ Dixon, D.P.; Cummins, I.; Cole, D.J. e Edwards, R. (1998) Glutathione-mediated detoxification systems in plants. *Curr. Opin. Plant Biol.* **1**, 258-266.
- ³¹⁴ Marrs, K.A. (1996) The functions and regulation of glutathione s-transferases in plants. *Ann. Rev. Plant Physiol. Mol. Biol.* **47**, 127-158.
- ³¹⁵ Cottingham, C.K.; Hatzios, K.K. e Meredith, S. (1998) Influence of chemical treatments on glutathione s-transferase of maize with activity towards metolachlor and cinnamic acid. *Z. Naturforsch. C.* **53**, 973-979.
- ³¹⁶ Schrenk, C.; Pflugmacher, S.; Brüggemann, R.; Sandermann, H.; Steinberg, C.E.W. e Kettrup, A. (1998) Glutathione s-transferase activity in aquatic macrophytes with emphasis on habitat dependence. *Ecotoxicol. Environ. Safety* **40**, 226-233.
- ³¹⁷ Tang, J.; Siegfried, B.D. e Hoagland, K.D. (1998) Glutathione s-transferase and *in vivo* metabolism of atrazine in freshwater algae. *Pest. Biochem. Physiol.* **59**, 155-161.
- ³¹⁸ Li, X.; Schuler, M.A. e Berenbaum, M.R. (2007) Molecular mechanisms of metabolic resistance to synthetic and natural xenobiotics. *Ann. Rev. Entomol.* **52**, 231-253.
- ³¹⁹ Kurelec, B. (1992) The multixenobiotic resistance mechanism in aquatic organisms. *Crit. Rev. Toxicol.* **22**, 23-43.
- ³²⁰ Bard, S.M.; Woodin, B.R. e Stegeman, J.J. (2002) Expression of p-glycoprotein and cytochrome P450 1A in intertidal fish *Anoplarchus purpurescens* exposed to environmental contaminants. *Aquat. Toxicol.* **60**, 17-32.
- ³²¹ Paula, E.J., Erbert, C. e Pereira, R.T.L. (2006) Growth rate of the carrageenophyte *Kappaphycus alvarezii* (Rhodophyta, Gigartinales) *in vitro*. *Phycol. Res.* **49**, 155-161.
- ³²² DIN 38412-33 (1991) Deutsches Institut für Normung. German standard methods for the examination of water, waste water and sludge; bio-assays (group L); determining the tolerance of green algae to the toxicity of waste water (Scenedesmus chlorophyll fluorescence test) by way of dilution series (L 33). Berlin, Alemanha.
- ³²³ ABNT 12648 (1992) Associação Brasileira de Normas técnicas. Ecotoxicologia aquática – Toxicidade crônica – Método de ensaio com algas *Chlorophyceae*. Rio de Janeiro, Brasil.
- ³²⁴ ISO 8692 (1989) International Standard Organization. Water quality-algae growth inhibition test with *Scenedesmus subspicatus* and *Selenastrum capricornutum*. Genebra, Suíça.

- ³²⁵ Aebi, H. (1984) Catalase *in vitro*. *Meth. Enzymol.* **105**, 121-126.
- ³²⁶ Flohé, L. e Gunzler, W.A. (1984) Assays of glutathione peroxidase. *Meth. Enzymol.* **105**, 114-121.
- ³²⁷ Carlberg, I. e Mannervik, B. (1975) Purification and characterization of the flavoenzyme glutathione reductase from rat liver. *J. Biol. Chem.* **250**, 5475-5480.
- ³²⁸ Asada, K. (1984) Chloroplasts: Formation of active oxygen and its scavenging. *Meth. Enzymol.* **105**, 422-428.
- ³²⁹ Nakano, Y. e Asada, K. (1981) Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant Cell Physiol.* **22**, 867-880.
- ³³⁰ Sgherri, C.L.M.; Iogginini, B.; Puliga, S. e Navari-Izzo, F. (1994) Antioxidant system in *Sporobolus stapfianus*: Changes in response to desiccation and rehydration. *Phytochemistry.* **35**, 561-565.
- ³³¹ McCord, J.M. e Fridovich, I. (1968) The reduction of cytochrome *c* by milk xanthine oxidase. *J. Biol. Chem.* **243**, 5753-5760.
- ³³² Habig, W.H.; Pabst, M.J. e Jakoby, W.B. (1974) Glutathione *S*-transferase. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J. Biol. Chem.* **249**, 7130-7139.
- ³³³ Agarwal, R. e Chase, S.D. (2002) Rapid, fluorimetric-liquid chromatographic determination of malondialdehyde in biological samples. *J. Chrom. B.* **775**, 121-126.
- ³³⁴ Rodriguez-Ariza, A.; Toribio, F. e López-Barea, J. (1994) Rapid determination of glutathione status in fish liver using high-performance liquid chromatography and electrochemical detection. *J. Chromatogr. B.* **656**, 31-318.
- ³³⁵ Lykkesfeldt, J. Foft, S. e Poulsen, H.E. (1995) Determination of ascorbic acid and dehydroascorbic acid in plasma by high-performance liquid chromatography with coulometric detection – are they reliable biomarkers of oxidative stress? *Ann. Biochem.* **229**, 329-335.
- ³³⁶ Baker, J.C.; Harmon, C.L.; Clazener, J.A. e Orlandi, E.W. (1995) A noninvasive technique for monitoring peroxidative and H₂O₂-Scavenging activities during interactions between bacterial plant pathogens and suspension cells. *Plant Physiol.* **108**, 353-359.
- ³³⁷ Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantization of microgram quantities of protein utilizing the principle of dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248-254.
- ³³⁸ Zar, J. H. (1999) *Biostatistical Analysis*. 4th ed. Prentice Hall, New Jersey. 663 pp.
- ³³⁹ Omura, T. e Sato, R. (1964) The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes. *J. Biol. Chem.* **239**, 2370-2378.
- ³⁴⁰ Reginatto, V. (1998) Avaliação do Ensaio de Toxicidade com Alga *Scenedesmus subspicatus* para o Estudo de Efluentes Industriais. Tese de Doutorado. Instituto de Química, UNICAMP, SP, Brasil.
- ³⁴¹ OECD 201 (2002) Organization for Economic Cooperation and Development. Guideline for testing of chemicals: Algae growth inhibition test – Draft revised guideline 201. Paris, França.

- ³⁴² Mason, C. F. (1988) Biology of fresh water pollution. Longman Scientific and Technical. Harlow, Inglaterra.
- ³⁴³ ASTM (1997) American Society for Testing and Materials. Standard guide for conducting static 96h toxicity tests with microalgae. Annual Book of ASTM Standards, vol. 11.05. E 1218 – 97a. West Conshohocken, EUA.
- ³⁴⁴ Kratky, B.A. e Warren, G.F. (1971) A rapid bioassay for photosynthetic and respiratory inhibitors. *Weed Sci.* **19**, 658-661.
- ³⁴⁵ Hess, F.D. (1980) A *Chlamydomonas* algal bioassay for detecting growth inhibitor herbicides. *Weed Sci.* **28**, 515–520.
- ³⁴⁶ Loeppky, C. e Tweedy, B.G. (1969) Effects of selected herbicides upon growth of soil algae. *Weed Sci.* **17**, 110-113.
- ³⁴⁷ Gilbert, F.; Galgani, F. e Cadiou, Y. (1992) Rapid assessment of metabolic activity in marine microalgae: Application in ecotoxicology tests and evaluation of water quality. *Mar. Biol.* **112**, 199-205.
- ³⁴⁸ APHA (1998) American Public Health Association. Biostimulation (Algal Productivity). In *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* Section 8111 (Greenberg, A.E.; Clesceri L.S. e Eaton. A.D. Eds.), 18th ed. American Public Health Association, American Water Works Association and Water Environment Federation. Washington, DC. pp 8-42.
- ³⁴⁹ Walsh, G.E.; McLaughlin, L.L.; Yoder, M.J.; Moody, P.H.; Lores, E.M.; Forrester, J. e Wessinger-Duvall, P.B. (1988) *Minutocellus polymorphus*: a new marine diatom for use in algal toxicity testes – Short communication. *Environ. Toxicol. Chem.* **7**, 925-929.
- ³⁵⁰ Guillard, R.R.L e Ryther, J.H. (1962) Studies on marine planktonic diatoms. I. *Cyclotella nana* and *Detunula confervacaea* (Cleve) Gran. *Can. J. Microbiol.* **8**, 229-239.
- ³⁵¹ Janssen, C.R. e Heijerick, D. G. (2003) Algal toxicity tests for environmental risk assessments of metals *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* **178**, 23–52.
- ³⁵² Hogstrand, C.; Ferguson, E.A.; Galvez, F.; Shaw, J.R.; Webb, N.A. e Wood, C.M. (1999) Physiology of acute silver toxicity in the starry flounder *Platichthys stellatus* in seawater. *J. Comp. Physiol. B.* **7**, 461-473.
- ³⁵³ Slovacek, R.E. e Hannan, P.J. (1977) *In vivo* determination of phytoplankton chlorophyll a. *Limn. Ocean.* **22**, 919-925.
- ³⁵⁴ Erdner, D.L.; Price, N.M.; Doucette, G.J.; Paleato, M.L. e Anderson, D.M. (1999) Characterization of ferredoxin and flavodoxin as markers of iron limitation in marine phytoplankton. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **184**, 43-53.
- ³⁵⁵ Karsten, U.; Klimant, I. e Holst, G. (1996) A new *in vivo* fluorimetric technique to measure growth of adhering phototrophic microorganisms. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**, 237-243.
- ³⁵⁶ Šetlíková, E.; Šetlík, I.; Küpper, H.; Kasalický, V. e Prášil, O. (2005) The photosynthesis of individual algal cells during the cell cycle of *Scenedesmus quadricauda* studied by chlorophyll fluorescence kinetic microscopy. *Photos. Res.* **84**, 13-20.
- ³⁵⁷ Lewis, M.A. (1995) Use of freshwater plants for phytotoxicity testing: a review. *Environ. Pollut.* **87**, 319-336.
- ³⁵⁸ Johnson, I.; Hutchings, M.; Benstead, R.; Thain, J. e Whitehouse, P. (2004) Bioassay selection, experimental design and quality control/assurance for use in effluent assessment and control. *Ecotoxicol.* **13**, 437-447.
- ³⁵⁹ Wang, W. (1990) Literature review on duckweed toxicity testing. *Environ. Res.* **52**, 7-22.

