UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

INSTITUTO DE QUÍMICA

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas

(Bioquímica)

Eliezer Stefanello

Estudo dos efeitos tóxicos de antraceno sobre a microalga Chlamydomonas

reinhardtii

Versão Corrigida da Tese

São Paulo

17/07/2015

Eliezer Stefanello

Estudo dos efeitos tóxicos de antraceno sobre a microalga Chlamydomonas

reinhardtii

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

Orientador: Prof Dr Pio Colepicolo Neto

São Paulo

2015

Eliezer Stefanello

Estudo dos efeitos tóxicos de antraceno sobre a microalga Chlamydomonas reinhardtii

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

Aprovado em: _____

Banca I	Examinad	lora
---------	----------	------

Prof. Dr
Instituição:
Assinatura:
Prof. Dr
Instituição:
Assinatura:
Prof. Dr
Instituição:
Assinatura:

Prof. Dr	 	 	
Instituição:	 	 	-
Assinatura:	 	 	
Prof. Dr	 	 	
Instituição:	 	 	-
Assinatura:	 	 	

Aos meus pais, Rudimar e Maria

e a minha irmã, Luiza

por tudo o que eles representam pra mim

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Rudimar e Maria que me deram a vida, educação, puxões de orelha quando necessário e por respeitarem minhas decisões mesmo quando julgaram não ser a melhor escolha.

A minha irmã Luiza, por me aturar e ser minha companheira de crimes em casa. Te adoro magrela!

Ao Dr. Pio Colepicolo pela amizade, paciência, disponibilidade e orientação durante esses anos como seu aluno de doutorado e pela oportunidade única que me deu em conhecer um dos lugares mais lindos do planeta, a Antártica.

Aos bons amigos do grupo do professor Pio: Aline, Batata (Cícero), Cíntia, Dina, Erechim (Daniel), Érika, Leonardo, Luiza, Helena e Tati, pela amizade, convivência, discussão de resultados e momentos de descontração.

Aos técnicos, Ed e Sandrinha.

Ao grupo do professor Dr. Silas Villas-Bôas, da Universidade de Auckland, pela oportunidade única que me foi dada ao me receber em seu laboratório para aprender sobre metabolômica, e em especial a Dra. Francesca Casu, por me ensinar tudo e pela grande amizade e em momentos de socorro depois que eu voltei ao Brasil, tirando dúvidas e dando sugestões úteis ao trabalho. Ao Dr. Sergey Tumanov, por me ensinar a parte de lipidomica,

me incentivar a aprender a programar em R, ao Dr. Morgan Han, por me ensinar a utilizar os scripts e me socorrer com os scripts quando precisei e a todos os outros alunos do grupo: Alex, Farhana, Melodie, Mikhail, Nina e Raphael por me receberem bem e pela boa convivência e amizade pelo curto período que estive por lá.

A Jully Pinheiro por ter me recebido em sua casa durante o período que estive na Nova Zelândia e por me mostrar este país lindo.

À Dra. Regina Baldini, pela grande paciência, dedicação e disponibilidade e simpatia durante meu mestrado e depois dele com sua amizade.

Aos amigos do grupo da professora Regina: Ana Paula, Ana Laura, Diogo, Gian, Gilberto e Patrícia por ajudarem sempre quando necessário e pelos momentos de descontração dentro e fora do laboratório durante meu mestrado.

Aos amigos Feto, Sinistro, Valdir, Felipe, Seninha, Pererê, Guilherme e Seninha (Rodrigo), Rodriguinho, Gian, Vaeudo, Érika, Santiago e Cíntia, pelos ótimos momentos nas diversas repúblicas que morei.

À Dra. Suely Lopes Gomes pela oportunidade que me deu quando ainda era um aluno de graduação no Paraná em me receber em seu laboratório para um estágio e me abriu as portas para entrar para o IQ-USP

Ao pessoal do grupo da professora Suely: André, Anne, César, Cristian, Gabriela, Juliana, Karina, Raphaela, Rogério, Michele.

As professoras, Dra. Rita de Cássia Garcia Simão, pela orientação durante minha graduação como seu aluno de iniciação científica e por ter aberto as portas para eu chegar até aqui; a professora Dra. Marina Kimiko Kadowaki e a professora Dra. Clarisse Aoki Osaku por me dar as bases em Bioquímica. Ao professor Dr. Vladimir Pavan Margarido que me deu as bases de genética molecular e pelas longas horas de conversa sobre ciência entre outras coi durante minha graduação e amizade que ainda perdura até hoje.

Aos funcionários da secretaria de pós- graduação, Cibele, Emiliano e Milton pela atenção, ajuda e eficiência sempre que necessário.

Aos meus grandes amigos do Paraná, que sempre me aturaram e me fizeram feliz durante minha vida, e que sempre faziam da minha curta passagem por casa nos feriados bastante movimentada.

E a FAPESP, CNPq e a CAPES pelo apoio financeiro, sejam eles pela concessão de bolsas ou pelos projetos do laboratório financiados por estas agências.

Science is not perfect: it is often misused. It is only a tool, but it is the best tool we have. Selfcorrecting, ever changing, applicable to everything. With this tool, we vanquish the impossible." - Carl Sagan

RESUMO

Stefanello, E. Estudo dos efeitos tóxicos de antraceno sobre a microalga *Chlamydomonas reinhardtii*. Ano: 2015. 110 páginas. Tese de Doutorado. Programa de Pós-Graduação em
Bioquímica. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

A produção e emissão de poluentes é geralmente derivada da alta atividade humana, por meio da utilização dos recursos naturais, desenvolvimento de infraestrutura e construção, atividades agrícolas, desenvolvimento industrial, urbanização, turismo e uma série de outras atividades. Poluente é tudo o que é introduzido pelo homem, de forma direta ou indireta, de substâncias ou energia que resultem ou possam resultar em efeitos adversos a vida. As principais classes de poluentes são os pesticidas, poluentes orgânicos, nutrientes, óleos, isótopos radioativos, metais pesados, patogênicos, sedimentares, lixo e escombros entre outros. O descarte em efluentes aquáticos é uma prática antiga no modo como lidamos com nossos dejetos e em consequência disso, a maioria dos ambientes aquáticos encontram-se poluídos em maior ou menor grau. Dentre os poluentes orgânicos, encontramos uma classe de moléculas denominadas de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA). Os HPAs são uma grande família de compostos derivados da fusão de anéis benzênicos que contém dois anéis benzeno fundidos e seus derivados, até estruturas contendo 10 anéis. A toxicidade dos HPAs é resultado de sua hidrofobicidade. Estes compostos podem induzir mudanças conformacionais na estrutura de biomembranas resultando em aumento em sua permeabilidade. Como consequência, a capacidade fotossintética desses organismos é prejudicada podendo levar a sérios distúrbios na cadeia de transporte de elétrons e desacoplamento da fosforilação oxidativa. O Antraceno (ANT) é uma molécula formada pela fusão de 3 anéis benzênicos e é um dos 16 HPAs prioritários segunda a US EPA, e é classificado como muito tóxico para organismos aquáticos e que pode causar efeitos adversos de longo prazo no ambiente aquático. Além disso, ANT é facilmente fotoxidado a produtos ainda mais tóxicos, especialmente quinonas, que interferem na respiração e na fotossíntese, causando problemas no desenvolvimento das algas levando a falência do ecossistema devido à diminuição da biomassa, deficiência de oxigênio e inibição de processos de desintoxicação. A quantidade de informações referentes aos efeitos causados ao metabolismos destes organismos fotossintetizantes é bastante limitada e para suprir esta carência, utilizamos a microalga modelo Chlamydomonas reinhardtii com a finalidade de ampliar o conhecimento dos efeitos tóxicos de antraceno no metabolismo destes organismos utilizando uma abordagem de metabolômica que utiliza GC-MS. Como resposta metabólica a exposição de ANT, ácidos graxos acumularam em C. reinhardtii. De forma semelhante, outra resposta encontrada foi acumulo de aminoácidos. Com exceção de valina, todos os aminoácidos encontrados em nossa análise por GC-MS se acumularam nas culturas expostas a ANT. Outra molécula importante encontrada em nossas análises foi a glutationa, possivelmente causada pela produção de EROs. Muitos ácidos carboxílicos foram encontrados em nossas análises e entre estes, a via metabólica mais impactada foi o ciclo do glioxilato. Juntamente com acumulo de glioxilato, muitos intermediários do ciclo do ácido cítrico foram encontrados tais como succinato e malato. Para tanto, o acumulo de malato é dependente de glioxilato e acetato, presente no meio de cultura. O produto deste gene catalisa a reação entre glioxilato e acetil-CoA formando malato como produto final. Com estes dados, podemos sugerir que para compensar pela fotossíntese deficiente, o metabolismo heterotrófico de acetato produzindo acetil-CoA é uma fonte importante de energia, e a via de glioxilato tem um papel central durante o estresse causado por ANT. Além disso, a incorporação de carbonos através do ciclo do glioxilato pode permitir a síntese de outras moléculas mais complexas como aminoácidos, lipídeos e carboidratos.

Palavras-chave: Metabolômica, Fotossíntese, Metil Cloroformato, Hidrocarbonetos Policíclico Aromático, Via do Glioxilato, GC-MS

ABSTRACT

Stefanello, E. **Study of toxic effects of anthracene on microalgae** *Chlamydomonas reinhardtii.* Year: 2015. 110 pages. PhD Thesis. Graduate Program in Biochemistry. Intituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

The production and emission of pollutant are often derived from human activities, such as utilizing natural resources, developing infrastructure, agriculture and industry among others. Pollutant is defined as substances or energy introduced into the environment by man, directly or indirectly that may result in adverse effects on life. Pollutants can be divided into various classes including organic, nutrients, oils, radioactive isotopes, heavy metals, pathogenic, sediments, garbage among others. Disposal of sewage on water bodies is an old habit of how we deal with our wastes. Consequently, great part of the aquatic environment becomes polluted in various extents. Among the organic pollutants, polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) represents a class of molecules consisting from two or more fused benzene rings and its by-products. Members of this class of compounds have been identified as exhibiting toxic and hazardous properties. Their toxicity is also due to its hydrophobic property that induces conformational changes on membranes, increasing their permeability. Consequently, the photosynthetic capacity of exposed organisms can be harmed, leading to serious imbalances on their electron chain transport and uncoupling oxidative phosphorylation. Anthracene (ANT) is a PAH formed by three fused benezenic rings and is one of the 16 prioritary PAH according to American and European regulatory agencies. ANT is classified as highly toxic for aquatic organisms causing long term effects on environment. Besides, ANT can be easily photooxidated and its products can be even more toxic, specially quinones, that can interfere on respiration and photosynthesis, leading to problems on algae development and ecosystem collapse caused by low biomass, oxygen deficiency and inhibition of detoxification processes. The amount of information about the effects on metabolism of the photosynthetic organisms is limited. Therefore our main goal was to use the model organism Chlamydomonas reinhardtii in order to gain insights on the toxic effects caused by ANT through GC-MS metabolomics approach. A metabolic response to ANT exposure, lipid accumulates in C. reinhardtii. Similarly to fatty acids, another marked physiological response was amino acids accumulation. With the exception of valine, all amino acids found in our GC-MS analysis showed a marked relative accumulation in cultures exposed to ANT. Another important finding was the high level of glutathione, possibly caused by ROS production. Carboxylic acids were also found in our analysis and among them a highly impacted pathway found was glyoxylate cycle. Toghether with the increase accumulation of glyoxylate, many TCA cycle intermediates, like succinate and malate were found. Furthermore, malate accumulation is dependent of glyoxylate and acetate, present in culture media. The product of this gene catalyse the reaction between glyoxylate and acetyl-CoA forming malate as a final product. Taken all together, our findings suggest that to compensate the photosynthesis inhibition, heterotrophic acetate metabolism was activated producing acetyl-CoA an important energy source, and glyoxylate cycle plays a central role during stress caused by ANT. Furthermore, incorporation of carbon through glyoxylate cycle can enable synthesis of more complex molecules like amino acids, lipids and carbohydrates

KEYWORDS: Metabolomics, Photosynthesis, Methyl chloroformate, Polycyclic aromatic hydrocarbons, Glyoxylate pathway, GC-MS

LISTA DE ABREVIATURAS

AMDIS	Automated Mass-Spectral Deconvolution and Identificatin System
ANOVA	Análise de variância - Analysis of variance
ANT	Antraceno
BaP	Benzo(a)pireno
BSTFA	N,O-bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida
CAT	Catalase
CDNB	1-cloro-2,4 dinitrobenzeno
CE	Eletroforese Capilar – Capilar Electrophoresis
CytP450	Citocromo P450
DMSO	Dimetilsulfóxido
DO	Densidade óptica
EI	Impacto de elétrons – Electron Impact
ERO	Espécie Reativa de Oxigênio
ESI	Ionização por elétron spray – Electron Spray Ionization
FC	Fold change
FDR	False Discovery Rate
FT-ICR	Ressonância ciclotrônica de íons por transformada de Fourier - Fourier transform
	ion cyclotron resonance
FTIR	Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier - Fourier Transform
	Infrared Spectroscopy
GC	Cromatografia Gasosa - Gas Chromatography
GC-MS	Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas - Gas chromatography

coupled with mass spectrometry

GSH	Glutationa	reduzida

- GSSH Glutationa oxidada
- GST Glutationa S-transferase
- HPA Hidrocarboneto policíclico aromático
- IC₅₀ 50% de inibição de crescimento
- IMS Espectrometria de mobilidade de íons *Ion mobility spectrometer*
- KEGG Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomics
- LC Cromatografia Líquida Liquid Chromatography
- LC-MS Cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas Liquid chromatography coupled with mass spectrometry
- MALDI Ionização e dessorção a laser assistida por matriz *Matrix-Assisted Laser* Desortion Ionization
- MCF Metil cloroformato
- MS Espectrometro de Massas Mass Spectrometer
- MS/MS Espectrometria de massas em tandem
- MSI Metabolomics Standard Initiative
- MSTFA N-metil-N-(trimetilsilil)trifluoroacetamida
- NADPH Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato
- Q Quadrupolo
- QIT Quadrupolo íon-trap
- RMN Ressonância Magnética Nuclear
- SOD Superóxido Dismutase
- TAP Tris acetato fosfato *Tris Acetate Phosphate*
- TMS Trimetil silil
- ToF Tempo de voo *Time of Flight*

- US EPA United States Environmental Protection Agency
- UVA Ultra Violeta A

Sumário

1	INT	ſRODUÇÃO	21
	1.1	Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos	22
	1.2	Metabolização de compostos orgânicos em organismos fotossintetizantes	27
	1.3	Efeitos de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos em microalgas	29
	1.4	Antraceno	
	1.5	Chlamydomonas reinhardtii	
	1.6	Metabolômica	
	1.6.	.1 Desafios e limitações da metabolômica	
	1	.6.1.1 Impossibilidade de se analisar o metabolôma completo	
	1	.6.1.2 Identificação dos metabólitos	
	1	.6.1.3 Quantificação dos metabólitos	
	1.6.	.2 Métodos analíticos em metabolômica	40
	1	.6.2.1 Espectrômetros de massas	41
		1.6.2.1.1 Fontes de ionização	
		1.6.2.1.2 Analisadores de massas	43
	1	.6.2.2 Separação dos metabólitos	43
		1.6.2.2.1 Cromatografia líquida	43
		1.6.2.2.2 Cromatografia gasosa	44
2	OB.	JETIVOS	
3	MA	ATERIAIS E MÉTODOS	
	3.1	Linhagens e meios de cultivo	
	3.2	Teste toxicológico em C. reinhardtii (Determinação do IC ₅₀)	50
	3.3	Metabolômica	51
	3.3.	.1 Preparação das amostras e <i>quenching</i>	51
	3.3.	.2 Extração dos metabólitos intracelulares	
	3.3.	.3 Derivatização dos metabólitos por metil-cloroformato (MCF)	53
	3.3.	.4 Cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas (GC-MS)	54
	3.3.	.5 Quantificação de proteínas	56
	3.3.	.6 Identificação dos metabólitos	57
	3.3.	.7 Análise estatística	57
4	RE	SULTADOS	
	4.1	Curva de crescimento	
	4.2	Ensaios toxicológicos	
	4.3	Metabolômica	61
	4.3.	.1 Análise estatística	71
5	Dis	cussão	

6	Conclusões	.85
7	Referencias bibliográficas	.86
8	ANEXO	.96

1 INTRODUÇÃO

A produção e emissão de poluentes é geralmente derivada da alta atividade humana, por meio da utilização dos recursos naturais, desenvolvimento de infraestrutura e construção, atividades agrícolas, desenvolvimento industrial, urbanização, turismo e uma série de outras atividades (Shahidul Islam e Tanaka 2004). Poluente é tudo o que é introduzido pelo homem, de forma direta ou indireta, de substâncias ou energia que resultem ou possam resultar em efeitos adversos a vida. As principais classes de poluentes são os pesticidas, poluentes orgânicos, nutrientes, óleos, isótopos radioativos, metais pesados, patogênicos, sedimentares, lixo e escombros entre outros (Williams 1996). O descarte em efluentes aquáticos é uma prática antiga no modo como lidamos com nossos dejetos. Em consequência disso, a maioria dos ambientes aquáticos encontram-se poluídos em maior ou menor grau. Porém o descarte direto no ambiente aquático não é a única fonte de contaminação. Contaminantes que estão presentes no solo são carregados através da ação das chuvas pelo processo de lixiviação para rios, mares ou mesmo lençóis freáticos. Esta situação é ainda mais crítica em locais onde há grande concentração de atividade humana, como as cidades e metrópoles. Entretanto, o descarte direto de resíduos no meio aquático, ou através da lixiviação não são as únicas formas de que os poluentes dispões para atingir os corpos d'água, podendo chegar a eles através do ar (Shahidul Islam e Tanaka 2004; Torres, et al., 2008). Este fato pode ser confirmado através de observações de que poluentes não voláteis tenham sido encontrados em regiões remotas do planeta (Shen, et al., 2005). Em virtude deste impacto ambiental, os poluentes podem facilmente serem transferidos para níveis tróficos superiores e dependendo das características químicas do poluente acumularem em áreas específicas do tecido ou das células aumentando assim a sua concentração, por um processo denominado biomagnificação.