- ³⁶⁰ Cannell, R.J. (1990) Algal biotechnology. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **1**, 85-105.
- ³⁶¹ Malinowski, J.R.; Laval-Martin, D.L. e Edmunds, L.N. Jr. (1985) Circadian oscillators, cell cycles, and singularities: light perturbations of the free-running rhythm of cell division in *Euglena*. *J. Comp. Physiol. B.* **155**, 257-267.
- ³⁶² USEPA (1978) US Environmental Protection Agency. The *Selenastrum capricornutum* Prinz algal assay bottle test. Report No. EPA 600-9-78-018. Washington, DC.
- ³⁶³ Saito, K.; Drgon, T.; Krupatkina, D.N.; Drgonova, J.; Terlizzi, D.E.; Mercer, N. e Vasta, G.R. (2007) Effect of biotic and abiotic factors on *in vitro* proliferation, encystment, and excystment of *Pfiesteria piscicida*. *Appl. Environ. Microbiol.* **73**, 6410-20.
- ³⁶⁴ Luthe, G.; Garcia, B. R.; Jacobus, J.; Smith, B.J.; Rahaman, A.; Robertson, L.W. e Ludewig, G. (2008) Xenobiotic geometry and media pH determine cytotoxicity through solubility. *Chem. Res. Toxicol.* **21**, 1017-1027
- ³⁶⁵ Zhou, Q.; Zhang, J.; Fu, J.; Shi, J. e Jiang, G. (2007) Biomonitoring: an appealing tool for assessment of metal pollution in the aquatic ecosystem. *Anal. Chim. Acta.* **606**, 135-150.
- ³⁶⁶ Eberius, M.; Mennicken, G.; Reuter, I. e Vandenhirtz, J. (2002) Sensitivity of different growth inhibition tests-just a question of mathematical calculation? Theory and practice for algae and duckweed. *Ecotoxicology* **11**, 293-297.
- ³⁶⁷ Rojickova-Padrtova, R. e Marsalek, B. (1999) Selection and sensitivity comparisons of algal species for toxicity testing *Chemosphere.* **38**, 3329-3338.
- ³⁶⁸ Ma, J. (2002) Differential Sensitivity to 30 Herbicides Among populations of two green algae *Scenedesmus obliquus* and *Chlorella pyrenoidosa*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **68**, 275-281.
- ³⁶⁹ Ma, J.; Liang, W.; Xu, L.; Wang, S.; Wei, Y.; e Lu J. (2001) Acute toxicity of 33 herbicides to the green alga *Chlorella pyrenoidosa*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **66**, 536-541
- ³⁷⁰ Ma, J.; Xu, L.; Wang, S.; Zheng, R.; Jin, S.; Huang, S. e Huang, Y. (2002) Toxicity of 40 herbicides to the green alga *Chlorella vulgaris*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **51**, 128-132
- ³⁷¹ Hatakeyama, S.; Fukushima, S.; Kasai, F. e Shiraishi, H. (1994) Assessment of herbicide effects on algal production in the Kokai river (Japan) using a model stream and *Selenastrum* Bioassay. *Ecotoxicology.* **3**, 143-156.
- ³⁷² Kratky, B.A. e Warren G.F. (1971) The use of three simple, rapid bioassays on forty-two herbicides. *Weed Res.* **11**, 257-262.
- ³⁷³ Hess, F.D. (1980) A *Chlamydomonas* algal bioassay for detecting growth inhibitor herbicides. *Weed Sci.* **28**, 515-520.
- ³⁷⁴ Bowen, R.E. e Depledge, M.H. (2006) Rapid assessment of marine pollution (RAMP). *Mar. Pollut. Bull.* **53**, 631-639.
- ³⁷⁵ Scrano, L.; Bufo, S.A.; D'Auria, M.; Meallier, P.; Behecti, A. e Shramm, K.W. (2002) Photochemistry and photoinduced toxicity of acifluorfen, a diphenyl-ether herbicide. *J. Environ. Qual.* **31**, 268-274.
- ³⁷⁶ Aksmann, A. e Tukaj, Z. (2004) The effect of anthracene and phenanthrene on the growth, photosynthesis, and SOD activity of the green alga *Scenedesmus armatus* depends on the PAR irradiance and CO₂ level. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **47**, 177-184.

- ³⁷⁷ Dijkman, N.A.; van Vlaardingen, P.L. e Admiral W.A. (1997) Biological variation in sensitivity to N-heterocyclic PAHs; effects of acridine on seven species of micro-algae. *Environ. Pollut.* **95**, 121-126.
- ³⁷⁸ Lindquist, B. e Warshawsky, D. (1985) Identification of the 11,12-dihydro-11,12-dihydroxybenzo[a]pyrene as a major metabolite produced by the green alga, *Selenastrum capricornutum*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **130**, 71-75.
- ³⁷⁹ Schoeny, R.; Cody, T.; Warshawsky, D. e Radike, M. (1988) Metabolism of mutagenic polycyclic aromatic hydrocarbons by photosynthetic algal species. *Mutat Res.* **197**, 289-302.
- ³⁸⁰ Cody, T.E.; Radike, M.J. e Warshawsky, D. (1984) The phototoxicity of benzo[a]pyrene in the green alga *Selenastrum capricornutum*. *Environ. Res.* **35**, 122-132.
- ³⁸¹ Warshawsky, D.; Cody, T.; Radike, M.; Reilman, R.; Schumann, B.; La Dow, K. e Schneider, R. (1995) Biotransformation of benzo[a]pyrene and other polycyclic aromatic hydrocarbons and heterocyclic analogs by several green algae and other algal species under gold and white light. *J. Chem. Biol. Interact.* **97**, 131-148.
- ³⁸² Grote, M.; Schüürmann, G. e Altenburger, R. (2005) Modeling photoinduced algal toxicity of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Environ. Sci. Technol.* **39**, 4141-4149.
- ³⁸³ Okay, O.S. e Karacik, B. (2007) Photoinduced toxicity of selected PAHs to the marine microalga *Phaeodactylum tricorutum*. *J. Environ. Sci. Health. A* **42**, 707-714.
- ³⁸⁴ Ranga, R.A.; Sarada, R. e Ravishankar, G.A. (2007) Influence of CO₂ on growth and hydrocarbon production in *Botryococcus braunii*. *J. Microbiol. Biotechnol.* **17**, 414-419.
- ³⁸⁵ Xu, H.H. e Tabita, F.R. (1996) Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase gene expression and diversity of Lake Erie planktonic microorganisms. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**, 1913-21.
- ³⁸⁶ Reinfelder, J.R.; Kraepiel, A.M. e Morel, F.M. (2000) Unicellular C₄ photosynthesis in a marine diatom. *Nature.* **407**, 996-999.
- ³⁸⁷ Kozłowska-Szerenos, B.; Bialuk, I. e Maleszewski, S. (2004) Enhancement of photosynthetic O₂ evolution in *Chlorella vulgaris* under high light and increased CO₂ concentration as a sign of acclimation to phosphate deficiency. *Plant Physiol Biochem.* **42**, 403-409.
- ³⁸⁸ Patel, B.N. e Marret, M.J. (1986) Inorganic-carbon uptake by the marine diatom *Phaeodactylum tricorutum*. *Plant.* **169**, 222-227.
- ³⁸⁹ Jones, C.R. e Cook, J.R. (1978) Culture pH, CO₂ tension, and cell division in *Euglena gracilis* Z. *J. Cell Physiol.* **96**, 253-259.
- ³⁹⁰ Raven, J.A.; Cockell, C.S. e De La Rocha, C.L. (2008) The evolution of inorganic carbon concentrating mechanisms in photosynthesis. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B.* **363**, 2641-2650.
- ³⁹¹ Giordano, M.; Beardall, J. e Raven, J.A. (2005) CO₂ concentration mechanism in algae: Mechanisms, environmental modulation, and evolution. *Ann. Rev. Plant Biol.* **56**, 99-131.

- ³⁹² Moroney, J.V. e Yanalvez, R.A. (2007) Proposed carbon dioxide concentrating mechanism in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Euk. Cell.* **6**, 1251-1259.
- ³⁹³ Hess, D. e Haworth, P. (1988) The generation of singlet oxygen $^1\text{O}_2$ by nitrodiphenyl ether herbicide oxyfluorfen is independent of photosynthesis. *Plant Physiol.* **86**, 672-676.
- ³⁹⁴ Karapetyan, N.V.; Strasser, R. e Böger, R. (1983) Variable fluorescence spectra of algae after herbicide-induced pigment bleaching. *Z. Naturforsch. C.* **38**, 556-562.
- ³⁹⁵ Badger, M.R.; Caemmerer, S.; Ruuska, S. e Nakno, H. (2000) Electron flow to oxygen in higher plants and algae: rates and control of direct photoreduction (Mehler reaction) and Rubisco oxygenase. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B.* **355**, 1433-1446.
- ³⁹⁶ Veljovic-Jovanovic, S. (1998) Active oxygen species and photosynthesis: Mehler and ascorbate peroxidase reactions. *Iugoslav Phyl. Pharm. Acta.* **34**, 503-522.
- ³⁹⁷ Goyal, A. e Tolbert, N.E. (1996) Association of glycolate oxidation with photosynthetic electron transport in plant and algal chloroplasts. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **93**, 3319-3321.
- ³⁹⁸ Bennoum, P. (1994) Chlororespiration revisited: mitochondrial plastid interactions in *Chlamydomonas*. *Biochem. Biophys. Acta.* **1186**, 59-66.
- ³⁹⁹ Assada, K. (1999) The water to water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygen and dissipation of excess photons. *Ann. Rev. Plant Physiol.* **50**, 601-639.
- ⁴⁰⁰ Knörzner, O.; Durner, J. e Böger, P. (1996) Alteration in the antioxidative system of suspension-cultured soybean cell *Glycine max* induced by oxidative stress. *Physiol. Plant* **97**, 388-396.
- ⁴⁰¹ Gullner, G.; Könives, T. e Kiraly, L. (1991) Enhanced inducibility of antioxidant systems in a *Nicotina tabacum* L. biotype results in acifluorfen resistance. *Z. Naturforsch. C* **46**, 875-883.
- ⁴⁰² Slesak, I.; Libik, M.; Karpinska, B.; Karpinski, S. e Miszalski, Z. (2007) The role of hydrogen peroxide in regulation of plant metabolism and cellular signalling in response to environmental stresses. *Acta Biochim. Pol.* **54**, 39-50.
- ⁴⁰³ Kenyon, W.H. e Duke, S.O. (1985) Effects of acifluorfen on endogenous antioxidants and protective enzymes in cucumber *Cucumis sativus* L. cotyledons. *Plant Physiol.* **79**, 862-866.
- ⁴⁰⁴ Takeda, T.; Yokota, A. e Shigeoka, S. (1995) Resistance of photosynthesis to hydrogen peroxide in algae. *Plant Cell Physiol.* **36**, 1089-1095.
- ⁴⁰⁵ Collen, J.; Del Rio, M.J.; Garcia-Reina, G. e Pedresen, M. (1994) Photosynthetic production of hydrogen peroxide by *Ulva rigida* C. Ag. (Chlorophyta). *Planta.* **196**, 225-230.
- ⁴⁰⁶ Choo, K-S.; Snoeijs, P. e Pedersen, M. (2004) Oxidative stress tolerance in the filamentous green algae *Cladophora glomerata* and *Enteromorpha ahneriana*. *J. Exp. Mar. Ecol.* **298**, 111-123.
- ⁴⁰⁷ Shao, N.; Krieguer-Liszky, A.; Schroda, M. e Beck, C.F. (2007) A reporter system for the individual detection of hydrogen peroxide and singlet oxygen: its use for the assay of reactive oxygen species produced *in vivo*. *Plant J.* **50**, 475-487.

- ⁴⁰⁸ Binnet, G.B.; Schjoerring, J.K. e Jahn, T.P. (2006) Membrane transport of hydrogen peroxide. *Biochem. Biophys. Acta.* **1758**, 994-1003.
- ⁴⁰⁹ Menzie, C.A.; Potocki, B.B. e Santodonato, J. (1992) Exposure to carcinogenic PAHs in the environment. *Environ. Sci. Technol.* **26**, 1278-1284.
- ⁴¹⁰ Okamoto, O.K.; Asano, C.S.; Aidar, E. e Colepicolo, P. (1996) Effects of cadmium on growth and superoxide dismutase activity of the marine microalga *Tetraselmis gracillis*. *J. Phycol.* **32**, 74-79.
- ⁴¹¹ Nagalakshimi, N. e Prasad, M. N. V. (2001) Responses of glutathione cycle enzymes and glutathione metabolism to copper stress in *Scenedesmus bijugatus*. *Plant Sci.* **160**, 291-299.
- ⁴¹² Rabinovich, H.D.; Clare, D.A.; Crapo, J.D. e Fridovich, I. (1983) Positive correlation between superoxide dismutase and resistance to paraquat toxicity in the Green algae *Chlorella sorokiniana*. *Ach. Biochem. Biophys.* **225**, 640-648.
- ⁴¹³ Lei, a.; Hu, Z.; Wong, Y. e Tam, N.F. (2006) Antioxidant responses of microalgal species to pyrene. *J. Appl. Phycol.* **18**, 67-78.
- ⁴¹⁴ Warshawsky, D.; Radike, M.; Jayasimhulu, K. e Cody, T. (1988) Metabolism of benzo[a]pyrene by dioxigenase enzyme system of the freshwater green algae *Selenastrum capricornutum*. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **152**, 540-544.
- ⁴¹⁵ Moody, J.D.; Freeman, J.P.; Fu, P.P. e Cerniglia, C.E. (2004) Degradation of benzo[a]pyrene by *Mycobacterium vanbaalenii* PYR-1. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**, 340-345.
- ⁴¹⁶ Prescott, A.G. e John, P. (1996) Dioxigenases: molecular structure and role in plant metabolism. *Ann. Rev. Plant. Mol. Biol.* **47**, 245-271.
- ⁴¹⁷ Spiteller, G. (1993) Review: on the chemistry of oxidative stress. *J. Lipid Mediat.* **7**, 199-221.
- ⁴¹⁸ Marwood, C.A.; Smith, R.E.; Solomon, K.R.; Charlton, M.N. e Greenberg, B.M. (1999) Intact and photomodified polycyclic aromatic hydrocarbons inhibit photosynthesis in natural assembles of Lake Eire phytoplankton exposed to solar radiation. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **44**, 322-327.
- ⁴¹⁹ Babu, T.S.; Marder, J.B.; Tripuranthakan, S.; Dixon, D.G. e Greenberg, B.M. (2001) Synergistic effects of a photooxidized and plant growth: evidence that in vivo formation of reactive oxygen species is a mechanism of copper toxicity. *Environ. Toxicol. Chem.* **20**, 1351-1358.
- ⁴²⁰ Huang, X-D.; Babu, T.S.; Marwood, C.A.; Gensemer, R.W.; Solomon, K.R.; Greenberg, B.M. (1997) Inhibition of photosynthesis as an endpoint for the photoinduced toxicity of intact and photomodified PAHs. *ASTM special tech. public.* **1317**, 443-455.
- ⁴²¹ Huang, X.D.; Zeiler, L.F.; Dixon, D.G. e Greenberg, B.M. (1996) Photoinduced toxicity of PAHs to the foliar regions of *Brassica napus* (canola) and *Cucumis sativus* (cucumber) in simulated solar radiation. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **35**, 190-197.
- ⁴²² Waters, R.E.; White, L.L. e May, J.M. (1997) Liposomes containing alpha-tocopherol and ascorbate are protected from an external oxidant stress. *Free Radic. Res.* **26**, 373-9.
- ⁴²³ Davey, M.W.; Stals, E.; Panis, B.; Keulemans, J. e Swennen, R.L. (2005) High-throughput determination of malondialdehyde in plant tissues. *Anal. Biochem.* **347**, 201-207.

8. APÊNDICE

Apêndice - A

Meio f/2 para crescimento de diatomáceas: Vol. final de 1L

Esse é o mais comum e mais amplamente usado meio de cultura para enriquecer água do mar destinada ao crescimento de algas marinhas, especialmente diatomáceas. A concentração da formulação original, designada no início de “meio f”,¹ foi reduzida à metade.²

Volume (mL)	Reagentes
1	NaNO ₃ (74 g.L ⁻¹)
1	NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O (5 g.L ⁻¹)
1	Na ₂ SiO ₃ .9H ₂ O (30 g.L ⁻¹)
1	(solução de metais)
0,5	(solução de vitaminas)
Completar para 1L com água do mar filtrada	

Obs.: Autoclavar após todas as adições.

Solução de metais:

Quantidade	Reagentes
3,15 mg	FeCl ₃ .6 H ₂ O
4,36 mg	Na ₂ EDTA.2 H ₂ O
1 mL	CuSO ₄ .5 H ₂ O (9,8 g.L ⁻¹)
1 mL	Na ₂ MoO ₄ .2 H ₂ O (6,3 g.L ⁻¹)
1 mL	ZnSO ₄ .7 H ₂ O (22 g.L ⁻¹)
1 mL	CoCl ₂ .6 H ₂ O (10 g.L ⁻¹)
1 mL	MnCl ₂ .4 H ₂ O (180 g.L ⁻¹)
Completar para 1L com água desionizada	

Obs.: Autoclavar, fracionar e estocar em refrigerador.

Solução de vitaminas:

Quantidade	Reagentes
1 mL	Vitamina B ₁₂ (1 g.L ⁻¹)
10 mL	Biotina (0,1 g.L ⁻¹)
200 mg	Tiamina HCl
Completar para 1L com água desionizada	

Obs.: Filtrar, esterilizar, fracionar e guardar em refrigerador.