É inegável a necessidade de estudos cada vez mais frequentes e abrangentes sobre contaminação aquática e seus efeitos na biota marinha. Portanto, uma abordagem bioquímica ecotoxicológica em organismos que compõe base da cadeia trófica, apresenta-se essencial, uma vez que, as alterações metabólicas, refletidas na produção de energia nesses organismos, terão profundas consequências em todo o ecossistema.

1.1 Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos

Dentre os poluentes orgânicos, encontramos uma classe de moléculas denominadas de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA). Os HPAs são uma grande família de compostos derivados da fusão de anéis benzênicos que vão desde o naftaleno, o mais simples, que contém dois anéis benzeno fundidos e seus derivados, até estruturas contendo 10 anéis (Figura 1).



Figura 1 – Estrutura dos 16 Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos definidos como prioritários pela US EPA.
Adaptado de (Wang, *et al.*, 2006).

A atividade antropogênica é principal fonte geradora desses HPAs, principalmente através da queima de biomassa e combustíveis fosseis (especialmente carvão e petróleo), que correspondem a 57% do total global emitido anualmente dos HPAs, seguido por incêndios florestais (17%) em pelo uso de produtos de consumo (7%). A contribuição relativa dessas fontes de HPA varia conforme a estrutura energética, nível de desenvolvimento, densidade populacional e cobertura vegetal do país (Zhang e Tao 2009). São compostos altamente lipossolúveis, tendo alta afinidade por matéria particulada e material orgânico e por isto, se acumulam no sedimento (Shahidul Islam e Tanaka 2004). Estes compostos com características hidrofóbicas tendem a permanecer por longos períodos no ambiente e possuem grande capacidade de acumular-se em organismos. Normalmente as maiores concentrações de HPAs encontram-se nos sedimentos quando comparados com a coluna d'água. Estes compostos também se acumulam em grandes quantidades em algas, mariscos e peixes podendo levar a sérios problemas a saúde humana (Okay, et al., 2009; Torres, et al., 2008). Em humanos, os HPAs foram associados a imunotoxicidade, genotoxicidade, carcinogênese. Em crianças os HPAs foram associados a danos cognitivos e problemas respiratórios, como por exemplo asma (Baird, et al., 2005; Jedrychowski, et al., 2005; Mekonnen, et al., 2015; Perera, et al., 2009; Perera, et al., 2006).

Os HPAs apresentam baixa solubilidade em água, alto ponto de fusão e evaporação além de baixa pressão de vapor. Com o aumento no peso molecular, sua solubilidade em água diminui, ponto de fusão e evaporação aumentam, e a pressão de vapor diminui (Haritash e Kaushik 2009). Graças a estas características hidrofóbicas, estes compostos se associam a matéria particulada e são altamente lipossolúveis, o que fazem com que se distribuam rapidamente em uma série de tecidos com uma grande tendência de se localizarem nos adipócitos (Samanta, *et al.*, 2002). Além disso, HPAs necessitam de ativação metabólica, ou seja, necessitam de alguma transformação pelas células para serem tóxicas e carcinogênicas

(Shimada, et al., 2003; Szaefer, et al., 2008). Estes compostos absorvem luz no comprimento de onda correspondente a radiação UVA (320-400 nm), sendo que compostos contendo 4 ou mais anéis podem absorver luz em comprimentos na região do visível, acima de 400 nm. Esta absorção de luz faz com que os HPA sejam levados a níveis eletrônicos de mais alta de energia, e esta energia pode ser liberada através de emissão de luz ou calor, ou transferindo a energia para o oxigênio molecular ou moléculas biológicas, o que pode levar a geração de espécies reativas de oxigênio (EROs), ou HPAs foto-modificados que, por fim, podem danificar os constituintes da célula causando genotoxicidade (Wang, et al., 2007). Até o momento, não há evidências na literatura que ateste a existência concreta de sistemas de múltipla resistência em organismos fotossintetizantes e que possam ser usados como biomarcadores de poluição (Torres, et al., 2008). As enzimas de biotransformação são, normalmente, os biomarcadores bioquímicos de efeito mais sensíveis quando organismos são expostos a xenobióticos, podendo ter suas atividades induzidas ou inibidas, como demonstraram Pflugmacher e Sandermann (1998). Assim, a atividade de certos sistemas de detoxificação podem servir como monitor biológico (biomarcador) diante da exposição a certos tipos de compostos tóxicos (Pflugmacher e Sandermann 1998).

A produção e geração de EROs induzidos por HPAs é bem documentado na literatura, sendo demonstrado para várias classes de organismos incluindo bactérias, mamíferos, plantas e algas. Para combater estas EROs a célula dispõe de uma há uma série de mecanismos e sistemas de detoxificação e biotransformação. Dentre os diversos sistemas encontrados na célula o tripeptídeo γ -glutamil-cistenil-glicina (Figura 2) ou glutationa (GSH) é uma molécula fundamental para defesa e proteção celular (Noctor e Foyer 1998).



Figura 2 – Estrutura química do tripeptídeo γ-glutamil-cistenil-glicina, a glutationa (GSH).

Sua ação se dá por meio da transferência de um átomo de hidrogênio, e possui participação ativa em reações enzimáticas envolvidas na desintoxicação de H_2O_2 em conjunto com a ascorbato peroxidase e também na eliminação de peróxidos em reações catalisadas por glutationa peroxidase (Shao, *et al.*, 2007). Além disso, a GSH impede a desnaturação de macromoléculas, protegendo grupos tióis proteicos de processos oxidativos. Todas essas funções envolvem a oxidação do grupo tiol, levando a formação de persulfeto (GSSH). Tem se sugerido que o par redox GSH/GSSH é um indicativo do estado redox celular, provavelmente envolvidos na percepção dos níveis de EROs pela célula com a finalidade de disparar as defesas antioxidantes contra essas moléculas (Shao, *et al.*, 2007). Finalmente um mecanismo enzimático encarregado da detoxificação de H₂O₂, utiliza a catalase (CAT) que esta presentes nos peroxissomos.

Juntamente com a GSH, ascorbato é o antioxidante mais abundante e também o mais solúvel em cloroplastos. Entre suas funções estão o sequestro de elétrons direto sobre o O_2^{\bullet} , ${}^{1}\Delta_{g}O_2$ e 'OH, doação de elétrons para o fotossistema II entre outras (Asada 2006; Foyer e Noctor 2011; Noctor e Foyer 1998). A Figura 3 mostra as complexas relações entre as ERO e os antioxidantes moleculares.



Figura 3 – Relação entre a geração de EROs e os mecanismos de desintoxicação das células Adaptado de Torres *et al*, 2008.

1.2 Metabolização de compostos orgânicos em organismos fotossintetizantes.

O sistema bioquímico mais estudado relacionado a compostos tóxicos é o das enzimas envolvidas no metabolismo de substâncias químicas com potencial ação tóxica. Este processo pode ser dividido em 3 fases sendo que a primeira fase do processo de biotransformação, fica ao encargo de uma série de isoformas proteicas, coletivamente conhecidas como citocromo P450 (Cyt450) (Vermeulen, *et al.*, 1992). Estas proteínas contém um grupamento heme e têm um papel essencial na transferência de elétrons. Conhecido como *sistema monooxigenásico mediado por citocromo P450*, possui, além da hemeproteína, a enzima citocromo P450 NADPH redutase, que em conjunto, catalisam reações REDOX incorporando um dos oxigênios da molécula de O₂ ao substrato e convertendo o segundo oxigênio em água (*i.e.* atividade monooxigenásica) (Denisov, *et al.*, 2005).



Figura 4 – Ciclo catalítico do citocromo P450. O mecanismo de ação inicia-se com a ligação do xenobiótico a enzima e então ocorrem reduções por adição de oxigênio e as custas de NADPH. O resultado é um composto mais polar e geralmente menos tóxico. Adaptado de Denisov *et al.*, 2005 e Torres *et al*, 2008.

O Cyp450 é amplamente distribuído por todos os grupos de seres vivos, e seu mecanismo de ação é bastante complexo e em muitos dos diferentes sistemas que se conhecem hoje consomem agentes redutores, principalmente NADPH. Além disso, a atividade enzimática de Cyt450 após o tratamento moléculas orgânicas (herbicidas, HPAs, solventes e resíduos industriais) tem sido observada em animais, plantas, microrganismos e algas (Torres, *et al.*, 2008).

A Conjugação é o que caracteriza a fase II, onde o metabólito produzido na fase anterior é, covalentemente ligado a moléculas de GSH, através da glutationa S-transferase – (GST), resultando em um produto com elevada solubilidade e em geral com toxicidade reduzida (Wilce e Parker 1994). A enzima GST tem sido caracterizada em diferentes plantas (*e.g.* em milho, quando sob exposição a Metolaclor e CDNB (1-cloro-2,4 dinitrobenzeno)), bem como em algas, tanto de água doce como marinhas (Edwards, *et al.*, 2000; Li, *et al.*, 2007; Torres, *et al.*, 2008).

A fase III, caracteriza-se pela excreção dos compostos conjugados com certa hidrofilicidade (Sandermann 1992). Entre as várias alternativas, à disposição da célula, para excreção de compostos, a atividade da glicoproteína-P (Figura 5) chama a atenção em especial. Vale citar que a glicoproteína-P (*ATP-binding transporters*) têm sido amplamente estudado ao longo dos anos por conferir resistência a múltiplas drogas quimioterápicas em células tumorais (Bard, *et al.*, 2002). Em organismos fotossintetizantes, o caminho seguido pelos xenobióticos é um tanto quanto peculiar, sendo exportados para o interior de vacúolos celulares, para espaços extracelulares, ou então depositados em meio a lignina ou outro componente da parede celular (Sandermann 1992). Até o momento não há qualquer evidência na literatura, que ateste a existência concreta de sistemas de múltipla resistência em organismos fotossintetizantes (Torres, *et al.*, 2008).



Figura 5 - Integração das fases que compõem o sistema de desintoxicação de xenobióticos.

1.3 Efeitos de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos em microalgas

Problemas no desenvolvimento das algas causados por diversos tipos de contaminantes acarretam em falência de todo o ecossistema devido à diminuição da biomassa, diminuição na produção de oxigênio e inibição de processos de desintoxicação (Pokora e Tukaj 2010; Torres, *et al.*, 2008). Muito da toxicidade dos HPAs é resultado de sua hidrofobicidade. Os HPAs podem induzir mudanças conformacionais na estrutura de biomembranas resultando em aumento em sua permeabilidade. Como consequência, a capacidade fotossintética desses organismos é prejudicada podendo levar a sérios distúrbios na cadeia de transporte de elétrons e desacoplamento da fosforilação oxidativa (Gala e Giesy 1992; Marwood, *et al.*, 1999; McCann e Solomon 2000).

Estes compostos são detoxificados por meio de sistemas de biotransformação que atuam removendo ou adicionando grupos funcionais por meio de oxidação, redução ou hidrólise (Bernhardt 2006; Goeptar, *et al.*, 1995). O benzo[a]antraceno é transformado em dihidrodióis e quinonas no período de cinco a seis dias pela microalga marinha *Selenastrum carpricornatum*. Interessantemente, esta alga quando cultivada sob luz amarela, que simula o entardecer, produz 11,12-dihidrodiol e sob luz branca há produção de 9,10-dihidrodiol a partir de benzo[a]antraceno. Além disso, com o aumento da energia da luz, de visível para ultravioleta, a produção de quinonas aumentou e também a citotoxicidade, demonstrando que

a fonte de luz é importante e fator a ser considerado (Haritash e Kaushik 2009; Warshawsky, *et al.*, 1995).

Outras evidências dos efeitos tóxicos dos HPAs em *Selenastrum vacuolatus* foram demonstrados por Grote e seus colaboradores em experimentos onde quatorze compostos diferentes foram avaliados em três condições diferentes de iluminação. Neste trabalho, ficou evidenciado a importância da fotoxidação e do tipo de luz na toxidade dos HPAs, sendo que a influência da radiação luminosa foi mais pronunciada para os compostos benzo[b]fluoreteno, benzo[k]fluoreteno e benzo[a]antraceno (Grote, *et al.*, 2005).

Além disso, quando compostos são testados de forma combinada, parece haver um efeito antagônico, ou seja, a presença de mais de um composto no meio tem, geralmente, menor efeito do que quando os mesmos compostos são testados individualmente. Também foi demonstrado que o antraceno (ANT) tem um efeito tóxico pronunciado na toxicidade em *S. vacuolatus*. Outro dado importante é de que a enzima antioxidante Superóxido Dismutase (SOD) está em níveis mais elevados quando ANT e cádmio estão presentes de forma combinada do que quando os poluentes foram adicionados individualmente, especialmente nos cloroplastos (Zbigniew e Wojciech 2006). Vale citar que a enzima SOD, é encontrada tipicamente nas membranas do tilacóide, citosol e no espaço intercelular (CuZn-SOD), na mitocôndria (Mn-SOD) e no cloroplasto (Fe-SOD). Estas isoformas correspondem a primeira frente no sistema de anulação de radicais livres, catalisando a transformação de O_2^{\bullet} à H_2O_2 (Figura 3).

Comunidades naturais de fitoplâncton provenientes da praia de Isefjord,-Dinamarca, expostas a pireno, apresentaram um decréscimo populacional de forma dependente de concentração do poluente. Além disso, demonstrou-se que a remoção deste HPA pela comunidade planctônica desta área é mais lenta do que sugerido anteriormente, dando suporte à hipótese de que esta classe de poluentes é muito persistente no ambiente (Hjorth, *et al.*, 2007).

Em estudos recentes de análise de transcriptoma e proteômica de *Thalassiosira pseudonana* expostas a concentrações sub letais de benzo(a)pireno (BaP), disparou uma mudança em transcritos que codificam para proteínas relacionadas ao metabolismo de lipídeos, levando a um acúmulo desta classe de moléculas. Os autores acreditam que esse acúmulo possa estar ocorrendo para que BaP seja eficientemente sequestrado, dada a natureza hidrofóbica desta molécula, prevenindo a formação de adutos no DNA gerados pelo seu metabolismo. Entretanto danos induzidos por estresse em proteínas parecem ser um dos maiores alvos do esforço celular juntamente com a desintoxicação dos metabólitos de BaP e EROs, já que uma grande quantidade de proteínas relacionadas com proteólise, chaperonas, cadeia de transporte de elétrons, tioredoxinas estão super expressos, além de proteínas já notoriamente conhecidas neste tipo de estresse como, por exemplo, Ascorbato Peroxidase e GST. Outro achado interessante, é que houve uma diminuição no nível de proteínas responsáveis pelo sequestro de silício em *T. pseudonana* quando estas foram expostas a BaP, o que poderia ser uma das causas da inibição do crescimento desencadeada por BaP nesta diatomácea (Carvalho, *et al.*, 2011; Carvalho e Lettieri 2011).

1.4 Antraceno

O ANT é uma molécula formada pela fusão de 3 anéis benzênicos (Figura 6) e é um dos 16 HPAs prioritários segunda a US EPA. No relatório da "European Union Risk Acessment Report", classificou o ANT como "muito tóxico para organismos aquáticos e que pode causar efeitos adversos de longo prazo no ambiente aquático" (Aksmann, *et al.*, 2014). Sua concentração em óleo bruto foi estimada em 214 μ g g⁻¹ de óleo (Bado-Nilles, *et al.*, 2009). Antraceno também pode ser fotoxidado a produtos ainda mais tóxicos, especialmente quinonas, que interferem na respiração e na fotossíntese (Aksmann e Tukaj 2008; BascikRemisiewicz, *et al.*, 2011; Brack, *et al.*, 2003). Além disso, a grande maioria estudos de toxicidade em algas é feita com este HPA.