¹ Gillard, R.R.L. e Ryther, J.H. (1962) Studies on marine planktonic diatoms. I. *Cyclotella nana* Hustedt and *Detunula confervaceae* (Cleve) Gran. *Can. J. Microbiol.* **8**, 229-239.

² Guillard, R.R.L. (1975) Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates. In *Culture of Marine Invertebrate Animals*. (Smith, W.L. e Chanle, M.H. Eeds.) Plenum Press, Nova York, USA. pp 26-60.

Apêndice - B

Meio *von Stosch* para crescimento de Rhodophyta: Vol. final de 1L

Mesmo não sendo possível estabelecer o melhor meio de cultura para o cultivo de macro algas, pois, há uma dependência nutricional específica atrelada aos estádios de desenvolvimento.³ Alguns estudos *in vitro* com *K. alvarezii*,^{4,5} tem mostrado elevadas taxas de crescimento e formação de *callus* em meios de cultura *von Stosch* a 50% (VS50). Acrescentar mais 1L de água do mar filtrada na solução final da tabela a baixo para obter VS50.

VOLUME (mL)	Reagentes
1	NaNO ₃ (42 g.L ⁻¹)
1	Na ₂ HPO ₄ .12H ₂ O (11 g.L ⁻¹)
1	(solução de metais)
0,5	(solução de vitaminas)
Completar para 1L com água do mar filtrada	

Obs.: Autoclavar após todas as adições.

Solução de metais:

Quantidade	Reagentes
0,31 mg	FeCl ₃ .6 H ₂ O
4,7 mg	Na ₂ EDTA.2 H ₂ O
1 mL	MnSO ₄ . H ₂ O (16,9 g.L ⁻¹)
Completar para 1L com água desionizada	

Obs.: Autoclavar, fracionar e estocar em refrigerador.

Solução de vitaminas:

Quantidade	Reagentes
1 mL	Vitamina B ₁₂ (2 g.L ⁻¹)
10 mL	Biotina (0,2 g.L ⁻¹)
400 mg	Tiamina HCl
Completar para 1L com água desionizada	

Obs.: Filtrar, esterilizar, fracionar e guardar em refrigerador.

³ Ursi, S. e Plastino, E.M. (2001) Crescimento *in vitro* de linhagens de coloração vermelha e verde de *Gracilaria birdiae* (Gracilariales, Rhodophyta) em dois meios de cultura: análises de diferentes estádios reprodutivos. *Rev. Bras. Bot.* **24**, 587-594.

⁴ Paula, E.J.; Erbert, C. e Pereira, R.T.L. (2001) Growth rate of the carrageenophyte *Kappaphycus alvarezii* (Gigartinales, Rhodophyta) *in vitro*. *Phycol. Res.* **49**, 155-161.

⁵ Hayashi, L.; Yokoya, N.S.; Kikuchi, M.D. e Oliveira, E.C. (2007) *Callus* induction and micropropagation improved by colchicine and phytohormones in *Kappaphycus alvarezii* (Solieriaceae, Rhodophyta). *J. App. Phycol.* **19**, 393-399.

Apêndice - C

Protocolo de contagem de células ao microscópio de luz⁶

Equipamentos utilizados:

- Microscópio óptico Eclipse 50i – Nikon;
- Câmara para contagem *Fuchs Rosenthal* – Labor optik e
- Lamínulas de 20 x 26 x 0.4mm e contador analógico – Fischer.

Soluções e materiais utilizados:

- Solução de *Lugol*: I₂ (1%) com KI (2%) em água destilada;
- Tubos de fundo abaulado para coleta e fixação das células;
- Pipetas *Pasteur* previamente esterilizadas, papel filtro e etanol 40%.

Descrição da técnica:

Coleta: Sob fluxo laminar e após breve e suave agitação da cultura de algas introduziu-se uma pipeta *Pasteur* bem no centro do frasco de cultura de forma a executar uma coleta representativa. Feito isso, procedeu-se a retirada (em triplicata) de aprox. 1 mL de material em suspensão e depositando-se no frasco de coleta. Em seguida, a cultura foi devidamente fechada e, recolocada na incubadora. A seguir, com uma outra pipeta *Pasteur*, foi colocado três gotas de solução de *Lugol* para fixação. Os frascos foram então devidamente rotulados e guardados sob temperatura ambiente e protegido da luz até o dia da contagem.

Contagem ao microscópio: Abriu-se o frasco de coleta e após uma breve agitação para homogeneizar a amostra retirou-se, com uma pipeta *Pasteur*, uma alíquota (gota) sendo a mesma depositada na superfície da câmara de contagem. Em seguida, colocou-se cuidadosamente a lamínula sobre a gota formada. Importante observar a não formação de bolhas de ar e, a gota de material deve ser suficiente de forma a não sobrar material para fora da lamínula. Tomados os devidos cuidados, levou-se a lamínula junto ao microscópio previamente ajustado com a objetiva de 10X e então foi feito o ajuste de luminosidade e após focar a lamina, foi trocado para a objetiva de

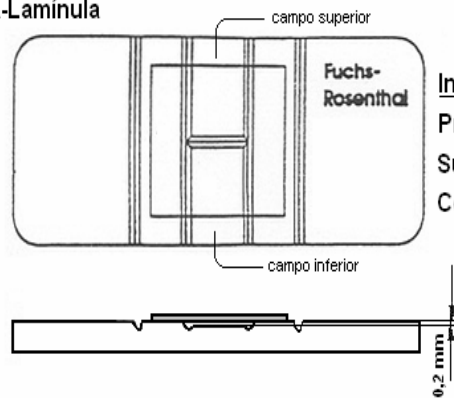
⁶ Sigaud-Kutner, T. C. S.; Pinto, E.; Okamoto, O. K.; Latorre, L. R. e Colepicolo, P. (2001) Changes in superoxide dismutase activity and photosynthetic pigment content during growth of marine phytoplankters in batch-cultures. *Physiol. Plantarum*. **114**, 566 - 571



40X. Importante ressaltar que uma contagem representativa se traduz na distribuição uniforme das células na superfície da lâmina. Observado esse critério adicional, procedeu-se a contagem com auxílio de um contador, seguindo os campos da câmara *Fuchs Rosenthal*.

Utilização da câmara de contagem:

Montagem Câmara-Laminula



Informações:

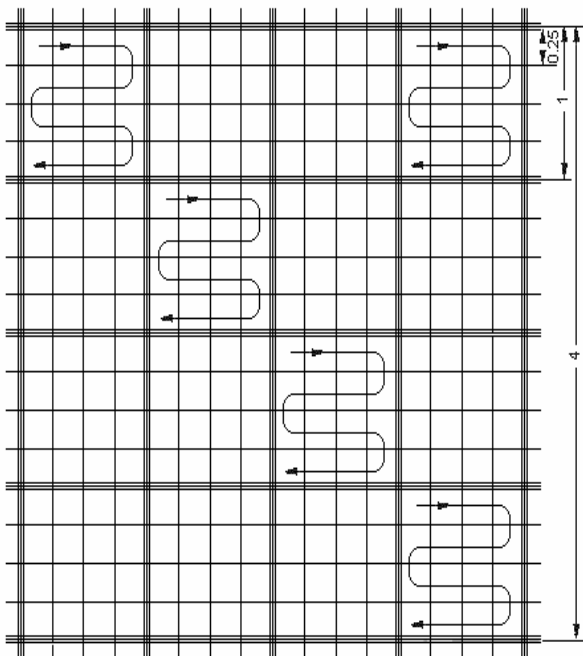
Profundidade - 0,2 mm

Superfície do quadrado menor - 0,0625 mm²

Concentração mínima de células - 10³ célula.mL⁻¹

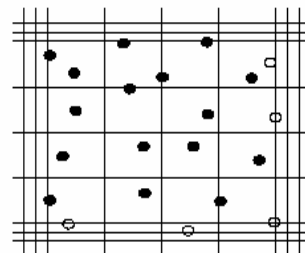
Campo de contagem:

- Contar as células em 80 quadrados pequenos no campo superior e repetir para o campo inferior.



Crerios de contagem:

- Contar as células de dentro dos quadrados.
- Contar as células que tocam as bordas superior e esquerda de cada quadrado.
- Não contar as células que tocam as bordas inferior e direita de cada quadrado.



Equação:

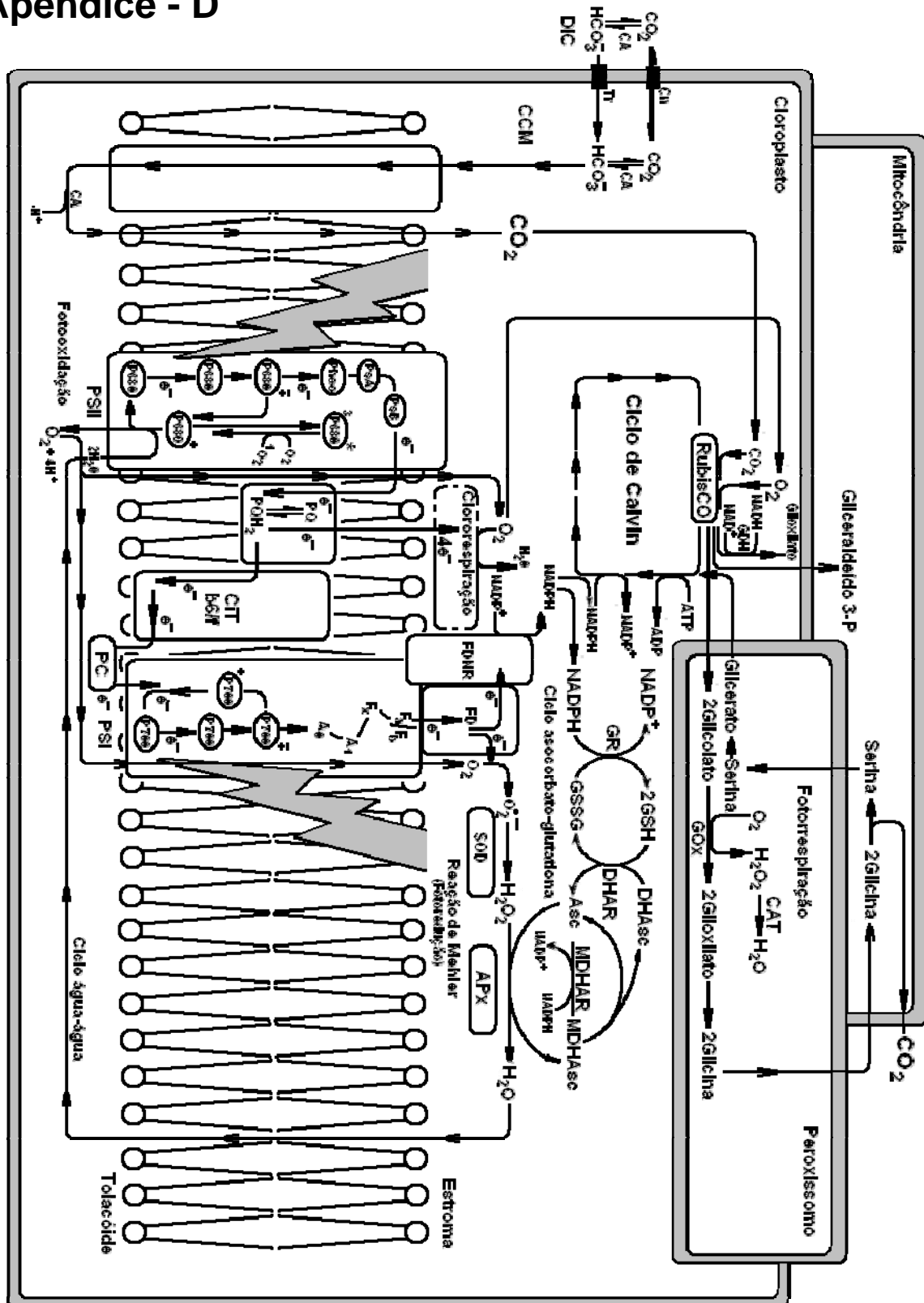
$$\text{No. células.mL}^{-1} = \frac{(n_1 + n_2)}{2 \times 10^3 \times d}$$

n₁ = No. de células no campo superior

n₂ = No. de células no campo inferior

d = Fator de diluição

Apêndice - D



Visão integrativa das vias preferências de formação de EROs e das vias de produção de O_2 e CO_2 . Adaptado de Asada, N. (2006) *Plant. Fisiol.* **141**, 391-396. e Moroney, J.V e Ynalvez, R.A (2007) *Eukariotic Cell.* **6**, 1251-1259. DIC, carbono inorgânico; CCM, mecanismo de acumulação de carbono; Cn, canal de CO_2 , Tr, transportador de DIC; CA, anidrase carbônica; GOX, glicolato oxidase; GDH, glicolato desidrogenase; Rubisco, ribulose 5-P carboxi-oxidase.

Apêndice - E

Glossário de termos abordados durante o texto

QUÍMICA

ABSORBÂNCIA: Uma medida da radiação absorvida por uma amostra $A = \log I_0/I$.

ADSORÇÃO: Fixação química ou física de uma substância a uma superfície.

AGENTE OXIDANTE: Uma espécie que remove elétrons da espécie que está sendo oxidada.

AGENTE REDUTOR: Uma espécie que fornece elétrons a uma substância que está sendo reduzida.

ANITIOXIDANTE: Uma espécie que reage com radicais e evita a oxidação de outra substância.

BIOATIVAÇÃO: É um conjunto de reações metabólicas, envolvendo oxigenação de moléculas alvo, aumentando a sua toxicidade.

BIRRADICAL: Uma espécie com dois elétrons desemparelhados.

COEFICIENTE DE PARTICÃO OCTANOL-ÁGUA (K_{ow}): É uma medida da lipofilicidade de um composto e é definido como a razão da concentração do mesmo, no equilíbrio, após dissolução em um sistema de duas fases, formadas por dois solventes imiscíveis, água e octanol.

DESPROPORCIONAMENTO: Reação redox na qual um único elemento é simultaneamente oxidado e reduzido (*sin. dismutação*)

DESSORÇÃO: Deslocamento da substância fixada em uma superfície.

DIOL: Um composto orgânico com dois grupos —OH

DISSOCIAÇÃO HETEROLÍTICA: Quebra de uma ligação com formação de íons.

DISSOCIAÇÃO HOMOLÍTICA: Quebra de uma ligação com formação de radicais.

ESPECTRO DE ABSORÇÃO: Determinada medindo-se a fração de radiação eletromagnética que a amostra absorve a medida que o comprimento de onda varia em um intervalo de tempo.

ESPECTRO DE FLUORESCÊNCIA: Determinada medindo-se a fração de radiação eletromagnética que a amostra fluoresce a medida que o comprimento de onda de excitação (absorção) varia em um intervalo de tempo.

ESTADO EXCITADO: Um estado que não é o de mais baixa energia.

ESTADO FUNDAMENTAL: Estado de energia mais baixa.

ESTERIOISÔMEROS: Isômeros nos quais os átomos têm os mesmos parceiros arranjados diferentemente no espaço.

FLUORESCÊNCIA: Emissão de luz por moléculas excitas por radiação eletromagnética de alta frequência.

FOTOATIVAÇÃO: São reações envolvendo modificações de moléculas orgânicas por intermédio de oxigenação catalisada por sensibilizadores no estado excitado na presença de O_2 e uma fonte de luz.

LUMINESCÊNCIA: Emissão de luz por um processo que não seja incandescência, normalmente as espécies luminescentes estão em um estado excitado.

PRESSÃO DE VAPOR: É a medida de tendência de volatilização no estado normal puro, sendo função direta da temperatura.

QUIMILUMINESCENCIA: É a geração de luz na forma de fótons através da liberação de energia por uma reação química.

RADICAL: Um átomo, molécula ou íon com ao menos um elétron desemparelhado.

REAÇÃO REDOX: Uma reação na qual ocorre oxidação e redução.

TOXICOLOGIA

MARCADOR: Um conjunto de parâmetros bioquímicos usados no monitoramento ambiental, normalmente são induzidos ou inibidos, como resposta a ação do xenobiótico. (mesmo que biomarcador)

BIOTRANSFORMAÇÃO: Um processo enzimático de ativação de moléculas. (mesmo que bioativação)

BIOMONITORAMENTO: Protocolos de avaliação de risco ambiental usando organismos, de diferentes níveis tróficos, frente a moléculas xenobióticas.



CONCENTRAÇÃO EFETIVA: Concentração necessária para provocar mudanças em certo grau em parâmetros previamente definidos.

CURVA DOSE-RESPOSTA: Resultado da acomodação dos dados por uma equação do tipo sigmoidal entre a concentração do xenobiótico e o seu efeito.

CURVA DE CRESCIMENTO: Acomodação dos dados por uma equação do tipo sigmoidal, decorrente do monitoramento do aumento da densidade populacional por um parâmetro específico.

EFEITO ALGISTÁTICO: Efeito suficiente, por parte do xenobiótico, para provocar inibição na taxa de crescimento populacional.

EXPOSIÇÃO CRÔNICA: Exposição a um xenobiótico por um tempo de exposição prolongado. (1 ano para humanos, 1 semana para microalgas)

EXPOSIÇÃO AGUDA: Exposição a um xenobiótico por um tempo de exposição curto. (14 dias para humanos, 12 - 48 horas para microalgas)

TAXA DE CRESCIMENTO DIÁRIO (μ): Razão entre o intervalo de um parâmetro considerado (e.g. n°. de células em 48h) pelo tempo total do ensaio (e.g. 48h). Multiplica-se o resultado por 24.

ECOTOXICOLOGIA: Estudo dos efeitos nocivos produzidos no ambiente e nos seres vivos pelos agentes químicos, tendo por finalidade o estabelecimento da relação entre a quantidade do agente tóxico liberado num determinado local e o efeito produzido nos organismos que mantiveram contato como o xenobiótico.

XENOBOTICO: Agente químico, na abordagem toxicológica, contaminante e agressivo aos organismos.

BIOLOGIA VEGETAL

APOPLASTO: É um conjunto dos compartimentos existentes exteriormente à membrana plasmática, onde ocorre difusão simples, é formado pelo contínuo de paredes celulares.

CENTRO DE REAÇÃO: Pigmentos fotossensíveis na membrana dos tilacóides com a função de receber a energia dos fótons captados pelo complexo de antena.

CLOROPLASTO: são plastídios com clorofila e carotenóides são formados por um sistema de membranas em forma de vesículas chamadas tilacóides que, quando empilhados são designados *grana*.