Figura 6 – Estrutura química do antraceno.

Os diferentes compostos gerados pela fotoxidação de ANT foram testados em *Vibrio fischeri, Salmonella typhimurium* e na alga verde *Scenedesmus vacuolatus*. Demonstrou-se que compostos diferentes gerados a partir da irradiação do antraceno causam efeitos tóxicos nos organismos testados, prevalecendo o efeito de antraceno-1,4-diona em *V. fischeri* e *S. typhimurium*, e os compostos 10-hidroxiantrona e antrona tiveram um maior efeito tóxico na alga *S. vacuolatus*. Isso demonstra que não existe apenas uma via única de toxicidade, sugerindo que o modo de ação é organismo dependente (Brack, *et al.*, 2003).

Os diferentes compostos gerados pela fotoxidação de antraceno foram testados em *Vibrio fischeri, Salmonella typhimurium* e na alga verde *Scenedesmus vacuolatus.* Demonstrou-se que compostos diferentes gerados a partir da irradiação do antraceno causam efeitos tóxicos nos organismos testados, prevalecendo o efeito de antraceno-1,4-diona em *V. fischeri* e *S. typhimurium*, e os compostos 10-hidroxiantrona e antrona tiveram um maior efeito tóxico na alga *S. vacuolatus.* Isso demonstra que não existe apenas uma via única de toxicidade, sugerindo que o modo de ação é organismo dependente (Brack, *et al.*, 2003).

Em *C. reinhardtii*, o ANT inibe a fotossíntese possivelmente por meio de uma interação inespecífica entre o composto e a membrana o que poderia levar a uma inibição da clorofila *a* e desemparelhamento entre o fotossistema I e o fotossistema II, fazendo com que a energia seja dissipada por meios alternativos reduzindo dessa forma o potencial energético da célula (Aksmann e Tukaj 2008). Durante a exposição de *C. reinhardtii* a ANT, os níveis de

expressão de Fe-SOD (*Fsd 1*) aumentaram entre 50-70%. Vale destacar que este gene é responsável por 78% de todos os transcritos de SOD nesta alga. De forma similar, os níveis dos transcritos do gene Apx I, foram elevados em 145% quando comparados ao controle e os níveis de *Cat 1* foram elevados em 200% (Aksmann, *et al.*, 2014).

Já em estudos de fotossíntese realizados com 3 espécies da alga *Desmodesmus*, mostraram-se uniformes e não foram afetados por antraceno, cádmio ou a mistura de ambos, demonstrando que o aparato fotossintético foi mantido intacto e que a atividade de SOD e processos relacionados a extinção não fotoquímica da fluorescência da clorofila, uma resposta comum de plantas à estresse, foram efetivos em proteger o cloroplasto. Os autores sugeriram que a redução na proliferação celular se devia mais a deturpações no processo de divisão celular do que problemas relacionados à fotossíntese (Pokora e Tukaj 2010).

Quando exposta a ANT e a cádmio, a produção de Hsp70, uma proteína bastante conhecida na resposta à estresse, foi estimulada, tanto no citoplasmática quanto no estroma em *Desmodesmus subspicatus*. Porém, o pré-tratamento da alga com estresse térmico aumentou a tolerância de cádmio, mas não houve aumento na tolerância quando a célula foi exposta a ANT (Tukaj e Tukaj 2010).

1.5 Chlamydomonas reinhardtii

A alga verde *Chlamydomonas reinhardtii* (Figura 7) é uma alga microscópica unicelular com um tamanho aproximado de 10 µm de diâmetro. Possui ampla distribuição geográfica, sendo encontrada tanto em água salgada como em água doce e solo. Ela carrega múltiplas mitocôndrias, dois flagelos anteriores que são utilizados tanto para motilidade quanto para conjugação e um cloroplasto que ocupa a maior parte do volume celular (Merchant, *et al.*, 2007). É a alga mais estudada, bem como é o organismo modelo de estudo para elucidar a função do flagelo eucariótico e do corpo basal. Além disso, é utilizada também para estudar fotossíntese (Harris 2001; Proschold, *et al.*, 2005).



Figura 7 – A alga verde *Chlamydomonas reinhardtii* apresenta dois flagelos anteriores um único cloroplasto e múltiplas mitocôndrias. Apresenta também o corpo pirenoide, responsável por armazenar amido, e também possuiu um olho primitivo utilizado para fototaxia.

Outro fato importante, é que esta microalga é considerada como um dos mais antigos ancestrais dos organismos fotossintetizantes, e ela possui características tanto de organismos fotossintetizantes quanto de organismos eucarióticos primitivos. Esta posição na filogenia dos eucariotos, fazem dela um modelo único em pelo menos duas maneiras: como uma representante de uma linhagem criticamente importante, divergindo muito cedo na linhagem que originou as plantas terrestres, bem como um microrganismo que reteve características importantes com o último ancestral eucariótico comum (Cross e Umen 2015). Por sua importância, foi a primeira alga a ter seu genoma completamente sequenciado. Seu genoma nuclear possui aproximadamente 111 megabases distribuídos em 17 cromossomos (Blaby, *et al.*, 2014; Merchant, *et al.*, 2007). Já o genoma mitocondrial e do cloroplasto possuem, respectivamente, aproximadamente 16 e 203 quilobases (Maul, *et al.*, 2002). Em seu estagio vegetativo, *C. reinhardtii* é um organismo haploide, possuindo alta taxa de crescimento (duplica-se a cada 8 ou 12 horas), e possui meio de cultivo bastante definido, constituído apenas de sais. Além do interesse em utilizar *C. reinhardtii* em laboratório devido a sua história evolutiva, seu metabolismo é bastante flexível, podendo ser mudado rapidamente de

totalmente auxotrófico, para mixotrófico ou, ainda, para totalmente heterotrófico, utilizando acetato como fonte de carbonos (Johnson e Alric 2013). Porém, graças a esta flexibilidade, entender como seu metabolismo funciona e se comporta, bem como as interações entre os diferentes metabólitos nas vias metabólicas não é uma tarefa simples (Johnson e Alric 2013; Singh, *et al.*, 2014). Com o aumento no interesse sobre esta alga, muitas ferramentas moleculares vem se desenvolvendo para auxiliar o melhor entendimento de seu metabolismo, bem como ampliar suas aplicações numa grande diversidade de áreas do conhecimento (Jinkerson e Jonikas 2015) incluindo desenvolvimento e fabricação de vacinas, biocombustíveis e bioremediação (He, *et al.*, 2011; Rosales-Mendoza 2013; Torzillo, *et al.*, 2014).

Existem muitas informações sobre os efeitos tóxicos de metais como, por exemplo, cádmio, ferro e cobre em *C. reinhardtii* (Jamers, *et al.*, 2006; Rubinelli, *et al.*, 2002). Entretanto, estudos envolvendo HPAs em *C. reinhardtii* são limitados (Aksmann, *et al.*, 2014; Aksmann, *et al.*, 2011; Aksmann e Tukaj 2008; Warshawsky, *et al.*, 1995). Neste sentido os esforços para entendimento dos mecanismos e estratégias de sobrevivência de *C. reinhardtii* perante os poluentes HPAs são fundamentais e de grande relevância.

1.6 Metabolômica

Metabolômica é uma das mais recentes tecnologias das chamadas "-omicas" e foi originalmente proposta como uma metodologia de genômica funcional por Oliver e colaboradores (Oliver, *et al.*, 1998). As outras três "-omicas" principais são: genômica, trascriptômica e proteômica, que focam respectivamente em DNA, RNA e proteínas. A metabolômica concentra-se nos no estudo dos produtos finais destes processos e são designados metabólitos. Metabolômica é baseada numa analise holística, não tendenciosa e indiscriminada dos metabolitos celulares (Villas-Boas, *et al.*, 2005). É uma área que vem se expandindo muito nos últimos anos e vem encontrado uma variedade de aplicações diferentes,

incluindo genômica funcional e biologia de sistemas (Fiehn 2002; Park, *et al.*, 2008; Villas-Bôas, *et al.*, 2005; Wang, *et al.*, 2006). O termo "metabolômica" tem sido altamente empregado pela comunidade científica, e não sem gerar algum tipo de confusão (Villas-Boas, *et al.*, 2005). Originalmente a introdução do termo metabolômica servia para identificar o grupo de moléculas que continham menos de 1500 Daltons sintetizados por um determinado organismo (Oliver, *et al.*, 1998). Entretanto em 2002, Oliver Fihen e seus colaboradores publicaram uma revisão sobre a análise do metabolômica e utilizaram este termo para especificar a análise compreensiva de todos os metabólitos produzidos pela célula (Fiehn 2002). Entretanto, graças a sua natureza complexa e enorme variabilidade química, a análise completa de todos os metabólitos ainda não é possível. Atualmente, metabolômica é reconhecida como uma nova área da ciência que é a ligação entre o fenótipo metabólico e seu genótipo correspondente (Villas-Boas, *et al.*, 2005).



Figura 8 – Hierarquia das tecnologias "-omicas". Abordagens da era pós-genômica como transcriptôma, proteômica e metabolômica podem fornecer informações úteis para melhorar o nosso entendimento sobre sistemas biológicos.

Uma diferença clara entre genômica, transcriptômica e proteômica, quando comparada a metabolômica, é a sua diversidade química. Tanto genômica quanto a transcriptômica, são moléculas constituídas de polímeros de tamanhos variados de apenas 4 tipos de bases diferentes, enquanto proteômica são formadas pelos 20 diferentes aminoácidos. Em contrapartida, metabolômica possui uma diversidade química imensa, consistindo de 1000 a
200000 estruturas químicas diferentes (Hall, *et al.*, 2002; Wishart, *et al.*, 2013; Wishart, *et al.*, 2009). Como os metabólitos são os produtos finais dos vários processos da célula, eles tem funções importantes na integração de diferentes vias metabólicas. Um grande número deles são frequentemente sintetizados e um mesmo metabólito pode fazer parte de várias vias distintas. Além disso, a produção de metabólitos depende do estado de desenvolvimento, fisiológico e das condições patológicas que o organismo esteja passando ou enfrentando (Villas-Bôas, *et al.*, 2005). Dessa forma, a análise dos metabólitos é de grande importância para se obter uma visão integrada do metabolismo celular, bem como suas características fenotípicas.

Em metabolômica, o perfil metabólico é a abordagem mais bem estabelecida e poderosa para a análise do metabolôma. Um perfil metabólico consiste no conjunto de metabólitos e seus derivados que podem ser detectados e quantificados por uma determinada técnica analítica em uma determinada amostra biológica (Villas-Bôas, et al., 2005). Além disso, a busca por alvos específicos ("targeted analysis") também pode ser combinada aos dados de metabolômica. Estas duas formas de análise de moléculas possuem vantagens e desvantagens. Se por um lado a busca por metabólitos específicos possui a vantagem de que o limite de detecção é bastante baixo e as análises podem ser quantitativas, apenas um número limitado de analítos podem ser detectados. Outra desvantagem é que os compostos que não estão sendo considerados na análise alvo são ignorados. Além disso, para as análises quantitativas faz-se necessário o uso de padrões purificados, o que nem sempre é possível. Já o perfil metabólico permite a identificação de uma grande quantidade de moléculas de forma não específica e permite a descoberta de novos compostos que não seriam esperados numa determinada amostra, ou que não seriam inicialmente associadas com uma determinada questão biológica. Por outro lado, este método é semi quantitativo, apresenta resultados falsopositivo ou falso-negativo além de muitas moléculas não identificadas (Shulaev 2006).

1.6.1 Desafios e limitações da metabolômica

Embora seja uma área que está se desenvolvendo bastante nos últimos anos, ainda existem uma série de limitações e desafios que precisam ser superados para que esta nova omica se desenvolva ainda mais.

1.6.1.1 Impossibilidade de se analisar o metabolôma completo

Em metabolômica, a diversidade química das moléculas é imensa, e além disso, sua quantidade nas células variam de g/L a menos de ng/L sendo necessários detectores muito poderosos este tipo de metabólito que possui baixíssimas concentrações. Outro fator importante que difere os metabólitos é a sua estabilidade e também a sua taxa de renovação dentro da célula (Villas-Boas, *et al.*, 2005), sendo que muitos deles são instáveis na presença de oxigênio, luz, ou não suportam as condições analíticas a que são submetidos. Dessa forma, graças a extensa diversidade química e natureza variável dos metabólitos, não há uma técnica capaz de identificar e quantificar um grande número de moléculas em amostras biológicas (Wishart 2011).

1.6.1.2 Identificação dos metabólitos

A identificação dos metabólitos é uma tarefa importante em metabolômica tanto para análises específicas quanto para a inespecífica, por que sem identificação, a interpretação dos dados de metabolômica se torna inviável. Ao longo da última década, vários grupos tem tentado aumentar o número de metabólitos identificados através do desenvolvimento de métodos computacionais e também a construção de bancos de dados de espectros de massas (Smith, *et al.*, 2005; Smith, *et al.*, 2006; Wishart, *et al.*, 2009). Mas mesmo assim, a chance de resultados falso positivo ou falso negativo não é evitada. Para diminuir as chances destes resultados aparecerem, pode-se construir uma biblioteca utilizando padrões confiáveis, entretanto nem todos os metabólitos naturais estão disponíveis atualmente, sendo essa, uma de suas limitações.

1.6.1.3 Quantificação dos metabólitos

Em metabolômica, muito dos dados gerados pelos diversos métodos analíticos (principalmente por espectrometria de massas) são baseados em quantificação relativa, que é obtida através da normalização da abundância do sinal de um determinado metabólito pelo sinal de um padrão interno (Lei, et al., 2011). Entretanto este método não permite comparar os níveis de um metabólito com o outro dentro de uma mesma amostra, apenas sendo possível entre diferentes amostras. Isto acontece por que cada composto químico apresenta uma resposta diferente para os diferentes detectores analíticos (com exceção de ressonância magnética nuclear). Para quantificação absoluta de um determinado composto químico, é necessário construir uma curva de calibração obtida a partir de diferentes concentrações de um padrão, sendo que isso só é possível durante a análise específica de metabólitos, além da disponibilidade de tais padrões. Além disso, a quantificação absoluta de metabólitos provenientes de amostras biológicas ainda é um desafio a ser superado pela metabolômica moderna. Para que a quantificação de um determinado metabólito ocorra de acurada, ela depende da reprodutibilidade da preparação das amostras bem como a reprodutibilidade dos instrumentos utilizados para a análise. Muitos métodos de padronização foram sugeridos para que sejam seguidos durante o experimento e também durante a análise dos dados (Fernie, et al., 2011; Sumner, et al., 2007; Villas-Bôas, et al., 2005):

I – Estabilidade da amostra biológica deve ser preservada através de armazenamento adequado juntamente com mistura de padrões internos definidos para evitar mudanças ou degradação dos metabólitos antes da análise, enquanto compostos voláteis e semi voláteis precisam ser analisados o mais breve possível (Fernie, *et al.*, 2011).

II – Pelo menos três réplicas biológicas e pelo menos três replicas técnicas são necessárias para minimizar a influência de variáveis incontroláveis (Shulaev 2006; Sumner, *et al.*, 2007; Villas-Bôas, *et al.*, 2005).

III – Rotina apropriada de manutenção e controle de qualidade dos instrumentos analíticos usando padrões conhecidos para garantir performance adequada e também boa qualidade dos dados (Shulaev 2006; Sumner, *et al.*, 2007; Villas-Bôas, *et al.*, 2005)

IV – Uso de calibrantes internos e externos também é recomendado para a normalização dos dados para minimizar variação na preparação da amostra (Sumner, *et al.*, 2007).

A "The Metabolomics Society" possui um comitê supervisor denominado "Metabolomics Standard Initiative (MSI)" com a finalidade de monitorar e revisar os procedimentos padrões do fluxo de trabalho em metabolômica (Sansone, *et al.*, 2007).

1.6.2 Métodos analíticos em metabolômica

Graças a sua natureza complexa, grande variabilidade entre os metabólitos e concentrações que variam muito nos sistemas biológicos, tornam o estudo do metabolôma um grande desafio técnico especialmente para o desenvolvimento de metodologias para detectar o maior número de moléculas num único método de análise (Kueger, *et al.*, 2012). Deste modo, é sugerido utilização de várias metodologias para complementar o estudo do perfil metabólito de um determinado sistema biológico (Hall, *et al.*, 2002; Sumner, *et al.*, 2007). Em metabolômica a Ressonância Magnética Nuclear (RMN) e a Espectrometria de Massas (MS) tem sido extensivamente utilizadas (Kueger, *et al.*, 2012; Lei, *et al.*, 2011; Shulaev 2006; Villas-Bôas, *et al.*, 2005). Outra tecnologia utilizada, especialmente na indústria alimentícia é a espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR), por conta de sua rapidez, altamente automatizável, reprodutível, não destrutiva e custo-efetiva. Entretanto FTIR não é sensível para amostras liquidas complexas e a água presente nas amostras

aumente o ruído, aumentando o limite de detecção e reduzindo a linearidade. Outro fator importante é que os dados obtidos através desta metodologia são de difícil interpretação e existem poucas bibliotecas para auxiliar na identificação dos metabólitos (Berthomieu e Hienerwadel 2009). Por outro lado, MS é frequentemente utilizado em combinação com técnicas de separação para aumentar seu poder de identificação. Cromatografia gasosa (GC), cromatografia líquida (LC) e eletroforese capilar (CE) são as formas mais comuns de separação utilizadas (Fiehn 2002; Kueger, *et al.*, 2012; Shulaev 2006; Villas-Bôas, *et al.*, 2005).

1.6.2.1 Espectrômetros de massas

Nos últimos 20 anos, MS tem passado por grande desenvolvimento e aprimoramentos e é a técnica mais difundida e utilizada para análise do perfil metabólico principalmente por conta de sua alta sensibilidade e também pela sua habilidade de identificar uma grande variedade de metabólitos em misturas complexas em apenas uma única análise (Shulaev 2006; Villas-Bôas, *et al.*, 2005; Wishart 2011).

Espectrômetros de massas se focam em identificar os compostos medindo sua massa na forma de uma razão massa/carga (m/z) de moléculas eletricamente carregadas. No MS, valores m/z são coordenados no eixo x, enquanto o eixo y representa a contagem total de íons. Estes equipamentos dão informações quanto à estrutura, pureza e composição dos metabólitos. Eles funcionam em quatro passos após introdução da amostra: ionização, aceleração, deflexão e detecção. Após os metabólitos serem ionizados, eles são acelerados para atingir a mesma energia cinética. No terceiro passo, os íons são defletidos pelo campo magnético baseado em suas massas. Estes íons são então detectados eletricamente nos detectores (Dunn 2008; El-Aneed, *et al.*, 2009). As amostras podem ser introduzidas nos equipamentos através de varias maneiras, por meio de infusão direta dos metabólitos no MS, ou utilizando algum tipo de separação cromatográfica (GC, LC ou CE), que é preferencialmente utilizado em metabolômica para maximizar a separação e identificação dos diversos compostos presentes nas amostras biológicas (Dunn 2008).

1.6.2.1.1 Fontes de ionização

A fonte de ionização converte cada metabólito em uma espécie carregada eletricamente. Há uma variedade de diferentes espécies carregadas que podem ser criadas dependendo do que é adicionado ou removido do analíto. Por exemplo, ionização por impacto de elétrons (EI) remove um único elétron para produzir um radical cátion, já ionização por elétron spray (ESI) opera adicionando um cátion (H⁺, NH₄⁺, Na⁺, K⁺, entre outros) produzindo um aduto carregado positivamente (Dunn 2011). Uma grande variedade de fontes de ionização estão disponíveis hoje em dia: ionização por eletro spray (ESI), ionização por impacto de elétrons (EI), ionização e dessorção a laser assistida por matriz (MALDI), ionização por termospray, ionização química por pressão atmosférica, entre outras. Dentre estas, EI e ESI são as formas mais comumente utilizadas em metabolômica (Dunn 2011; Villas-Bôas, et al., 2005). Ionização por impacto de elétrons é o método tradicional de ionização que utiliza um feixe de elétrons para ionizar os analítos, sendo que sua operação ocorre a vácuo e analisa apenas moléculas voláteis. Sua aplicação mais comum para sistemas biológicos ocorre quando acoplado a um GC, sendo frequentemente descrito como um mecanismo de ionização forte (Dunn 2011). Por outro lado, ESI ocorre em pressões atmosféricas e quando comparada a EI, é uma ionização bem mais branda. Com o desenvolvimento desta tecnologia, permite analisar uma grande gama de moléculas sendo hoje em dia é uma das formas de ionização mais frequentes aplicadas a estudos biológicos (El-Aneed, et al., 2009).

1.6.2.1.2 Analisadores de massas

O analisador de massas é o compartimento do instrumento de massas em que os íons são separados baseados em suas razões m/z, ocorrendo tanto por forças elétricas quanto por forças magnéticas. Eles variam em tamanho, resolução, amplitude de massas e sua habilidade de serem acoplados em tandem (MS/MS) (Dunn 2011). Os analisadores de massas mais comumente utilizados pela comunidade científica são: quadrupolo (Q), quadrupolo ion-trap (QIT), tempo de voo (ToF), orbitrap, espectrômetro de mobilidade de íons (IMS), e ressonância ciclotrônica de íons por transformada de Fourier (FT-ICR). Analisadores do tipo quadrupolo são robustos, de baixo custo e de simples utilização, mas oferecem menor resolução de massas e acurácia quando comparados a instrumentos do tipo ToF, FT-ICR e orbitrap (Dunn 2011; Villas-Bôas, *et al.*, 2005).

1.6.2.2 Separação dos metabólitos

1.6.2.2.1 Cromatografia líquida

Cromatografia líquida (LC) é um método de separação que permite analise rápida com uma pequena quantidade de amostra. A separação dos metabólitos depende do tipo de coluna utilizada e sua principal vantagem é a flexibilidade e não requer derivatização prévia para análise de compostos não-voláteis (Moco, *et al.*, 2007). Esta técnica geralmente está acoplada a um espectrômetro de massas (LC-MS) e algumas vezes a um RMN, sendo que para equipamentos de MS, um grande variedade de detectores podem ser utilizados, indo de resoluções muito altas como FT-ICR, ToF ou orbitrap ou sistemas de resoluções menores como triplo-quadrupolos e íon-trap (Alonso, *et al.*, 2015; El-Aneed, *et al.*, 2009; Moco, *et al.*, 2007). O desenvolvimento de métodos de LC-MS depende da natureza dos metabólitos a serem analisados, sendo possível utilizar essa metodologia tanto para análise específica de alguns metabólitos, quanto para traçar seu perfil metabólico (Theodoridis, *et al.*, 2012). Além disso, o acoplamento de LC com MS possui algumas desvantagens devido a incompatibilidade entre a interface líquido-vácuo, o que limita substancialmente a quantidade de fase móvel que pode ser utilizada em um sistema LC-MS. A quantificação de metabólitos via LC-MS pode ser atingida com o uso de padrões internos isotopicamente marcados. Entretanto, o número destes padrões marcados é limitado e geralmente representam um alto custo, e desta forma, são preferencialmente utilizados em análises específicas (Guo, *et al.,* 2007). Outro fator importante é a baixa reprodutibilidade dos sistemas de LC, combinados com os efeitos de matriz impostos ao MS através da injeção de amostras líquidas, fazem a análise dos dados um processo laborioso e demorado.

1.6.2.2.2 Cromatografia gasosa

Cromatografia gasosa (GC) é um dos métodos mais eficientes de separação em metabolômica e permite a separação de centenas de metabólitos em uma única análise e requer apenas um pequeno volume (1 a 2 μ L). Em GC, a fase móvel é um gás inerte, geralmente hélio ou nitrogênio e a fase estacionária em uma coluna de GC consiste de polisiloxanos com vários grupos substituintes para mudar a polaridade da fase. As colunas utilizadas variam de 10 a 60 metros e possuem espessura entre 100 e 500 μ m e elas possuem uma camada interna de uma fase estacionária que varia de 10 a 50 μ m (Dunn 2008). A separação dos compostos nestas colunas ocorre em altas temperaturas com os analítos em fase gasosa. Este modo de separação acoplado a um MS, é uma ótima combinação por que os metabólitos em uma fase gasosa inerte podem ser ionizados mais facilmente na fonte de ionização, fazendo com que a combinação GC-MS seja uma excelente combinação para separação e identificação de metabolitos, além disso, outra vantagem dos sistemas de GC-MS são a sua reprodutibilidade (Lei, *et al.*, 2011; Villas-Bôas, *et al.*, 2005). Este método de análise é geralmente utilizado para analisar compostos voláteis (ponto de ebulição < 300 °C)

44

entre outros. Estes compostos voláteis devem ser extraídos da amostra biológica com algum solvente orgânico ou podem ser coletados das amostras usando um headspace (Villas-Bôas, *et al.*, 2005). Entretanto, para análise de compostos semi-voláteis ou não voláteis, eles devem ser derivatizados. Este é o maior problema na análise por GC-MS, já que adiciona mais passos de preparação das amostras e pode diminuir a reprodutibilidade (Dunn 2011; Villas-Bôas, *et al.*, 2005). Um método de derivatização deve ser simples e rápido, com condições de reação moderadas e com baixo custo de reagentes. Dois métodos de derivatização são altamente utilizados em metabolômica: sililação e alquilação (Villas-Bôas, *et al.*, 2011).

Sililação é o método clássico e mais utilizado em metabolômica. O princípio deste método é a introdução de um grupamento silil (-Si(CH₃)₃) aos metabólitos, substituindo o hidrogênio ativo (em geral –OH, -SH, -NH₄⁺, -COOH, etc). Como resultado, estes derivados se tornam mais voláteis, menos polares e mais estáveis que os metabólitos originais. A eficiência da sililação depende dos reagentes e eles geralmente são algum derivado de trimetilsilano, sendo que açúcares, amino açúcares, e álcool açúcares são os grupos de metabólitos geralmente derivatizados efetivamente por sililação. Entretanto há algumas desvantagens de usar este método, como por exemplo, aminoácidos e ácidos orgânicos não são derivatizados por esta metodologia, pois formam moléculas sililadas instáveis. Além disso, os reagentes de sililação são sensíveis a presença de água e desta forma, condições anidras de reação são necessárias. Além disso, o processo todo leva mais de uma hora para ser concluído (Smart, *et al.*, 2010; Söderholm, *et al.*, 2010; Villas-Bôas, *et al.*, 2011). Os reagente mais comuns utilizados para sililação são N,O-bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida (BSTFA) e MSTFA estão ilustrados na Figura 9 (Villas-Bôas, *et al.*, 2011).



Figura 9 – Mecanismo geral de derivatização por trimetil silil (TMS) (Villas-Bôas, et al., 2011).

Por outro lado, alquilação funciona substituindo o hidrogênio ativo de uma molécula substituindo por um grupo alquil principalmente em aminas primárias e secundárias, amidas, sulfoamidas, tióis, fenóis, ácidos carboxílicos e álcoois. Os reagentes são principalmente derivados de cloroformato, especialmente metil cloroformato (MCF) e, assim como sililação, são muito utilizados em metabolômica (Pinu, *et al.*, 2013; Pinu, *et al.*, 2012; Smart, *et al.*, 2010; Villas-Boas, *et al.*, 2005; Villas-Bôas, *et al.*, 2011). Comparado a derivatização por TMS, MCF (Figura 10) tem a vantagem de ser feito em meio aquoso, é feito em temperatura ambiente, o custo dos reagentes é mais baixo, o tempo de reação é de 1 minuto, e a mistura de reagentes e os produtos da derivatização podem ser facilmente separados (Smart, *et al.*, 2010; Villas-Bôas, *et al.*, 2011).



Figura 10 – Reação de MCF em diferentes classes de metabólitos (Villas-Bôas, et al., 2011).

2 OBJETIVOS

Chlamydomonas reinhardtii é conhecida por sua flexibilidade metabólica podendo mudar rapidamente entre totalmente autotrófica para totalmente heterotrófica. Como ANT, o HPA mais bem estudado em algas, desemparelha a fotossíntese em *C. reinhardtii*, os efeitos no metabolismo desta alga não são conhecidos. Com a finalidade de investigar a resposta metabólica de *C. reinhardtii* a ANT, utilizaremos uma abordagem de metabolômica por GC-MS. Além disso, este trabalho tem como objetivo estabelecer esta metodologia muito útil em nosso laboratório, bem como no Instituto de Química da Universidade de São Paulo.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Linhagens e meios de cultivo

Chlamydomonas reinhardtii linhagem CC-125 type mt+ foi obtida de Chlamydomonas Resource Center, University of Minnesota. As células foram cultivadas em meio TAP (Tabela 1) sob agitação a 150 rpm à 28° C com fotoperíodo de 14:10 e com luminosidade de 60 μ mol de fóton m⁻²s⁻¹. Para crescimento e manutenção das culturas em meio solido, foi utilizado o meio TAP suplementado com 1,5% de Agar (Gorman e Levine 1965).

Solução	Estoque	Volume	Componente	Concentração em	Concentração
(SE)				SE	final no Meio
Tris base		2,42g	H ₂ NC(CH ₂ OH) ₃		2,00·10 ⁻² M
			Tris(Hidroximetil)-		
			aminometano		
Sais TAP	•	25 mL	NH4Cl	$15 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$	7,00·10 ⁻³ M
			MgSO ₄ ·7H ₂ O	$4 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$	8,30·10 ⁻⁴ M
			$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	$2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$	4,50·10 ⁻⁴ M
Solução	de	1 mL	K ₂ HPO ₄	28,8 g·100 mL ⁻¹	1,65·10 ⁻³ M
Fosfato					
			KH ² PO ₄	14,4 g·100 mL ⁻¹	$1,05 \cdot 10^{-3} \text{ M}$
Solução	de	1 mL	Na ₂ EDTA·2H ₂ O	5,00 g·100 mL ⁻¹	1,34·10 ⁻⁴ M

Tabela 1 – Composição do meio TAP (<u>*Tris-Acetate-Phosphate*</u>). pH 7.

elementos	traço				
(Solução	de				
Hutner)					
			$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	2,20 g·100 mL ⁻¹	1,36·10 ⁻⁴ M
			H ₃ BO ₃	1,14 g·100 mL ⁻¹	1,84·10 ⁻⁴ M
			$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	0,50 g·100 mL ⁻¹	4,00·10 ⁻⁵ M
			FeSO ₄ ·7H ₂ O	$0,5 \text{ g} \cdot 100 \text{ mL}^{-1}$	3,29·10⁻⁵ M
			CoCl ₂ ·6H ₂ O	0,16 g·100 mL-1	1,23·10 ⁻⁵ M
			$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	0,16 g·100 mL ⁻¹	1,00·10 ⁻⁵ M
			(NH ₄) ₆ MoO ₃	0,11 g·100 mL ⁻¹	4,44·10 ⁻⁶ M
Ácido acétio	0	1 mL	CH ₃ COOH		

As células foram crescidas em erlenmeyers de 500 mL contendo 200 mL de meio de cultura liquido TAP.

3.2 Efeito tóxico do ANT no crescimento de *C. reinhardtii* (Determinação do IC₅₀)

A partir de pré-inóculos em fase estacionárias de culturas contendo *C. reinhardtii*, inóculos foram feitos em erlenmeyers de 500 mL contendo 200 mL de meio liquido TAP, contendo concentrações crescentes de ANT. Uma solução estoque de 20 mmol/L de ANT foi feita diluindo-se em DMSO. A partir desta solução estoque, foram feitas diversas diluições seriadas para os testes toxicológicos (20, 10, 5, 2,5 e 1,25 µmol/L) e a concentração de DMSO nas culturas foi mantida até 0,2% (v/v). Foi determinada a concentração na qual se observa inibição de 50% (IC₅₀) do crescimento da alga quando comparado com controles onde não há a presença do xenobiótico. Já foi demonstrado que DMSO não causa inibição no crescimento de *C. reinhardtii* (Aksmann e Tukaj 2008). Essa concentração foi determinada por espectrofotometria (λ = 750 nm) ou contagem automatizada por contador de partículas.

3.3 Metabolômica

3.3.1 Preparação das amostras e quenching

Os experimentos de metabolômica foram conduzidos em nosso laboratório seguindo a metodologia descrita por Smart e colaboradores (Smart, *et al.*, 2010). O protocolo descrito por Smart e colaboradores (2010) é ajustado para leveduras, fungos filamentoso e bactéria e, neste sentido adaptamos todo o procedimento para a microalga *C. reinhardtii*. Nesta situação a preocupação principal é adequar o protocolo para manter o mesmo nível de robustez e confiabilidade indicado pela publicação (Smart, *et al.*, 2010). Importante citar que nesta abordagem a eficiência do *quenching* é fundamental para parada total do metabolismo celular assim como evitar vazamentos de metabolitos para o meio externo.