COMPLEXOS DE ANTENA: Um sistema de coleta de fótons que canaliza a energia absorvida pelas moléculas de clorofila e pelos pigmentos acessórios para o centro de reação, onde reações fotoquímicas se processam continuamente.

ESTROMA: Matriz citoplasmática dos plastídios

FOTORESPIRAÇÃO: Desvio da atividade carboxilase da Rubisco para uma atividade oxidase, levando a um consumo de O₂ e diminuição do rendimento de fixação de carbono no ciclo de Calvin.

FOTOSSISTEMAS: Referem-se ao arranjo FSI e FSII das moléculas de clorofila outros pigmentos embutidos que compõe o centro de reação.

LÚMEN: Espaço vacuolar hidrofílico no interior dos tilacóides

MICROCORPOS: Estão associados ao retículo endoplasmático, alguns são denominados peroxissomos, responsáveis pelo metabolismo do glicolato participante da fotorrespiração. Os glioxissomos são responsáveis pela conversão dos lipídeos em carboidratos.

PLASTÍDEOS: São organelas que, em algas, podem possuir até quatro membranas e uma matriz chamada estroma.

SISTEMAS CCM: Sistemas de acumulação de carbono inorgânico em microalgas.

TILACOIDE: Expansão do conjunto de membranas do cloroplasto.

ECOLOGIA

ADAPTAÇÃO: Acomodação de um organismo frente a condições adversas.

BIOMA: Comunidade biótica que se caracteriza pela uniformidade fisionômica da flora e da fauna.

BIOACUMULAÇÃO: Processo pelo qual os organismos retêm contaminantes químicos em seus tecidos em níveis maiores aos que se encontram no meio ambiente. Significa o mesmo que bioconcentração.

BIOMAGNIFICAÇÃO: É o acumulativo aumento da concentração de um contaminante persistente em sucessivos níveis tróficos superiores da cadeia alimentar. Em muitos casos, os humanos são os últimos consumidores destes organismos contaminados.



BIOINDICADOR: Organismo ou grupos de organismos, usados como sentinela em programas de monitoramento ambiental.

BIOTA: Flora e fauna de uma região

CADEIA ALIMENTAR: É uma seqüência de seres vivos, na qual um é fonte de energia para o outro.

DENSIDADE POPULACIONAL: É o número de indivíduos presentes por unidade de superfície ou volume.

ECOSSISTEMA: Conjunto interdependente formado por organismos e ambiente físico.

EPILÍMNIO: Zona superficial de um lago, agitada pelo vento, rica em oxigênio, fitoplânctons, luz e na qual a temperatura declina lentamente com a profundidade.

FITOPLÂNCTON: Conjunto de microorganismos fotossintetizantes, microscópicos e flutuantes.

LENÇOL FREÁTICO: Água subterrânea situada sobre uma camada de terreno impermeável.

LIXIVIAÇÃO: Lavagem do solo pela água das chuvas.

LAGO EUTRÓFICO: São lagos pouco profundos com produtividade elevada.

NÍVEL TRÓFICO: Lugar de um organismo na cadeia alimentar.

PELÁGICO: Relativo ao mar aberto.

PERCOLAÇÃO: O fenômeno do deslocamento da água através do solo.

PESTICIDAS: O conjunto de produtos químicos destinados a espécies animais e vegetais alvos.

PRÉ-EMERGENCIA: Atividade controlada por certos herbicidas impedindo a emergência de plantas daninhas

PRODUTORES: Organismos fotossintetizantes.

REGIÃO INTERSTICIAL:

ZONA EUFÓTICA: Região marinha até 100 metros, com boa penetração de luz.

ZONA LITORÂNEA: Zona afetada pelas marés com abundância de luz, oxigênio e alimento.

ZONA NERÍTICA: É o ambiente marinho situado abaixo do nível das marés, indo até 200 metros de profundidade. Apresenta grande importância econômica pela riqueza de plâncton e nécton.

ANEXO

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO - USP
Instituto de Química – Dpto. Bioquímica
Av. Lineu Prestes, 748 - Bloco 9sup - sala 970
05508-900 - Sao Paulo, SP - Brazil
Postal Box: 26077

Office: (5511) 30913810 ex.: 248
Cell: (5511) 82668035
Fax: (5511) 30912170
Skype: [moatorres_usp](https://www.skype.com/user/moatorres_usp)
e-mail: wotorres@iq.usp.br

CURRICULUM VITAE

Moacir Aluisio Torres



Resumé: Moacir Aluisio Torres

He has a B.A in education (1995) and a B.Sc. in Biology (2000) and since this time he has a scientific production and several collaborations with Brazilian ecotoxicology groups using fishes and mussels as biological models. His M. Sc. (biochemistry) (2003) was about the antioxidant potential of trehalose in insects under water restriction. Recently, he finished his PhD (biochemistry) (2008) in which, working with microalgae, he presented the potential use of macroalgae as important marine pollution indicators. Torres has large expertise in design experiments, microalgae culture, and practice in the field to collect sample. In addition, Torres has experience in lab protocols, particularly, enzymatic antioxidant assays, enzymatic biotransformation process using spectrophotometer and fluorimeter analysis and HPLC chromatography. He has 11 scientific papers published and 3 book chapters. Additionally, he attends frequently the national and international congress in these common areas. Finally, Torres is a teacher, at University of Cruzeiro do Sul, São Paulo – Brazil, teaching Biochemistry and Comparative Physiology to Biological Sciences (under graduation courses) and Environmental pollution and biotransformation processes (pos graduation courses).

1. Personal:

Married, born in Joinville, Santa Catarina, Brazil in 1969.

2. Education:

PhD in Biochemistry (2004 – 2008) - Universidade de São Paulo, USP, Brazil.

Thesis Title: Oxidative stress markers in *Minutocellus polymorphus* under oxyfluorfen and benzo[a]pyrene exposure.

Adviser: Pio Colepicolo Neto.

Support: National Council to Technological and Scientific Development, CNPq, Brazil.

M. Sc. in Biochemistry (2000 – 2003) - Universidade de São Paulo, USP, Brazil.

Thesis Title: Antioxidant trehalose role in the firefly *P. termitilluminans* under water restriction.

Adviser: Prof. Dr. Etelvino J. H. Bechara.

Support: Scientific Research Funding to State of São Paulo, FAPESP, Brazil.

B.Sc. in Biology (1995 – 2000) - Universidade Federal de Santa Catarina, UFSC, Brazil.

Thesis Title: Oxidative Stress in the mussel *M. Guayanensis* from polluted mangroves.

Adviser: Prof. Dr. Danilo Wilhelm Filho.

Support: National Council to Technological and Scientific Development, CNPq, Brazil.

B.A. in Education (1992 – 1995) - Faculdade de Educação de Joinville, ACE - FEJ, Brazil.

3. Selected Complementary Courses:

(2008) – MS/MS and HPLC, Applied Biosystems, Co. USP, SP - Brazil

(2007) – Electrochemistry detection and HPLC, ESA, Co. Boston, MA – USA

(2004) – Gas and liquid chromatography. Phenomenex, Co. São Paulo, SP – Brazil

(2001) – HPLC Basic school. Waters, Co. São Paulo, SP – Brazil

(1997) – Molecular cytogenetics. UFSC, Florianópolis, SC – Brazil

(1995) – Modern themes in mutagens. UFSC, Florianópolis, SC – Brazil.

4. Professional Experience:

(2004 – present) – Biochemistry and Molecular Biology of Algae, USP, São Paulo, SP – Brazil.

Head of Lab and Team Leader: Prof. Dr. Pio Colepicolo Neto.

Themes: Cytochrome P450 and Glutathione S-Transferase activities in algae.

(2005) – Plant Cellular and Molecular Lab, OSU, Columbus, OH – USA

Head of Lab and Team Leader: Prof. Dr. Richard Sayre.

Themes: Metallothionein chimera gene expression in Chlamydomonas as heavy metal fluorescent biosensor.

(2000) – Biochemistry and Pharmacology Lab, UBA, Buenos Aires, BA – Argentina.

Head of Lab and Team Leader: Prof. Dr. Alberto Boveris.

Themes: Antioxidants and vitamins content by HPLC UV/VIS detection in biological fluids.

(1997 – 2000) – Aquatic Ecophysiology Lab, UFSC, Florianópolis, SC – Brazil.

Head of Lab and Team Leader: Prof. Dr. Danilo Wilhelm Filho.

Themes: Oxidative stress in aquatic organism.

(1996 – 1997) – Biomarkers of Aquatic Cont. Lab, UFSC, Florianópolis, SC – Brazil.

Head of Lab and Team Leader: Prof. Dr. Afonso Celso Dias Bainy.

Themes: Biochemistry parameters in mussels as indicators of marine pollution.

5. Teaching Experience:

(2007 – present) – Assoc. Teacher - Pos Grad. Prog. – Environm. Chemist. (UNICSUL), São Paulo, SP – Brazil.

(2006 – present) – Assis. Teacher II – Under Graduation Program – Biology (UNICSUL), São Paulo, SP – Brazil.

(2006 - present) – Pos grad. monitor – Themes in biochem. and mol. biol. (USP), São Paulo, SP – Brazil.

(2002 – 2003) – Under grad. monitor class – Biochem. and Pharm. (USP), São Paulo, SP – Brazil.

(1994 – 1999) – High school science teacher, Florianópolis, SC - Brazil

6. Academic Activities and Services:

▪ **Research orientation and co-supervision:**

(2007) – Analysis of Cytochrome P450 in microsomal fraction of macroalgae.