A partir de pré-inóculos em fase estacionária de crescimento, as células de *C. reinhardtii* foram inoculadas em frascos de 500 mL contendo 200 mL de meio líquido TAP contendo ANT bem como controles contendo apenas DMSO como controle negativo (0,2% v/v) em uma densidade ótica inicial de 0,05. Após 24 horas de crescimento e após 3 horas depois do início do período de iluminação, 40 mL das culturas em fase exponencial de crescimento foram rapidamente transferidas e homogeneizadas em 160 mL de solução contendo glicerol-salina (3:2 v/v) a uma temperatura de -20 °C. Para preparar a solução salina, adicionou-se 5,4 g de NaCl em 400 mL de água destilada e após o sal estar totalmente solubilizado, adicionou-se 600 mL de glicerol. Recomenda-se manter uma proporção de uma parte de cultura para quatro partes da solução de *quenching* e durante todo este processo as células foram mantidas a -20 °C em banho de etanol para minimizar qualquer atividade enzimática. Após o *quenching*, as células foram centrifugada durante 15 minutos a 10000 g em centrifuga refrigerada a -20 °C, seguido por outro passo de lavagem a -20 °C em 5 mL de solução de glicerol-salina (1:1 v/v) a -20 °C seguidos por novo passo de centrifugação. Outro método de *quenching* foi empregado baseando-se nas metodologias descritas por Bölling e Fiehn, 2005 e Lee e Fiehn, 2008. As amostras foram crescidas conforme descritas anteriormente e após 24 horas de crescimento, 20 mL das culturas foram transferidas para 20 mL de solução de metanol-água 70% suplementado com os sais do meio TAP para manter a osmolaridade. Esta solução ficava estocada a -80 °C e as culturas de *C. reinhardtii* foram injetadas nesta solução na proporção de 1:1 (v/v). Como descrito anteriormente, as células foram mantidas a -20 °C em banho de etanol para minimizar qualquer atividade enzimática e foram centrifugadas a 10000 g por 15 minutos em centrifuga refrigerada a -20 °C. Após esse passo, o sobrenadante foi descartado e procedeu-se a extração.

3.3.2 Extração dos metabólitos intracelulares

Quatro métodos de extração foram testados com a finalidade de determinar qual seria o mais eficiente na extração dos metabólitos de *C. reinhardtii*. Imediatamente após a lavagem das células, foi adicionado 2,5 mL de solução de metanol-água (1:1 v/v) gelado e 0.2 µmol/L de ¹³C-alanina como padrão interno. Esta suspensão foi homogeneizada em vortex por 30 segundos e então ela foi congelada a -80 °C. Após congeladas, as suspensões foram retiradas do ultra freezer e mantida em banho de gelo e então foram novamente agitados por 30 segundos e congelados novamente. Este ciclo se repetiu por 3 vezes e após o último ciclo, a suspensão foi centrifugada por 15 minutos a 12000 rpm a -20 °C. O sobrenadante foi coletado e transferido para outro tubo e então o pellet foi novamente extraído com 2,5 mL de metanol-água (1:1 v/v) e novamente centrifugados. O sobrenadante foi coletado ao sobrenadante da primeira etapa de extração e os mesmos foram concentrados a vácuo. O precipitado remanescente da extração foi congelado para quantificação posterior das proteínas solúveis totais.

A extração utilizando uma solução contendo uma mistura homogênea de clorofórmiometanol-água na proporção de 5:2:2 (v/v) e outra na proporção 6:2:4 (v/v) a -20 °C foi também testada. Após o *quenching*, 1 mL dessa solução foi adicionada ao pellet e as amostras foram transferidas para tubos de 2 mL e então esta suspensão foi triturada em moinho contendo 3 microesferas de metal de 2 mm de diâmetro, durante 30 segundos a uma frequência de 30 hertz. Este homogenato foi então centrifugado a 12000 g por 5 minutos e as frações polares foram coletadas e secas a vácuo. O pellet foi congelado a -80 °C para quantificação de proteínas (Bölling e Fiehn 2005; Lee do e Fiehn 2008).

Outro método testado foi utilizando uma solução de extração contendo clorofórmiometanol-água (2,5:1:0,5 v/v). Ao pellet resultante do processo de *quenching*, foram adicionados 800 µL e então homogeneizadas em vortex. O homogenato foi transferido para tubos de 2 mL e centrifugados a 12000 g por 5 minutos e o sobrenadante foi transferido para outro tubo de 2 mL contendo 800 µL de clorofórmio-água (1:1) para separação de fase. Essa mistura foi agitada e então centrifugada por 5 minutos a 12000 g. A fase superior, polar, foi coletada e transferida para tubos de 15 mL. O pellet foi re-extraído através do mesmo processo e as fases polares foram combinadas, então adicionou-se 5 mL de água ultra pura e as amostras foram congeladas a -80 °C e então liofilizadas (Valledor, *et al.*, 2014). O pellet foi congelado a -80 °C para quantificação proteínas.

3.3.3 Derivatização dos metabólitos por metil-cloroformato (MCF)

Após a secagem a vácuo, o pellet formado foi ressuspenso em 200 μ L de NaOH 1 mol/L e então a suspensão foi transferidas para tubos silanizados contendo 167 μ L de metanol grau GC e 34 μ L de piridina concentrados e os tubos foram mantidos em agitação vigorosa durante todo o processo descrito a seguir: adicionou-se 20 μ L de MCF concentrado e os tubos foram agitados por 20 segundos. Em seguida mais 20 μ L de MCF foram adicionados e após 20 segundos acrescentou-se 400 μ L de clorofórmio e 400 μ L de NaHCO₃ 50 mmol/L e os tubos foram agitados por mais 10 segundos. Após esse passo de derivatização, os tubos foram centrifugados por 5 minutos a 2000 rpm a temperatura ambiente e a fase superior aquosa foi removida com auxilio de uma pipeta pasteur. Uma pequena quantidade de Na₂SO₄ em forma cristalina (aproximadamente 100 mg) foi acrescentado à fase apolar (clorofórmica) que contém os metabólitos derivatizados para remoção da água residual. Com auxilio de outra pipeta pasteur, esta fase clorofórmica foi cuidadosamente transferida para vials âmbar para que não viessem cristais de Na₂SO₄, e as amostras estão prontas para injeção em GC-MS.

3.3.4 Cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas (GC-MS)

As amostras (1 µL) foram injetadas em sistema de GC-MS, o qual consiste em um cromatógrafo gasoso GC-2010 Plus (Shimadzu, Jp) acoplado a um espectrômetro de massas QP-2010 Ultra (Shimadzu, Jp). As configurações gerais do sistema estão apresentados na Tabela 2.

Coluna Capilar – GC	Inlet	Configurações gerais do	
		MS	
Tipo:ZebronZb-1701	Gás de arraste: Hélio	Retardo de solvente: 5,8	
(Phenomenex)		min	
Dimensões: 30m x 250 µm	Fluxo: 1 mL/min	Fonte de Íons: EI mode, 70	
(diâmetro interno) x 0,15 µm		eV, 230 °C	
(espessura do filme)			
Gás de arraste: Hélio	Modo de injeção: "Pulsed	Temperatura da	
	slitless" (1,8 bars por 1 min,	interface: 300 °C	
	20 ml/min "Split flow" após		
	1,01 min		
Fluxo: 1 mL/min	Temperatura: 290 °C	Temperatura do	
		Quadrupolo: 200 °C	
Operação: Pressão de 1,8			
bars por 1 min após injeção			
seguido de "Split flow" de 20			
mL/min			

Tabela 2 – Especificações gerais do sistema GC-MS para análise dos metabólitos derivatizados com MCF

EI = Electron Ionization

A temperatura do forno do GC é dada na Tabela 3. O tempo total de corrida para o método de MCF foi de 43 minutos com tempo de pós corrida de 1 minuto e temperatura ajustada em 45 °C. O tempo de equilíbrio para a coluna do GC foi de 0,5 minuto.

Estágio do Forno	°C/min	Temperatura (°C)	Duração (min)
Inicial	-	45	2
1	9	180	5
2	40	220	5
3	40	240	11,5
4	40	280	2

Tabela 3 – Configuração do forno do GC para análise das amostras derivatizadas com MCF

O detector de massas operou em modo *scan*, iniciando após 5,8 min com uma extensão de massas de 38-650 AMU e 1.47 *scans* por segundo (Smart, *et al.*, 2010).

3.3.5 Quantificação de proteínas

A quantificação de proteínas com a finalidade de normalizar os resultados obtidos pelo experimento de metabolômica foi feita seguindo-se o método descrito por Smart e colaboradores (2010). O método consiste de uma modificação do método de Bradford (Bradford 1976) em que o debris celulares proveniente da extração dos metabólitos foi ressuspenso com 1 mL de hidróxido de sódio (0,2 mol/L), e então as amostras foram submetidas a fervura por 5 minutos. Após esse passo, as amostras foram resfriadas em gelo e centrifugadas a 5000 rpm por 1 minuto a temperatura ambiente para remoção dos precipitados. Este sobrenadante foi utilizado para quantificação das proteínas solúveis utilizando-se da metodologia colorimétrica de Bradford (1976). Uma curva de calibração utilizando albumina bovina foi submetida aos mesmos tratamentos das amostras (i.e. suspensa em NaOH 0,2 mol/L, fervidas e centrifugadas) com a finalidade de corrigir possíveis interferências do NaOH no método.

3.3.6 Identificação dos metabólitos

Para identificar os metabólitos provenientes do GC-MS, foi utilizado o software AMDIS (do inglês "<u>Automated Mass-Spectral Deconvolution and Identification System</u>"), capaz de analisar os dados no formato universal ".CDF" fazendo a remoção de ruídos, análises multivariadas e anotação de picos, com base na biblioteca de metabólitos construída pelo laboratório do professor Dr. Silas Villas-Bôas - University of Auckland, Nova Zelândia – sendo que a última revisão desta biblioteca é de 25 de novembro de 2014. Após a identificação dos picos, os dados foram analisados utilizando-se do script em R Metab, e os dados gerados foram manualmente filtrados, removendo-se os picos de baixa intensidade ou pouco abundantes, normalizados pelo padrão interno (¹³C-Alanina) e pela proteína total (Aggio, *et al.*, 2011; Smart, *et al.*, 2010).

3.3.7 Análise estatística

Após identificação, anotação e normalização pelo padrão interno e pela proteína, os resultados foram submetidos a análise estatística utilizando o servidor online MetaboAnalyst (<u>www.metaboanalyst.ca</u>). Este servidor faz todas as análises estatísticas comumente utilizadas em metabolômica, incluindo diferença relativa, teste t, análise de dispersão, ANOVA, análise de componente principal, mapa de calor e correlação, dentre outras. Adicionalmente, é possível fazer análise das vias metabólicas bem como análise de topologia, baseando-se no banco de dados do KEGG (Xia, *et al.*, 2015).

4 RESULTADOS

4.1 Curva de crescimento

Inicialmente, uma curva de crescimento foi feita para que se pudesse estimar a melhor fase de crescimento da cultura para a exposição de *C. reinhardtii* a ANT. Geralmente este tipo de experimento demanda que a cultura esteja em fase exponencial. A partir de pré-inóculos, as células foram diluídas para uma densidade óptica ($\lambda = 750$ nm) de 0,05. Além disso, o número de células também foi aferido utilizando um contador de partículas automatizado com a finalidade de termos a correspondência entre a densidade óptica e o número de células (Figura 11).



Figura 11 – Curva de crescimento de *C. reinhardtii* CC-125 utilizando dois métodos: contagem automatizada (quadrado vermelho), e através de medida espectrofotométrica por densidade óptica (círculos pretos). Os experimentos foram feitos utilizando 3 réplicas biológicas.

C. reinhardii tem um excelente crescimento populacional no meio de cultura TAP e nas condições de temperatura e luz escolhidas, como pode ser visto na Figura 11. Observando-se a Figura 11, é possível notar uma boa correlação entre a densidade óptica e o número de células onde a $DO_{750nm} = 0.05$ representa 5 x 10^5 células por mL. O último ponto

medido, 196 horas, a $DO_{750nm} = 0,54$ representa 5 x 10^6 células por mL. E isto é uma tendência na curva, onde cada 0,1 de absorbância representa aproximadamente 1 x 10^6 células.

Observando o gráfico da Figura 11, é possível perceber que há um aumento acentuado no número de células durante as primeiras 24 horas de crescimento. A partir de 48 horas em diante, ainda há crescimento gradual das culturas, entretanto esse crescimento é mais discreto quando comparamos com as primeiras 24 horas. Desta maneira, o período escolhido para a realização dos experimentos de toxicidade foram definidos como sendo o período entre 0 e 24 horas, já que qualquer estímulo que cause inibição no crescimento das culturas seria mais facilmente percebido no período escolhido.

4.2 Ensaios toxicológicos

Inicialmente as culturas de *C. reinhardtii* foram expostas a concentrações crescentes de ANT, com a finalidade de se determinar qual é a concentração onde ocorre 50% de inibição da taxa de crescimento (IC₅₀), no período de 24 horas, quando comparada ao controle contendo apenas as células crescendo sem adição do poluente e um segundo controle contendo apenas DMSO 0,2% (v/v). A partir de concentrações escolhidas com base nos trabalhos prévios de Aksmann e seus colaboradores (2008), a curva de toxicidade foi estabelecida para as nossas condições laboratoriais. Estes resultados estão representados na Figura 12.



Figura 12 – Curva de IC₅₀ de antraceno. O xenobiótico foi dissolvido em DMSO e sua concentração final na cultura foi de 0,2 % (v/v). As células foram expostas durante 24 horas a concentrações crescentes de ANT (1,25; 2,5; 5; 10 e 20 μ M) As condições de cultivo foram: temperatura a 28 °C, agitação em 150 rpm, iluminação constante e de baixa intensidade (60 μ mol de fóton m⁻²s⁻¹).

A exposição da microalga a ANT em concentrações de 1,25, 2,5 e 5 μ mol/L não afeta o crescimento de *C. reinhardtii* de forma significativa ($p \le 0,05$). Entretanto, quando a alga é exposta a concentração de 10 μ mol/L de ANT há uma inibição de 57,28% (p = 0,0006) do crescimento e em concentrações acima de 20 μ mol/L há efeito algicida. A partir dos dados do gráfico da Figura 12, foi possível calcular o valor de IC₅₀ para as condições experimentais testadas e o resultado obtido foi de 9,437 ± 1,096 μ mol/L de antraceno. Para fins práticos, a concentração nominal de ANT adicionado às culturas nos experimentos seguintes foi de 9 μ mol/L.

4.3 Metabolômica

Uma vez estabelecido o valores de IC₅₀ para as nossas condições laboratoriais de cultivo e exposição de *C. reinhardtii* a ANT, foram realizados experimentos de metabolômica com o objetivo de entender como o fluxo metabólico é alterado na célula perante o impacto do poluente. As células expostas a ANT e controles, foram coletados por centrifugação a -20 °C após quenching e o sobrenadante foi removido cuidadosamente, os metabólitos foram extraídos duas vezes com o mesmo volume de metanol-água (1:1 v/v) através de 3 ciclos de congelamento e descongelamento conforme descrito em Materiais e Métodos. Após liofilização e consequente derivatização das amostras, os metabólitos foram submetidos a análise em GC-MS. Todos os metabólitos foram identificados a partir dos fragmentos característicos de cada molécula em GC-MS através de ionização de elétrons. A deconvolução, identificação e anotação destes picos foi feita através software AMDIS, que utiliza os arquivos brutos do GC-MS bem como a biblioteca dos metabólitos derivatizados com MCF. A integração dos picos foi feita utilizando o script em R, Metab3 conforme descrito por Smart e colaboradores (Aggio, *et al.*, 2011; Smart, *et al.*, 2010; Smith, *et al.*, 2006).

Nesta primeira tentativa de análise dos metabólitos, foram encontrados apenas onze metabólitos, sendo três ácidos carboxílicos (lactato, oxalato e ácido benzoico) e, o restante, eram ácidos graxos: ácido hexanóico, ácido octanóico, ácido palmítico, e ácido linoleico e seu conjugado, ácidos α - e γ -linolênico e o ácido linolelaidico. Uma provável explicação para o baixo nível de detecção de metabólitos nesta primeira tentativa de análise é a de que a extração não foi eficiente. Após cada ciclo de congelamento e de descongelamento e agitação vigorosa, as células de *C. reinhardtii* deveriam romper-se devido a formação de cristais de gelo dentro da célula, fazendo com que seu conteúdo interno extravasasse.

Dado que este é um organismo fotossintetizante, a coloração verde da extração é um bom indicativo da eficiência da extração e com a finalidade de romper as células de *C. reinhardtii* e melhorar a extração dos metabólitos contidos nas amostras, aos frascos contendo as amostras e tampão de extração (metanol 50%) foram adicionados 4 esferas de metal com 4 mm de diâmetro. Os mesmos foram congelados a – 80 °C e então permaneceram em banho de gelo por aproximadamente 1 minuto e então as amostras foram agitadas vigorosamente em vortex. Com o atrito extra das esferas, tanto umas contra as outras quanto delas contra a parede do tubo, fariam com que as células se rompessem com maior eficiência. A eficiência do processo pode ser avaliada pela coloração verde do sobrenadante. Verificou-se que o sobrenadante apresentou uma coloração verde mais escura que aquela obtida pela extração baseada em ciclos de congelamento e descongelamento. Após recuperação e secagem do sobrenadante, procedeu-se a derivatização e análise em GC-MS. O cromatograma apresentado na Figura 13B mostra maior número de picos obtidos quando comparado ao método de congelamento e descongelamento (Figura 13A).