Student: Erica Pereira. Biology under graduation course. UNICSUL, São Paulo, SP – Brazil. (Adviser)

(2006) – Extract of *Nim Azadiracta indica* as an alternative product to synthetic pesticides.

Student: Silvana Zampol. Sciences Pos Graduation course. CEU, São Paulo, SP – Brazil. (Adviser)

(2002) – Metabolic connections between oxidative and water restriction stress in insect larvae.

Student: Paulo Avila Jr. Chemistry under grad. Cour. IQUSP, São Paulo, SP – Brazil. (Co-Adviser)

▪ **Attendance and Invited Speaker in Scientific Meetings:**

(2008) – 3rd. National Meeting of Swimmers – Oxidative stress and its implication in the high performance swimmers. São Paulo, SP – Brazil. (Invited speaker)

(2007) – 14th (PRiMO) International Symposium of Pollutant Responses in Marine Organisms. Florianópolis, SC, Brazil. (Attendance)

(2006) – 3rd Regional Meeting in Biological Sciences. – Evolutionary Alternatives in the algal detoxification systems. São Paulo, SP – Brazil. (Invited speaker)

(2005) – Annual Chemistry Seminar. Pollutant monitoring and microbiological bioremediation. São Paulo, SP – Brazil. (Invited speaker)

▪ **Industrial Consulting Activities:**

(2003) – Development of an acclimatized marine microalgae culture room. São Paulo, SP – Brazil.

Research Leader – Prof. Dr. Pio Colepicolo, IQ/USP.

(2002) – Development of a demolding based-water resin to auto industries. São Paulo, SP – Brazil.

Research Leader – Prof. Dr. Cassius V. Stevani, IQ/USP.

(2001) – Development of H₂O₂ treatment protocols to PAH soils contaminated. Salvador, BA – Brazil.

Research Leader – Prof. Dr. Etelvino J. H. Bechara, IQ/USP.

▪ **Congress and Meeting organization:**

(2007) – International Workshop - Biochemical and Molecular Approaches in Ecotoxicology: Emphasis in Algae and Mollusks. Florianópolis, SC – Brazil.

▪ **National and International Society:**

(2007 – Present) – Member of Intern. Society of Environmental Toxicology and Chemistry (SETAC)

(2005 – present) – Member of Brazilian Society of Ecotoxicology. (SETAC-Brazil)

(2000 – present) – Member of Brazilian Society of Biochemistry and Molecular Biology. (SBBq)

7. Skills:

Languages: Portuguese (Native); English (Advanced); Spanish (Basic); German (Basic).

Programming: Action script.

Operating systems: Linux, Windows, Mac OS X.

Distinct Software: Origin 8; Statistic 8, Flash MX, Corel Draw 14.

8. Honors and Awards:

(2006) – IX ECOTOX meeting – Oral Presentation – Águas de São Pedro, SP, Brazil.

(2005) – IMB Conference – Best Poster Faustus Award – Vienna, AU, Austria.

(2005) – IVth SFRBM South American Group – Oral Presentation, Águas de Lindóia, MG, Brazil.

(2005) – 26th SETAC North America meeting – Oral Presentation – Baltimore, MA, USA.

(2003) – XXXII SBBq Annual Meeting – Oral Presentation – Caxambu, MG, Brazil.

(2000) – Outstanding Graduate Student Award – UFSC, Florianópolis, SC, Brazil.

(1999) – XXth ESCPB Conference – Oral Presentation – Aarhus, JT, Denmark

(1997) – XVth BMM meeting – Oral Presentation – Florianópolis, SC, Brazil.

9. Research interest

- Oxidative stress;
- Bitransformations reactions;
- ABC transporters;
- Risk assessment;
- Biomonitoring;
- Marine pollution

10. Selected Congress Participations:

1) MARQUES, M.R.F.; CAMPOS, S.C.G.; CARDOZO, K.H.M.; GUARATINI, T.; TORRES, M. A.; COLEPICOLO, P. Changes in malondialdehyde and pigment content during growth of marine microalgae *Tetraselmis gracilis*. In: XXXVI Reuniao da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular (SBBq), 2007, Salvador, BA, Brazil.

2) TORRES, M.A.; COLEPICOLO, P. Antioxidant defenses and biotransformation process in microalgae under herbicide and benzo[a]pyrene exposition. In: V Meeting of the South American Group - Society for Free Radicals in Biology and Medicine (SFRBM), 2007, Montevideo, Uruguay.

3) CAMPOS, S.C.G.; TORRES, M. A.; PINTO, E.; COLEPICOLO, P. Oxidative aspects during phenol biotransformations by the marine microalgae *Minutocellus polymorphus*. In: Society of Environmental Toxicology and Chemistry 17th Annual Meeting (SETAC - Europe), 2006, Hague, Netherlands.

4) TORRES, M.A.; FALCÃO, V.R.; RAJAMANI, S.; Ewalt, J.; COLEPICOLO, P.; SAYRE, R.T. Transgenic Microalgae as Heavy Metal Biosensors. In: XXXV Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 2006, Águas de Lindóia, SP, Brazil.

5) TORRES, M.A.; CAMPOS, S.C.G.; LEITÃO, M. A.; COLEPICOLO, P. Estresse oxidativo e biotransformação de fase II em culturas da diatomácea *Minutocellus polymorphus* expostas ao benzo[a]pireno. In: IX Congresso Brasileiro de Ecotoxicologia (SETAC - Brazil), 2006, Águas de São Pedro, SP, Brazil.

6) TORRES, M. A.; CAMPOS, S.C.G.; PINTO, E.; COLEPICOLO, P. Oxidative stress implications in diatom *Minutocellus polymorphus* exposed to both oxyfluorfen and phenol pollutants.. In: IVth Meeting of the South American Group of the Society for Free Radical Research in Biology and Medicine, 2005, Águas de Lindóia, SP, Brazil.

7) MARTINS, K.; TORRES, M. A.; STEVANI, C. V. Antioxidant and lignolytic enzymes of the bioluminescent fungus *Gerronema viridilucens*.. In: IVth Meeting of the South American Group of the Society for Free Radical Research in Biology and Medicine, 2005, Águas de Lindóia, SP, Brazil.

8) TORRES, M.A.; CAMPOS, S.C.G.; Souza, L.M.; COLEPICOLO, P. Response of Oxidative Enzymes in the Diatom *Minutocellus polymorphus* Exposed to Diphenyl Ether Herbicide.. In: Society of Environmental Toxicology and Chemistry 26th Annual Meeting (SETAC - North America), 2005, Baltimore, MA, USA.

9) LEITÃO, M.A.; CARDOZO, K.H.M.; CAMPOS, S.C.G.; TORRES, M.A.; PINTO, E.; COLEPICOLO, P. PCB-Induced oxidative stress in the toxic unicellular marine dinoflagellate *Lingulodinium polyedrum*. In: VIII Congresso Brasileiro de Ecotoxicologia (SETAC - Brazil), **2004**, Florianópolis, SC, Brazil.

10) TORRES, M.A.; ÁVILA, P.; BECHARA, E.J.H. Metabolic study of trehalose in *Pyrearinus termitilluminans* larvae under moderate anhydrobiosis. In: XXXII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, **2003**, Caxambu, MG, Brazil.

11) MOREIRA, E. A.M.; FAGUNDES, R.L.M.; FACCIN, G.L.; COUTO, M.C.; TORRES, M.A.; WILHELM FILHO, D. The effect of alcohol ingestion during lactation on oxidative stress. In: 17th International Congress of Nutrition - ICN, **2001**, Viena, AU. Austria.

12) MARCON, J.L.; TORRES, M.A.; COSTA, C.C.A.; WILHELM FILHO, D.; CARRASQUEDO, F.; FRAGA, C.; BOVERIS, A. Enzymatic and non-enzymatic antioxidants in plasma and tissues from hatchling and adult Amazon freshwater turtles. In: IInd Meeting of the South American Group of the Society for Free Radical Research in Biology and Medicine, **2001**, Mar del Plata, BU, Argentina.

13) WILHELM FILHO, D.; TORRES, M.A. Antioxidant defenses in vertebrates a comparative approach. In: XXth European Society for Comparative Physiology and Biochemistry Conference, **1999**, Aarhus, JT, Denmark.

14) WILHELM FILHO, D.; TORRES, M.A.; TESTA, C.P.; TRIBESS, T.; GÁSPARI, C.; PEDROSA, R.C.; SILVA, M.H. Inhibition of fish antioxidant defenses in marine polluted sites. In: Annual International Symposium of the Fisheries Society of the British Isles, **1999**, St. Andrews, Scotland.

15) TORRES, M.A.; TRIBESS, T.; TESTA, C.P.; PEDROSA, R.C.; WILHELM FILHO, D. Antioxidant defenses in the mangrove mussel *Mytella Guayanensis*. In: Society of Environmental Toxicology and Chemistry 19th Annual Meeting (SETAC - North America), **1998**, Charlotte, NC, USA.

16) WILHELM FILHO, D.; TESTA, C.P.; TRIBESS, T.; TORRES, M.A.; SOARES, C.H.L.; PEDROSA, R.C.; BAPTISTA, I. . The comparative effect of bleaching and non-bleaching pulp mill effluents on the antioxidant defenses of tilapia, *Oreochromis niloticus*. In: Society of Environmental Toxicology and Chemistry 19th Annual Meeting (SETAC - North America), **1998**, Charlotte, NC, USA.