Figura 13 – Cromatogramas obtidos após extração baseada em ciclos de congelamento e descongelamento (A), e com auxilio de esferas de metal (B). As figuras foram geradas através do script Metab3 (Aggio, *et al.*, 2011). Os picos mais abundantes identificados estão numerados. 1 – Ácido Hexanóico; 2 – Glicerol; 3 – Ácido Glicerico; 4 – Ácido Mirístico; 5 – não identificado; 6 – Ácido Palmítico; 7 – Ácido α -Linoleico e/ou γ -Linoleico.

Com o auxílio das esferas de metal, foi possível identificar 61 metabólitos, entretanto após a cura manual dos dados e eliminação dos metabólitos com baixa intensidade de detecção pelo GC-MS, ou sinal muito próximo ao ruído, 44 moléculas foram consideradas corretamente anotadas, dos quais muitos isômeros foram encontrados, especialmente na classe dos ácidos graxos, como, por exemplo, ácido linoleico e seu conjugado.

Grupo de metabólitos	Nome dos metabólitos			
Aminoácidos e seus derivados	Ácido aspártico, fenilalanina, glicina, isoleucina,			
	leucina, prolina, putrescina, serina, tirosina,			
	treonina e valina			
Ácidos carboxílicos e seus derivados	Ácido benzoico, ácido carbâmico, ácido glicérico,			
	ácido malônico, ácido oxálico, glioxilato, lactato,			
	nicotinamida e succinato			
Ácidos graxos e seus derivados	Ácido Adrenico, Ácido Hexanóico, Ácido			
	Octanóico, Ácido Dodecanóico, Ácido			
	Tetradecanóico, Ácido Palmítico, Ácido			
	Palmitoelico, Ácido Palmitoleico/Palmitelaidico,			
	Ácido Linoleico, Ácido Oléico/cis-			
	Vaccenico/trans-vaccenico, Ácido Esteárico,			
	Ácido α-Linolênico/γ-			
	Linolênico/Araquidônico/Linolelaidico, Ácido			
	Gondônico, Áci			
	Octanodienóico/Eicosadienóico/Linoleico			
	conjugado, Ácido Eicosatrienóico			
Outros	Ácido Dehidroascórbico			

Tabela 4 – Lista dos metabólitos detectados com extração metanol:água (1:1) com auxílio de esferas de metal.

Apesar da maior eficiência de detecção, saltando de 11 para 44 metabólitos, observando a Tabela 4, nota-se uma prevalência de ácidos graxos na análise por GC-MS representando 51,16% do total de metabólitos identificados. Além disso, boa parte destes ácidos graxos anotados são isômeros, já que possuem a mesma massa e também possuem o mesmo tempo de retenção na coluna ZB-1701, o que não permite estabelecer seus níveis

individuais de forma precisa. Os 11 amino ácidos encontrados representaram 25,58% dos metabólitos e os 9 ácidos carboxílicos correspondem a 20% do total. Como não há como distinguirmos os isômeros na análise, se os combinarmos, o número de moléculas ditas únicas, cai para 36, entretanto ainda há uma prevalência de ácidos graxos. Com base nos cromatogramas da Figura 13B, fica evidente que os picos de maior intensidade são provenientes de ácidos graxos, o que já era esperado já que *C. reinhardtii* é notoriamente conhecidas por seu alto conteúdo de ácidos graxos - especialmente ácido oleico, linoleico, linolênico, e esteárico – sendo maiores até que em folhas de *Arabdopsis thaliana* (Lee do e Fiehn 2008).

Dado ao baixo número de metabólitos, como ácidos carboxílicos, comparado com aminoácidos e, principalmente, com os ácidos graxos, uma possibilidade era de que a quantidade de células fosse insuficiente para que fossem detectados. Entretanto ao dobrar a quantidade de células durante o *quenching*, extrairmos com metanol:água e derivatizar com MCF, o sinal do ácido hexanóico se tornou alto demais, o que levou a concomitante saturação do detector e, por consequência, o mesmo é desligado. Isso faz com que não haja detecção de nenhum metabólito posterior a passagem desta molécula. Observando a Figura 13B, nota-se que este ácido graxo sai bem no início da corrida, em 5,8 minutos, fazendo com que nenhum metabólito seja detectado após esse período, o que inviabiliza todo o processo.

Outra possibilidade que foi considerada é a de que devido a quantidade excessiva de ácidos graxos, a presença de pigmentos fotossintéticos evidenciados pela coloração verde no sobrenadante, e o glicerol residual proveniente do processo de *quenching*, estariam sendo preferencialmente derivatizados pelo MCF do que outras moléculas, o que estaria mascarando a análise. Com isso em mente, foi decidido modificar a forma de *quenching* e também a como seria feita a extração dos metabólitos intracelulares de *C. reinhardtii*. Tanto o *quenching*, quanto a extração foram baseadas nos trabalhos de Bölling e Fiehn (2005) e Lee e Fiehn

(2008), onde substituímos a solução de glicerol:salina por uma solução de metanol 70% contendo os sais do meio de cultura utilizado para o crescimento da alga. Também baseandose nestes dois trabalhos, duas formas de extração foram testadas, utilizando uma solução de metanol:clorofórmio:água com proporções diferentes destes solventes, sendo a primeira 10:3:1 (v/v) e outra com as proporções 5:2:2 (v/v).

Após a extração, as amostras derivatizadas foram submetidas a análise em GC-MS. Após processamento dos dados, nota-se uma perceptível diminuição na intensidade dos picos referentes a ácidos graxos, como evidenciado na Figura 14.



Averaged Ion Chromatogram: 38-650 m/z

Figura 14 – Média dos cromatogramas das extrações com metanol:clorofórmio:água. Os picos numerados correspondem a ¹³C-alanina (1), prolina (2) e ácido palmítico (3).

Foram identificados 28 metabólitos na extração com metanol:clorofórmio:água (5:2:2 v/v) e 26 com o tampão de extração nas proporções 10:3:1. Houve um aumento na quantidade de aminoácidos e seus derivados identificados nestes métodos de extração quando comparado com a extração de metanol:água (1:1 v/v). Foram identificados 14 aminoácidos ou seus derivados na primeira extração, quando comparado aos 11 da extração contendo somente metanol:água (Tabela 5).

		Proporção de Metanol:Clorofórmio:Ág		
Metabólito		5:2:2 (v/v)	10:3:1 (v/v)	
Ácido aspártico		Х	Х	
Ácido Glutâmico		Х	Х	
Ácido Piroglutâmi	со	Х	Х	
Asparagina		Х	Х	
Cisteína		Х	-	
Fenilalanina		Х	Х	
Glicina		Х	Х	
Glutationa		Х	Х	
Isoleucina		Х	Х	
Leucina		Х	Х	
Prolina		Х	Х	
Putrescina		Х	Х	
Treonina		Х	-	
Valina		Х	Х	
Ácido Esteárico		Х	Х	
Ácido	Linoleico/Linoleico	Х	Х	
Conjugado/10,12-0	Octadecadienoico			
Ácido Mirístico		Х	Х	
Ácido Oléico		Х	Х	
Ácido Palmítico		Х	Х	
Ácido Palmitoleico	o/Palmitelaidico	Х	Х	
Ácido	α-Linolênico/γ-	Х	Х	
Linolênico/Linolel	aidico			

Tabela 5 – Metabólitos identificados nas extrações utilizando o tampão de extração contendo
Metanol:Clorofórmio:Água.

Mesmo utilizando a extração que permite a separação entre fase polar e apolar, a presença de ácidos graxos na análise pode ser atribuída a natureza anfipática do metanol, bem como dos ácidos graxos. Outra possibilidade para explicar a presença destes ácidos graxos é que uma pequena parte do clorofórmio ainda poderia se encontra na fase aquosa. Outra possibilidade é a de que ao coletarmos a fase aquosa no intuito de recolhe-la o máximo possível, é bem provável que pequenas quantidades da fase orgânica tenham sido coletadas. É importante notar que apesar de diminuir a quantidade de ácidos graxos na amostra após análise em GC-MS, ambos os métodos diminuíram a quantidade de outros metabólitos identificados. Além dos ácidos graxos, somente aminoácidos foram identificados. Além disso, embora os autores tenham testado inúmeras condições de extração e chegaram a conclusão que este era o método mais otimizado, a separação das fases não foi algo consistente. Muitas vezes não ocorria separação das fases, mesmo após centrifugação, fazendo com que muitas amostras fossem perdidas, o que tornam os métodos de extração pouco confiáveis.

Apesar da inconsistência dos resultados obtidos com as duas extrações testadas anteriormente, a diminuição dos ácidos graxos e melhor eficiência na detecção de aminoácidos não é algo a ser ignorado, e desta forma, outro tampão de extração foi testado. Este método descrito por Valledor e colaboradores (2014), utiliza metanol:clorofórmio:água na proporção de 2,5:1:0,5 (v/v) num volume pequeno (800 µL) e a separação das fases é feita em outro tubo de 2 mL, contendo 400 µL de água e 400 µL de clorofórmio. As amostras de C. reinhardtii foram extraídas duas vezes e as fases polares foram combinadas e liofilizadas conforme descrito em Materiais e Métodos. Após apenas um ciclo de extração, notou-se que o pellet de células já apresentou uma coloração mais esbranquiçada do que quando comparada com os três métodos testados anteriormente e a fração do sobrenadante com um verde muito intenso, indicando a eficiência desse método. Depois da segunda extração, o sobrenadante ficou com uma coloração verde bastante claro, o que indica que a primeira extração certamente conseguiu extrair a maior parte dos metabólitos. Além disso, mais do que duas extrações do pellet não seriam necessárias, já que a eficiência não aumentaria muito. Ao fim da secagem em liofilizador, as amostras foram derivatizadas e submetidas a análise em GC-MS. Após processamento e limpeza dos dados, foram identificados 45 metabólitos, compilados na Tabela 6.

Grupo de metabólitos	Nome dos metabólitos
Aminoácidos e seus derivados	Ácido α-aminobutirico, ácido aspártico, ácido
	glutâmico, asparagina, cisteína, creatinina,
	fenilalanina, glicina, glutationa, isoleucina,
	leucina, lisina, ornitina, prolina, putrescina, serina,
	tirosina, treonina e valina
Ácidos carboxílicos e seus derivados	Ácido benzoico, ácido glutárico, fumarato,
	glioxilato, lactato, malato, nicotinamida, ornitina e
	succinato
Ácidos graxos e seus derivados	Ácido octanóico, ácido decanóico, ácido esteárico,
	ácido dodecanóico, ácido tetradecanóico, ácido
	palmítico, ácido palmitoleico/palmitelaidico, ácido
	oléico/cis-vaccenico/trans-vaccenico, ácido α-
	linolênico/γ-linolênico/linolelaidico, ácido
	araquídico

Tabela 6 - Metabólitos identificados utilizando a extração com metanol:clorofórmio:água (2,5:1:0,5 v/v)

Foram obtidos 19 moléculas pertencentes a classe dos aminoácidos e seus derivados como, por exemplo, glutationa e putrescina, 9 ácidos carboxílicos, sendo que 4 deles participam do ciclo de Krebs/Glioxilato e o restante são de ácidos graxos (14). Com este método de extração foi possível diminuir a quantidade de ácidos graxos presentes na análise em GC-MS, melhorou a detecção de aminoácidos e seus derivados e obtivemos melhora também na detecção de ácidos carboxílicos.

Dessa forma, o *quenching* com metanol 70% contendo os sais do meio de cultura TAP gelado a -80 °C na proporção de 1:1 e a extração com 800 µL de tampão

metanol:clorofórmio:água (2,5:1:0,5 v/v) formaram a melhor combinação e foram utilizados para os experimentos posteriores. Para investigar o perfil metabólico de *C. reinhardtii* exposta a ANT, 4 réplicas foram coletadas de cada amostra biológica e submetidas a *quenching* e imediatamente após o *quenching* as amostras foram extraídas, conforme protocolo descrito em Materiais e Métodos. Após secagem das amostras em liofilizador, as amostras foram derivatizadas e submetidas a análise em GC-MS. Os dados brutos provenientes do GC-MS foram deconvoluidos utilizando o software AMDIS e os metabólitos foram anotados utilizando a biblioteca de MCF através do script Metab. Este script que gera uma tabela contendo o nome do metabólito bem como a intensidade de cada pico. Inicialmente, 76 metabólitos foram anotados e após remoção dos compostos com baixa abundância ou não foram identificados em pelo menos 3 de cada uma das 4 réplicas de cada amostra biológica, os 34 metabólitos (Tabela 7) restantes foram normalizados pelo padrão interno (¹³C-alanina) bem como foram normalizados pela quantidade de proteínas solúveis totais, conforme descrito em Materiais e Métodos.

Grupo de Metabolitos	Metabolitos			
Aminoácidos e derivados	Ácido aspártico, ácido glutâmico, glicina, glutationa,			
	isoleucina, leucina, prolina, putrescina, serina,			
	treonina, valina			
Ácidos carboxílicos e derivados	Ácido 2-Oxovalerico, ácido 3-hidroxioctanoico, ácido			
	3-metil-2-oxovalerico, ácido 3-metil-2-oxopentanóico,			
	ácido 4-aminobutirico, ácido benzoico, acido			
	carbâmico, citrato, fumarato, glioxilato, ácido lático,			
	malato, malonato, nicotinamida, succinato			
Ácidos graxos e derivados	Ácido decanóico, ácido dodecanóico, ácido γ-			
	linolênico, ácido hexanóico, ácido miristico, ácido			
	octanóico, ácido palmítico, ácido esteárico			

Tabela 7 – Metabólitos intracelulares identificados nos experimentos de perfil metabólico de *C. reinhardtii* exposta a ANT

Os ácidos carboxílicos e seus derivados foram a classe com o maior número de moléculas identificadas nas análises (15), seguidos pelos aminoácidos e derivados (11) e por fim 8 ácidos graxos foram identificados.

4.3.1 Análise estatística

Os dados normalizados pelo padrão interno e pela proteína foram submetidos a análise estatística utilizando a ferramenta on-line MetaboAnalyst, que faz as análises estatísticas mais comuns utilizadas em metabolômica, como estatísticas univariadas (análise diferencial, teste T, análise de dispersão, ANOVA), e multivariadas (análise de componente principal, etc). Os valores foram transformados em escala logarítmica e os dados foram normalizados com base nos controles. Dos 34 metabólitos, apenas 3 não apresentaram variação significante em relação ao controle: citrato, ácido octanóico e valina (Figura 15).



Figura 15 – Gráfico de dispersão dos metabólitos identificados por GC-MS. No eixo x estão plotados os valores da variação em relação ao controle e no eixo y os valores do teste T. Os circulos rosa indicam que os valores estão acima do limiar de variação ($x \ge 2$) e passam no teste T ($p \le 0,05$). Quanto mais longe da coordenada (0, 0) mais significativo. Ambos os valores foram transformados em escala logaritmica. FC do inglês *fold change*.

Este tipo de gráfico permite caracterizar tanto a magnitude da mudança em relação ao controle bem como se a alteração é estatisticamente significativa. Interessante notar que os níveis relativos de aminoácidos, ácidos carboxílicos e ácidos graxos estão aumentados nas culturas de *C. reinhardtii* que foram crescidas na presença de ANT. Observando a Figura 15, é possível notar que os aminoácidos que sofreram maior variação foram glicina, leucina e isoleucina. Entre os ácidos graxos, o ácido palmítico, ácido mirístico e ácido esteárico sofreram as maiores variações em presença de ANT e para os ácidos orgânicos, nicotinamida, ácido 3-metil-2-oxovalérico e glioxilato foram os mais afetados. Os demais metabólitos e suas respectivas variações bem como significância estatística estão apresentados na Tabela 8. **Tabela 8** – Variação dos metabólitos de *C. reinhardtii* expostos a ANT em relação ao controle. Os dados estão

Metabólito	Variação	log ₂ (Variação)	Valor <i>p</i>	$-\log_{10}(p)$

organizados da maior para a menor significância segundo o teste T.
Ácido Palmítico	2.9283	1.55	1.77E-10	9.7519
Ácido Mirístico	2.7483	1.4586	1.08E-09	8.9678
Ácido 3-Metil-2-oxovalérico	2.4424	1.2883	9.49E-09	8.0229
Ácido Esteárico	2.5549	1.3533	1.82E-08	7.7411
Nicotinamida	2.4102	1.2692	2.32E-08	7.634
Ácido Dodecanóico	2.5469	1.3487	3.36E-08	7.4736
Ácido Linolênico	2.5661	1.3596	4.38E-08	7.3583
Isoleucina	3.1169	1.6401	1.06E-07	6.9758
Ácido 2-Oxovalerico	2.441	1.2875	1.24E-07	6.907
Glioxilato	2.4888	1.3155	1.62E-07	6.7915
Ácido 3-Metil-2-oxopentanoico	2.3312	1.2211	1.84E-07	6.7342
Leucina	3.0782	1.6221	2.40E-07	6.6196
Ácido 4-Aminobutirico	2.521	1.334	2.60E-07	6.5844
Succinato	2.1995	1.1372	3.05E-07	6.5162
Ácido Benzoico	2.4034	1.2651	3.16E-07	6.5005
Treonina	2.2717	1.1838	3.31E-07	6.4796
Ácido Decanóico	2.5343	1.3416	6.68E-07	6.1752
Prolína	2.4732	1.3064	8.83E-06	5.0542
Aspartato	2.2164	1.1482	1.17E-05	4.9326
Lactato	2.6461	1.4039	1.30E-05	4.8849
Glicina	3.0181	1.5936	1.77E-05	4.7532
Ácido Hexanóico	2.0592	1.0421	4.11E-05	4.3859
Serina	2.7317	1.4498	0.00025	3.6015
Glutamato	2.5648	1.3588	0.000352	3.453
Ácido 3-hidroxioctanoico	2.4565	1.2966	0.000953	3.0207

Malato	2.4565	1.2966	0.000953	3.0207
Putrescina	2.6836	1.4242	0.00151	2.8211
Glutationa	2.0091	1.0066	0.002196	2.6585
Fumarato	2.2326	1.1587	0.004009	2.397
Malonato	2.6545	1.4084	0.009736	2.0116
Carbamato	2.1286	1.0899	0.017512	1.7567

Análise hierárquica apresentada na Figura 16 mostrou que há boa separação entre as amostras controle e células tratadas com o xenobiótico. Além disso, analisando os metabólitos da amostra, nota-se também que os ácidos graxos formam um agrupamento enquanto aminoácidos e ácidos carboxílicos formam o outro grande agrupamento.



Figura 16 – Mudança dos metabólitos identificados em *C. reinhardtii* após 24 horas de exposição a ANT. A coluna a direita mostra o código referentes ao acúmulo dos metabólitos identificados. Azul mostra os valores relativos dos metabólitos que se encontram abaixo da média global, em vermelho, os metabólitos acima desta média.

Para identificarmos quais vias metabólicas são mais impactadas quando *C. reinhardtii* é exposta a ANT, os dados foram submetidos a análise de topologia utilizando o módulo de análise de vias metabólicas do servidor online MetaboAnalyst. Este módulo leva em conta a quantidade de metabólitos encontrados em determinadas vias metabólicas bem como a posição em que eles se encontram. Posições mais importantes disparam respostas mais severas nas vias metabólicas do que mudanças em posições ditas marginais ou isoladas. Outro fator importante é que uma mesma molécula pode ser um intermediário de mais de uma via metabólica; deste modo, 27 vias metabólicas foram identificadas nesta análise (Tabela 9). O perfil metabólico das células expostas a ANT foram comparadas com os controles, isto inclui uma série de vias metabólicas que vão desde o metabolismo de aminoácidos, metabolismo central de carbono, lipídeos, metabolismo de enxofre entre outros.

Tabela 9 – Análise de vias metabólicas. O ajuste de Holm-Bonferroni é um método utilizado para corrigir um problema entre múltiplas comparações assim como o FDR (do inglês "*False Discovery Rate*"). Além de metabolômica, ambos são muito utilizados em transcriptômica e proteômica para avaliar significância dos resultados obtidos. Assim como o teste t, quanto menor seus valores, mais confiáveis.

	Total				Ajuste de		Impac
	da via	N°	valor p	-log(p)	Holm	FDR	to
Elongação de ácidos							
graxos na mitocôndria	13	1	$1.77E^{-10}$	22.454	4.78E-09	2.39E ⁻⁰⁹	0
Metabolismo de ácidos							
graxos	34	1	$1.77E^{-10}$	22.454	4.78E-09	2.39E ⁻⁰⁹	0
Biossíntese de ácidos							
graxos	49	4	1.56E ⁻⁰⁹	20.277	3.91E-08	$1.41E^{-08}$	0
Biossíntese de ácidos							
graxos insaturados	42	3	3.72E ⁻⁰⁹	19.411	8.92E-08	2.51E ⁻⁰⁸	0
Metabolismo de ácido							
Linolênico	23	1	4.38E ⁻⁰⁸	16.943	1.01E-06	$2.37E^{-07}$	0.16
Biossítese de valine,							
leucina e isoleucina	26	3	6.38E ⁻⁰⁸	16.568	1.40E-06	$2.82E^{-07}$	0.018
Degradação de valina,							
leucina e isoleucina	34	2	8.37E ⁻⁰⁸	16.296	1.76E-06	$2.82E^{-07}$	0
Biossíntese de							
Glucosinolato	54	2	8.37E ⁻⁰⁸	16.296	1.76E-06	$2.82E^{-07}$	0
Metabolísmo de glicina,							
serina e treonina	30	4	$1.15E^{-07}$	15.979	2.18E-06	$3.19E^{-07}$	0.534

Metabolismo de							
Butanoato	18	2	$1.27E^{-07}$	15.878	2.29E-06	3.19E ⁻⁰⁷	0
Metabolismo de							
Glioxilato e dicarboxilato	17	3	$1.30E^{-07}$	15.855	2.29E-06	3.19E ⁻⁰⁷	0.336
Biossíntese Aminoacil-							
tRNA	67	6	$2.74E^{-07}$	15.111	4.38E-06	6.16E ⁻⁰⁷	0.093
Metabolismo de							
Propanoato	15	1	$3.05E^{-07}$	15.004	4.57E-06	6.33E ⁻⁰⁷	0
Metabolismo de alanina,							
aspartato e glutamato	22	3	$1.25E^{-06}$	13.596	1.74E-05	$2.40E^{-06}$	0.005
Metabolismo de arginina							
e prolina	38	4	$1.71E^{-06}$	13.279	2.22E-05	3.08E ⁻⁰⁶	0.086
Metabolismo de tirosina	18	2	$1.13E^{-05}$	11.39	0.000136	$1.72E^{-05}$	0
Metabolismo de metano	11	2	$1.15E^{-05}$	11.375	0.000136	$1.72E^{-05}$	0.166
Metabolismo de ácido							
cianoamido	11	2	$1.15E^{-05}$	11.375	0.000136	$1.72E^{-05}$	0
Glicólise ou							
Gliconeogênese	25	1	$1.30E^{-05}$	11.248	0.000136	1.76E ⁻⁰⁵	0
Metabolismo de piruvato	21	1	$1.30E^{-05}$	11.248	0.000136	$1.76E^{-05}$	0
Metabolismo de							
nitrogênio	15	1	$1.77E^{-05}$	10.945	0.000136	$2.27E^{-05}$	0
Metabolismo de							
Glutationa	26	3	$2.99E^{-05}$	10.416	0.00018	$3.68E^{-05}$	0.427
Ciclo do Citrato (TCA)	20	3	$3.25E^{-05}$	10.335	0.00018	$3.81E^{-05}$	0.175
Metabolismo de cisteina							
e metionina	34	1	0.00025	8.2928	0.001001	0.00026	0
Metabolismo de							
esfingolipídeo	13	1	0.00025	8.2928	0.001001	0.00026	0
Metabolismo de enxofre	12	1	0.00025	8.2928	0.001001	0.00026	0
Biossíntese de							
pantotenato e CoA	14	1	0.06453	2.7406	0.06453	0.06453	0

Para melhor visualizar os dados da tabela anterior e facilitar a visualização das vias mais impactadas, um gráfico de foi gerado, plotando-se o fator de impacto pela significância (Figura 17).



Figura 17 – Vias metabólicas mais impactadas em *C. reinhardtii* na presença de ANT. As vias metabólicas que foram mais afetas durante a exposição a ANT se encontram no canto superior direito: (1) metabolismo de glicina, serina e treonina; (2) metabolismo do glioxilato e (3) metabolismo de glutationa.

Como evidenciado, as vias metabólicas mais afetadas durante a análise foram as vias que correspondem ao metabolismo dos aminoácidos glicina, serina e treonina, o metabolismo de glutationa, e também o metabolismo do glioxilato.

5 Discussão

Com o propósito de investigarmos os possíveis efeitos causados ao metabolismo de *C. reinhardtii* quando exposta ao hidrocarboneto policíclico aromático ANT, utilizamos uma abordagem até o momento inédita para o estudo de HPAs em algas. Também vale notar que o número de estudos de perfil metabólico de *C. reinhardtii* é pequeno e bastante limitado a análises de mudança metabólicas causadas por carência nutricional, autotrofia, iluminação, anóxia, deficiência de CO₂ e carência de nitrogênio (Bölling e Fiehn 2005; Davis, *et al.*, 2013; Puzanskiy, *et al.*, 2015; Renberg, *et al.*, 2010; Subramanian, *et al.*, 2014).

Para tanto foi necessário adequar a exposição de *C. reinhardtii* a ANT em nossas condições de cultivo. Dados da literatura para as linhagens de *C. reinhardtii* cw92 e cc-125 expostas a ANT resultaram em valores de IC_{50} de, respectivamente, 1,6 e 5 µmol/L (Aksmann, *et al.*, 2014; Aksmann, *et al.*, 2011; Aksmann e Tukaj 2008). O valor de IC_{50} obtido neste trabalho está próximo aos valores obtidos em outros trabalhos com *C. reinhardtii*, assim como estes valores também estão próximos dos obtidos para outras microalgas verdes submetidas a presença de ANT (Tabela 10).

Organismo	Toxicidade	Condições/Fonte
Chlamydomonas reinhardtii CC-125	$EC_{50/24h} = 9,437 \ \mu mol/L$	Luz visível; IC ₅₀ calculado a partir de densidade
		populacional. Este trabalho
Chlamydomonas reinhardtii cw92	$EC_{50/24h} = 1,6 \ \mu mol/L$	Luz visível; IC ₅₀ calculado a partir de densidade
		populacional. (Aksmann e Tukaj 2008)
Chlamydomonas reinhardtii CC-125	$EC_{50/24h} = 5 \ \mu mol/L$	Luz visível; IC_{50} calculado a partir de densidade
		populacional. (Aksmann, et al., 2011)
Scenedesmus armatus	$EC_{50/24h} = 1,4 \ \mu mol/L$	Luz visível; IC_{50} calculado a partir de densidade
		populacional. (Aksmann e Tukaj 2004)
Scenedesmus vacuolatus	$EC_{50/24h} = 2,8 \ \mu mol/L$	Luz visível; IC_{50} calculado a partir de densidade
		populacional. (Grote, et al., 2005)
Scenedesmus subspicatus	$EC_{50/7d} = 58,4 \ \mu mol/L$	Luz visível; IC50 calculado a partir da área
		abaixo da curva de crescimento. (Djomo, et al.,
		2004)
Scenedesmus capricornatum	EC _{50/22h} = 2,09 nmol/L	Luz visível + UV; IC ₅₀ calculado a partir da
		taxa de crescimento. (Gala e Giesy 1992)

Tabela 10 - Dados de toxicidade de antraceno obtidos em diferentes espécies e linhagens de microalgas verdes e expressos pelo seu parâmetro toxicológico IC₅₀

A microalga C. reinhardtii possuiu um metabolismo e uma capacidade de adaptação bastante grande, podendo alterar seu metabolismo de completamente fotoautotrófico, para completamente heterotrófico, que utiliza acetato como fonte primária de carbonos em detrimento ao CO₂, e também é capaz de funcionar de forma mixotrófica, ou seja, utilizando tanto a fotossíntese para incorporação de carbonos quanto a utilização de acetato para complementar o aporte de carbono. O acetato é captado pela célula e convertido em acetil-CoA, que pode ter diversos destinos dentro da célula como síntese de ácidos graxos, síntese de ácidos carboxílicos e açúcares (Ho, et al., 2015; Johnson e Alric 2013). Além disso, como resposta fisiológica a diferentes estresses, microalgas tendem a variar sua composição bioquímica (Chia, et al., 2015). Uma das respostas comuns quando esses organismos estão enfrentando algum tipo de estresse é a acumulação de ácidos graxos, sendo que este tipo de resposta já foi descrita para diferentes condições ambientais como presença de cádmio, carência nutricional como falta de enxofre e também carência de nitrogênio e células com deficiência na produção de amido (Chia, et al., 2015; Ho, et al., 2015; Johnson e Alric 2013; Matthew, et al., 2009). Entretanto, quando C. reinhardtii é exposta a altas intensidades luminosas este quadro é invertido, causando diminuição na quantidade ácidos graxos presentes na célula (Davis, et al., 2013; Ho, et al., 2015). Desta forma, não foi uma surpresa que altos níveis de ácidos graxos tenham sido detectados após C. reinhardtii ter sido exposta a ANT. O armazenamento de ácidos graxos e a resposta estresse é uma resposta complexa e multifatorial, e ela depende de acetato e da regulação luminosa. Existem muitos genes da família diglicerídeo acetiltransferases (DAGAT/DGTT) e eles apresentam níveis elevados de expressão em carência de nitrogênio, especialmente DGAT1 e DGTT1 e DGTT4. Curiosamente, em estudos visando acumulo de lipídeos em algas, sementes e plantas, a super expressão esses genes não levou ao acumulo de ácidos graxos, mostrando que ainda estamos

apenas começando a entender esse mecanismo de regulação em algas, plantas e sementes (Johnson e Alric 2013). De forma similar ao que ocorre com os ácidos graxos, outra mudança na bioquímica nas microalgas sob condições de estresse é a tendência de acúmulo de aminoácidos. Este acúmulo já foi demonstrado para uma grande diversidade de condições adversas somo carência de nitrogênio, enxofre, limitação de CO₂, anóxia, iluminação excessiva e exposição a cádmio (Bölling e Fiehn 2005; Chia, et al., 2015; Davis, et al., 2013; Matthew, et al., 2009; Renberg, et al., 2010; Subramanian, et al., 2014). Com exceção do aminoácido valina, todos os aminoácidos encontrados em nossa análise por GC-MS mostraram um acúmulo relativo nas culturas de C. reinhardtii quando cultivadas em presença de ANT. Esta mudança no metabolismo de aminoácidos poderiam ser o resultado do catabolismo de proteínas devido a danos causados ao aparelho fotossintético, ou danos causados por EROs gerados na presença de ANT como demonstrado por Aksmann e seus colaboradores (2014). Além disso, este aumento relativo de aminoácidos deve refletir um mecanismo de tamponamento do metabolismo central de carbonos bem como o metabolismo de nitrogênio e enxofre, em particular a prolína devido a suas supostas propriedades de remoção de radicais livres intracelulares e é conhecido por acumular-se em algas e plantas quando estes organismos são submetidos a estresse (Szabados e Savoure 2010).

Outra molécula de grande importância encontrada em nossas análises foi o tripeptídeo glutationa. A glutationa faz parte da fase II (Figura 5) nos processos de desintoxicação de compostos orgânicos nas células, sendo conjugada aos xenobióticos em uma reação catalisada pela glutationa S-transferase Além disso, altos níveis de seus precursores (glicina e glutamato) estão presentes em altos níveis intracelulares. Este achado está de acordo com trabalhos já publicados na literatura que demonstraram que a presença de ANT leva a produção de EROs e disparam a resposta enzimática para combater os danos causados por estas moléculas, causando aumento na transcrição e tradução das enzimas antioxidantes

catalase, ascorbato peroxidase, glutationa redutase, glutationa S-transferase e superóxido dismutase, em especial a Fe-SOD (Aksmann, et al., 2014; Carvalho, et al., 2011; Carvalho e Lettieri 2011). Na análise topológica das vias metabólicas (Figura 17), a via metabólica dos aminoácidos mais impactada foi a de metabolismo de glicina, serina e treonina, uma via importante que tem como função a manutenção do balanço de nitrogênio intracelular em plantas (Novitskaya, et al., 2002), além disso, glicina é produzida a partir de glioxilato, outra via metabólica que foi altamente impactada após a exposição a ANT. Além disso, a assimilação de acetato para incorporação de carbonos é feita através do ciclo do glioxilato e do ciclo dos ácidos tricarboxílicos, sendo que a primeira é a via preferencial em C. reinhardtii (Singh, et al., 2014; Sweetlove, et al., 2010). Isso está de acordo com o que encontramos ao expormos a microalga a ANT, onde há acumulo dos intermediários destas vias, como succinato, malato e o próprio glioxilato. Além disso, o acumulo de malato é depende da presença de acetato e glioxilato para que ocorra a transcrição do gene Mas1. O produto deste gene catalisa a reação entre o glioxilato e o acetil-CoA, formando malato como seu produto final. Com base nisso, podemos sugerir que para compensar o desacoplamento da fotossíntese causado pela presença do xenobiótico ANT, o metabolismo heterotrófico através da incorporação de acetato sob forma de acetil-CoA se torna a fonte primária de energia da célula. Somando-se a isso, o ciclo do glioxilato tem papel central durante o estresse causado por ANT e a incorporação de carbonos através da via do glioxilato pode permitir com que a célula seja capaz de sintetizar moléculas mais complexas como aminoácidos, lipídeos, ácidos carboxílicos e carboidratos.