17) WILHELM FILHO, D.; SOARES, C.H.L.; PEDROSA, R.C.; TORRES, M.A.; GASPARI, C.; TESTA, C.P.; TRIBESS, T.; BAPTISTA,

I. The comparative effect of kraft pulp mill effluents on fish antioxidants. III - Final effluents of the non-bleaching process. In: V Encontro Brasileiro de Ecotoxicologia (SETAC - Brazil), **1998**, Itajaí, SC, Brazil.

18) MOREIRA, E.A.M.; FAGUNDES, R.L.M.; FACCIN, G.L.; COUTO, M.C.; TRIBESS, T.; TORRES, M.A.; WILHELM FILHO, D. Can alcoholism during lactation elicit oxidative stress in the offspring?. In: IX Bienial Meeting International Society for Free Radical Research in Biology and Medicine, **1998**, São Paulo, SP. Brazil.

19) TORRES, M.A.; TRIBESS, T.; WILHELM FILHO, D. Comparative antioxidant defenses in the mangrove mussel, *Mytella guayanensis* from the Santa Catarina Island. In: XXVII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, **1998**, Caxambu, MG, Brazil.

20) TORRES, M.A.; WILHELM FILHO, D.; TESTA, C.P.; TRIBESS, T.; GÁSPARI, C.; SILVA, M.H. Inibição das defesas antioxidantes do bagre *Genidens genidens* em locais poluídos. In: V Encontro Brasileiro de Ecotoxicologia (SETAC - Brazil), **1998**, Itajaí, SC. Brazil.

21) ALMEIDA, E.A.; TORRES, M.A.; BAINY, A.C.D. Comparison of antioxidant defenses in wild and farmed mussels (Perna perna). In: XXVI Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, **1997**, Caxambu, MG, Brazil.

22) TORRES, M.A.; ALMEIDA, E.A.; BAINY, A.C.D. Biomarcadores bioquímicos em mexilhões Perna perna de Arraia do Cabo - RJ e da Ilha de Santa Catarina - SC. In: XV Encontro Brasileiro de Malacologia, **1997**, Florianópolis, SC, Brazil.

23) TORRES, M.A.; BAINY, A.C.D. Análise de parâmetros antioxidantes em camarões (*Penaeus paulensis*) Ablados. In: VII Seminário de Iniciação Científica da UFSC, **1997**, Florianópolis, SC, Brazil.

24) ALMEIA, E.A.; TORRES, M.A.; PETERSEN, R.L.; BAINY, A.C.D. Análise de parâmetros antioxidantes em camarões abladados. In: XII Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental, **1997**, Caxambu, MG, Brazil.

25) TORRES, M.A.; ALMEIDA, E.A.; ZANIBONI FILHO, E.; BAINY, A.C.D. Defesas antioxidantes em Pacu (*Piaractus mesopotamicus*) expostos a diferentes níveis de oxigênio. In: V Reunião Especial da Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência, **1997**, Blumenau, SC, Brazil.

11. Publications:

Original Papers and Reviews:

▪ TORRES, M.A.; BARROS, M.P.; CAMPOS, S.C.G.; PINTO, H.; RAJAMANI, S.; SAYRE, R.T.; COLEPICOLO, P. Biochemical Biomarkers in Algae and Marine Pollution: A Review. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, [E-pub ahead of print], **2008**.

▪ BECHARA, E.J.H.; COSTA, C.; COLEPICOLO, P.; VIVIANI, V.; BARROS, M.P.; TIMMINS, G. S.; LALL, A.; TERRA, W.R.; FERREIRA, C.; STEVANI, C.V.; TORRES, M.A. Chemical, biological and evolutionary aspects of beetle bioluminescence. *ARKIVOC*, v. 8, p. 311-323, **2007**.

▪ CARDOZO, K.H.M.; GURATINI, T.; FALCÃO, V.R.; BARROS, M.P.; TORRES, M.A.; CAMPOS, S.C.G.; Lopes, N.P.; PINTO, E.; COLEPICOLO, P. Metabolites from algae with economical impact. *Comparative Biochemistry and Physiology*. C, v. 146, p. 60, **2007**.

▪ WILHELM FILHO, D.; TORRES, M.A. Antioxidant therapy attenuates oxidative stress in chronic cardiopathy associated with Chagas' disease. *International Journal of Cardiology*, v. 123, p. 43-49, **2007**.

- SCHWINGEL, A.C.; WILHELM FILHO, D.; TORRES, M.A.; PETROSKI, E.L. Exercise session promotes antioxidant changes in Brazilian soccer players. *Biology of Sport*, v. 23, p. 255-265, **2006**.
- WILHELM FILHO, D.; TORRES, M.A.; ZANIBONI-FILHO, E.; PEDROSA, R.C. Effect of different oxygen tensions on weight gain, feed conversion, and antioxidant status in piapara, *leporinus elongatus* (Valenciennes, 1847). *Aquaculture* (Amsterdam), Londres, v. 244, n. 1-4, p. 349-357, **2005**.
- WILHELM FILHO, D.; TORRES, M.A.; Bordin, A.L.B.; CREZCZYNSKI-PASA, T.B.; BOVERIS, A. Spermatic cord torsion, reactive oxygen and nitrogen species and the ischemia-reperfusion injury. *Molecular Aspects in Medicine*, New York, v. 25, n. 1-2, p. 199-210, **2004**.
- TORRES, M.A.; TESTA, C.P.; GÁSPARI, C.; MASUTTI, M.B.; PANITZ, C.M.N.; PEDROSA, R.C.; ALMEIDA, E.A.; MASCI, P.; WILHELM FILHO, D. Oxidative stress in the mussel *Mytella guayanensis* from polluted mangroves on Santa Catarina Island, Brasil. *Marine Pollution Bulletin*, Londres, v. 44, n. 9, p. 923-932, **2002**.
- WILHELM FILHO, D.; TRIBESS, T.; GÁSPARI, C.; CLAUDIO, F. D.; TORRES, M.A.; MAGALHÃES, A.R.M. Seasonal changes in antioxidant defenses of the digestive gland of the brown mussel (*Perna perna*). *Aquaculture* (Amsterdam), Londres, v. 203, p. 149-158, **2001**.
- WILHELM FILHO, D.; TORRES, M.A.; TRIBESS, T.; PEDROSA, R.C.; SOARES, C.H.L. Influence of season and pollution on the antioxidant defenses of the cichlid fish acará (*Geophagus brasiliensis*). *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, São Paulo, v. 34, n. 6, p. 719-726, **2001**.
- WILHELM FILHO, D.; TORRES, M.A.; MARCON, J.L.; FRAGA, C.; BOVERIS, A. Comparative antioxidant defences in vertebrates - emphasis on fish and mammals. *Trends in Comparative Biochemistry and Physiology*, v. 7, p. 37-45, **2000**.

Book Chapters:

- RAJAMANI, S.; SIRIPORNALDULSIL, S.; FALCÃO, V.R.; TORRES, M.A.; COLEPICOLO, P.; SAYRE, R.T. Phycoremediation of heavy metals using transgenic microalgae. In: Leon, Rosa; Galvan, Aurora; Fernandez, Emilio. (Org.). *Transgenic Microalgae as Green Cell Factories*. New York: Springer, **2007**, v. 616, p. 99-107.
- WILHELM FILHO, D.; TORRES, M.A.; TESTA, C.P.; TRIBESS, T.; GEREMIAS, R.; PEDROSA, R.C.; SILVA, M.H. Estresse Oxidativo em Bagres *Genidens genidens* (Arridae) do Litoral de Santa Catarina. In: Moraes, R; Crapez, M; Pfeifer, W; Farina, M; Bairy, A; Teixeira, V. (Org.). *Efeitos de poluentes em organismos marinhos*. São Paulo: VilliPress, **2001**.
- RIBEIRO, L.; TRIBESS, T.; TORRES, M.A.; SOARES, C.H.L.; PEDROSA, R. C.; AGOSTINI, J.; BUENO, A.; WILHELM FILHO, D. Estresse oxidativo em tilápia (*Oreochromis niloticus*) exposta ao efluente de indústria têxtil. In: Espindola, E. L. G.; Botta-Paschoal, C. M. R.; Rocha, O.; Bohrer, M. B. C.; Oliveira-Neto, A. L.. (Org.). *Ecotoxicologia: Perspectivas para o século XXI*. 1 ed. São Carlos: RiMa, **2000**, v. , p. 441-449.

Popular science magazines:

TORRES, M.A.; COLEPICOLO, P. Determinação do Índice Redox de glutatona, Um biomarcador de contaminação marinha e alga, utilizando um HPLC acoplado a um detector eletroquímico Flow-Through.. *Analytica*, Sao Paulo, SP, p. 96 - 104, 01 ago. **2007**.

12. Referees:

1) PIO COLEPICOLO NETO
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO - USP
Instituto de Química – Dep. Bioquímica
e-mail: piocolep@iq.usp.br

3) DANILO WILHELM FILHO
UNIV. FEDERAL DE SANTA CATARINA - UFSC
Centro de ciências biológicas – Dep. Ecologia e Zoologia
e-mail: dawifi@ccb.ufsc.br

2) EETELVINO J. H. BECHARA
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO - USP
Instituto de Química – Dep. Bioquímica
e-mail: ebechara@iq.usp.br

4) AFONSO C. D. BAINY
UNIV. FEDERAL DE SANTA CATARINA – UFSC
Centro de ciências biológicas – Dep. Bioquímica
e-mail: bainy@mbox1.ufsc.br