6 Conclusões

A metabolômica se mostrou uma ferramenta útil para estudar a resposta a estresse causado por diferentes agentes, neste caso em particular, o antraceno. Para estes experimentos de metabolômica utilizando *C. reinhardtii* como nosso modelo, a melhor forma de *quenching* foi a solução de metanol 70% com os sais do meio TAP e o melhor tampão de extração foi o que contém metanol:clorofórmio:água (2,5:1:0,5 v/v). *Chlamydomonas reinhardtii* acumula ácidos graxos, ácidos carboxílicos e aminoácidos quando exposta a antraceno, e esta é uma resposta bastante comum de algas e estresse em diversas condições. Além disso, sugerimos que a principal forma de obtenção de energia e carbono, já que a fotossíntese é afetada quando esta microalga é exposta a antraceno, é através de acetato por intermédio da via do glioxilato. Vale salientar também que este é o primeiro trabalho de perfil metabólico utilizando HPAs como agente estressante.

7 Referencias bibliográficas

Aggio, R., S. G. Villas-Boas and K. Ruggiero (2011). "Metab: an R package for high-throughput analysis of metabolomics data generated by GC-MS." <u>Bioinformatics</u> 27(16): 2316-2318.

Aksmann, A., W. Pokora, A. Bascik-Remisiewicz, A. Dettlaff-Pokora, B. Wielgomas, M. Dziadziuszko and Z. Tukaj (2014). "Time-dependent changes in antioxidative enzyme expression and photosynthetic activity of *Chlamydomonas reinhardtii* cells under acute exposure to cadmium and anthracene." <u>Ecotoxicol Environ Saf</u> **110**: 31-40.

Aksmann, A., T. Shutova, G. Samuelsson and Z. Tukaj (2011). "The mechanism of anthracene interaction with photosynthetic apparatus: a study using intact cells, thylakoid membranes and PS II complexes isolated from *Chlamydomonas reinhardtii*." <u>Aquat Toxicol</u> **104**(3-4): 205-210.

Aksmann, A. and Z. Tukaj (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 CO_2 level." <u>Archives of environmental contamination and toxicology</u> **47**(2): 177-184.

Aksmann, A. and Z. Tukaj (2008). "Intact anthracene inhibits photosynthesis in algal cells: a fluorescence induction study on *Chlamydomonas reinhardtii* cw92 strain." <u>Chemosphere</u> **74**(1): 26-32.

Alonso, A., S. Marsal and A. Julia (2015). "Analytical methods in untargeted metabolomics: state of the art in 2015." <u>Front Bioeng Biotechnol</u> **3**: 23.

Asada, K. (2006). "Production and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts and their functions." <u>Plant Physiol</u> **141**(2): 391-396.

Bado-Nilles, A., C. Quentel, H. Thomas-Guyon and S. Le Floch (2009). "Effects of two oils and 16 pure polycyclic aromatic hydrocarbons on plasmatic immune parameters in the European sea bass, *Dicentrarchus labrax* (Linne)." <u>Toxicol In Vitro</u> **23**(2): 235-241.

Baird, W. M., L. A. Hooven and B. Mahadevan (2005). "Carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbon-DNA adducts and mechanism of action." <u>Environmental and molecular mutagenesis</u> **45**(2-3): 106-114.

Bard, S. M., B. R. Woodin and J. J. Stegeman (2002). "Expression of P-glycoprotein and cytochrome p450 1A in intertidal fish (*Anoplarchus purpurescens*) exposed to environmental contaminants." <u>Aquat Toxicol</u> **60**(1-2): 17-32.

Bascik-Remisiewicz, A., A. Aksmann, A. Zak, M. Kowalska and Z. Tukaj (2011). "Toxicity of cadmium, anthracene, and their mixture to *Desmodesmus subspicatus* estimated by algal

growth-inhibition ISO standard test." <u>Archives of environmental contamination and toxicology</u> **60**(4): 610-617.

Bernhardt, R. (2006). "Cytochromes P450 as versatile biocatalysts." <u>J Biotechnol</u> **124**(1): 128-145.

Berthomieu, C. and R. Hienerwadel (2009). "Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy." <u>Photosynthesis research</u> **101**(2-3): 157-170.

Blaby, I. K., C. E. Blaby-Haas, N. Tourasse, E. F. Hom, D. Lopez, M. Aksoy, A. Grossman, J. Umen, S. Dutcher, M. Porter, S. King, G. B. Witman, M. Stanke, E. H. Harris, D. Goodstein, J. Grimwood, J. Schmutz, O. Vallon, S. S. Merchant and S. Prochnik (2014). "The *Chlamydomonas* genome project: a decade on." <u>Trends in plant science</u> **19**(10): 672-680.

Bölling, C. and O. Fiehn (2005). "Metabolite profiling of *Chlamydomonas reinhardtii* under nutrient deprivation." <u>Plant Physiol</u> **139**(4): 1995-2005.

Brack, W., R. Altenburger, E. Kuster, B. Meissner, K. D. Wenzel and G. Schuurmann (2003). "Identification of toxic products of anthracene photomodification in simulated sunlight." <u>Environ Toxicol Chem</u> **22**(10): 2228-2237.

Bradford, M. M. (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." <u>Analytical biochemistry</u> **72**: 248-254.

Carvalho, R. N., S. K. Bopp and T. Lettieri (2011). "Transcriptomics responses in marine diatom *Thalassiosira pseudonana* exposed to the polycyclic aromatic hydrocarbon benzo[a]pyrene." <u>PloS one</u> 6(11): e26985.

Carvalho, R. N. and T. Lettieri (2011). "Proteomic analysis of the marine diatom *Thalassiosira pseudonana* upon exposure to benzo(a)pyrene." <u>BMC Genomics</u> 12: 159.

Chia, M. A., A. T. Lombardi, M. da Graca Gama Melao and C. C. Parrish (2015). "Combined nitrogen limitation and cadmium stress stimulate total carbohydrates, lipids, protein and amino acid accumulation in *Chlorella vulgaris* (Trebouxiophyceae)." <u>Aquatic toxicology</u> **160**: 87-95.

Cross, F. R. and J. G. Umen (2015). "The *Chlamydomonas* cell cycle." <u>The Plant journal : for cell and molecular biology</u> **82**(3): 370-392.

Davis, M. C., O. Fiehn and D. G. Durnford (2013). "Metabolic acclimation to excess light intensity in *Chlamydomonas reinhardtii*." <u>Plant, cell & environment</u> **36**(7): 1391-1405.

Denisov, I. G., T. M. Makris, S. G. Sligar and I. Schlichting (2005). "Structure and chemistry of cytochrome P450." <u>Chem Rev</u> **105**(6): 2253-2277.

Djomo, J. E., A. Dauta, V. Ferrier, J. F. Narbonne, A. Monkiedje, T. Njine and P. Garrigues (2004). "Toxic effects of some major polyaromatic hydrocarbons found in crude oil and aquatic sediments on *Scenedesmus subspicatus*." <u>Water Res</u> **38**(7): 1817-1821.

Dunn, W. B. (2008). "Current trends and future requirements for the mass spectrometric investigation of microbial, mammalian and plant metabolomes." <u>Physical biology</u> 5(1): 011001.

Dunn, W. B. (2011). "Mass spectrometry in systems biology an introduction." <u>Methods in enzymology</u> **500**: 15-35.

Edwards, R., D. P. Dixon and V. Walbot (2000). "Plant glutathione S-transferases: enzymes with multiple functions in sickness and in health." <u>Trends Plant Sci</u> **5**(5): 193-198.

El-Aneed, A., A. Cohen and J. Banoub (2009). "Mass Spectrometry, Review of the Basics: Electrospray, MALDI, and Commonly Used Mass Analyzers." <u>Applied Spectroscopy</u> <u>Reviews</u> **44**(3): 210-230.

Fernie, A. R., A. Aharoni, L. Willmitzer, M. Stitt, T. Tohge, J. Kopka, A. J. Carroll, K. Saito, P. D. Fraser and V. DeLuca (2011). "Recommendations for reporting metabolite data." <u>The Plant cell</u> **23**(7): 2477-2482.

Fiehn, O. (2002). "Metabolomics--the link between genotypes and phenotypes." <u>Plant</u> molecular biology **48**(1-2): 155-171.

Foyer, C. H. and G. Noctor (2011). "Ascorbate and glutathione: the heart of the redox hub." <u>Plant Physiol</u> **155**(1): 2-18.

Gala, W. R. and J. P. Giesy (1992). "Photoinduced Toxicity of Anthracene to the Green-Alga, Selenastrum-Capricornutum." <u>Archives of Environmental Contamination and Toxicology</u> **23**(3): 316-323.

Goeptar, A. R., H. Scheerens and N. P. Vermeulen (1995). "Oxygen and xenobiotic reductase activities of cytochrome P450." <u>Crit Rev Toxicol</u> **25**(1): 25-65.

Gorman, D. S. and R. P. Levine (1965). "Cytochrome f and plastocyanin: their sequence in the photosynthetic electron transport chain of *Chlamydomonas reinhardi*." <u>Proc Natl Acad Sci</u> <u>U S A</u> **54**(6): 1665-1669.

Grote, M., G. Schuurmann and R. Altenburger (2005). "Modeling photoinduced algal toxicity of polycyclic aromatic hydrocarbons." <u>Environ Sci Technol</u> **39**(11): 4141-4149.

Guo, K., C. Ji and L. Li (2007). "Stable-isotope dimethylation labeling combined with LC-ESI MS for quantification of amine-containing metabolites in biological samples." <u>Analytical chemistry</u> **79**(22): 8631-8638.

Hall, R., M. Beale, O. Fiehn, N. Hardy, L. Sumner and R. Bino (2002). "Plant metabolomics: the missing link in functional genomics strategies." <u>The Plant cell</u> **14**(7): 1437-1440.

Haritash, A. K. and C. P. Kaushik (2009). "Biodegradation aspects of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs): a review." <u>J Hazard Mater</u> **169**(1-3): 1-15.

Harris, E. H. (2001). "*Chlamydomonas* as a Model Organism." <u>Annu Rev Plant Physiol Plant</u> <u>Mol Biol</u> **52**: 363-406.

He, Z., S. Siripornadulsil, R. T. Sayre, S. J. Traina and L. K. Weavers (2011). "Removal of mercury from sediment by ultrasound combined with biomass (transgenic *Chlamydomonas reinhardtii*)." <u>Chemosphere</u> **83**(9): 1249-1254.

Hjorth, M., J. Vester, P. Henriksen, V. Forbes and I. Dahllöf (2007). "Functional and structural responses of marine plankton food web to pyrene contamination." <u>Marine Ecology</u> <u>Progress Series</u> **338**: 21-31.

Ho, S. H., A. Nakanishi, X. Ye, J. S. Chang, C. Y. Chen, T. Hasunuma and A. Kondo (2015). "Dynamic metabolic profiling of the marine microalga *Chlamydomonas* sp. JSC4 and enhancing its oil production by optimizing light intensity." <u>Biotechnology for biofuels</u> **8**: 48.

Jamers, A., K. Van der Ven, L. Moens, J. Robbens, G. Potters, Y. Guisez, R. Blust and W. De Coen (2006). "Effect of copper exposure on gene expression profiles in *Chlamydomonas reinhardtii* based on microarray analysis." <u>Aquat Toxicol</u> **80**(3): 249-260.

Jedrychowski, W., A. Galas, A. Pac, E. Flak, D. Camman, V. Rauh and F. Perera (2005). "Prenatal ambient air exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons and the occurrence of respiratory symptoms over the first year of life." <u>European journal of epidemiology</u> **20**(9): 775-782.

Jinkerson, R. E. and M. C. Jonikas (2015). "Molecular techniques to interrogate and edit the *Chlamydomonas* nuclear genome." <u>The Plant journal : for cell and molecular biology</u> **82**(3): 393-412.

Johnson, X. and J. Alric (2013). "Central carbon metabolism and electron transport in *Chlamydomonas reinhardtii*: metabolic constraints for carbon partitioning between oil and starch." <u>Eukaryotic cell</u> **12**(6): 776-793.

Kueger, S., D. Steinhauser, L. Willmitzer and P. Giavalisco (2012). "High-resolution plant metabolomics: from mass spectral features to metabolites and from whole-cell analysis to subcellular metabolite distributions." <u>The Plant journal : for cell and molecular biology</u> **70**(1): 39-50.

Lee do, Y. and O. Fiehn (2008). "High quality metabolomic data for *Chlamydomonas* reinhardtii." <u>Plant Methods</u> **4**: 7.

Lei, Z., D. V. Huhman and L. W. Sumner (2011). "Mass spectrometry strategies in metabolomics." <u>The Journal of biological chemistry</u> **286**(29): 25435-25442.

Li, X., M. A. Schuler and M. R. Berenbaum (2007). "Molecular mechanisms of metabolic resistance to synthetic and natural xenobiotics." <u>Annu Rev Entomol</u> **52**: 231-253.

Marwood, C. A., R. E. Smith, K. R. Solomon, M. N. Charlton and B. M. Greenberg (1999). "Intact and photomodified polycyclic aromatic hydrocarbons inhibit photosynthesis in natural assemblages of Lake Erie phytoplankton exposed to solar radiation." <u>Ecotoxicol Environ Saf</u> **44**(3): 322-327.

Matthew, T., W. Zhou, J. Rupprecht, L. Lim, S. R. Thomas-Hall, A. Doebbe, O. Kruse, B. Hankamer, U. C. Marx, S. M. Smith and P. M. Schenk (2009). "The metabolome of *Chlamydomonas reinhardtii* following induction of anaerobic H2 production by sulfur depletion." <u>The Journal of biological chemistry</u> **284**(35): 23415-23425.

Maul, J. E., J. W. Lilly, L. Cui, C. W. dePamphilis, W. Miller, E. H. Harris and D. B. Stern (2002). "The *Chlamydomonas reinhardtii* plastid chromosome: islands of genes in a sea of repeats." <u>Plant Cell</u> **14**(11): 2659-2679.

McCann, J. H. and K. R. Solomon (2000). "The effect of creosote on membrane ion leakage in *Myriophyllum spicatum L*." <u>Aquatic Toxicology</u> **50**(3): 275-284.

Mekonnen, K. N., B. S. Chandravanshi, M. Redi-Abshiro, A. A. Ambushe, R. I. McCrindle and S. Moyo (2015). "Distribution of polycyclic aromatic hydrocarbons in sediments of Akaki River, Lake Awassa, and Lake Ziway, Ethiopia." <u>Environmental monitoring and assessment</u> **187**(7): 4669.

Merchant, S. S., S. E. Prochnik, O. Vallon, E. H. Harris, S. J. Karpowicz, G. B. Witman, A. Terry, A. Salamov, L. K. Fritz-Laylin, L. Marechal-Drouard, W. F. Marshall, L. H. Qu, D. R. Nelson, A. A. Sanderfoot, M. H. Spalding, V. V. Kapitonov, Q. Ren, P. Ferris, E. Lindquist, H. Shapiro, S. M. Lucas, J. Grimwood, J. Schmutz, P. Cardol, H. Cerutti, G. Chanfreau, C. L. Chen, V. Cognat, M. T. Croft, R. Dent, S. Dutcher, E. Fernandez, H. Fukuzawa, D. Gonzalez-Ballester, D. Gonzalez-Halphen, A. Hallmann, M. Hanikenne, M. Hippler, W. Inwood, K. Jabbari, M. Kalanon, R. Kuras, P. A. Lefebvre, S. D. Lemaire, A. V. Lobanov, M. Lohr, A. Manuell, I. Meier, L. Mets, M. Mittag, T. Mittelmeier, J. V. Moroney, J. Moseley, C. Napoli, A. M. Nedelcu, K. Niyogi, S. V. Novoselov, I. T. Paulsen, G. Pazour, S. Purton, J. P. Ral, D. M. Riano-Pachon, W. Riekhof, L. Rymarquis, M. Schroda, D. Stern, J. Umen, R. Willows, N. Wilson, S. L. Zimmer, J. Allmer, J. Balk, K. Bisova, C. J. Chen, M. Elias, K. Gendler, C. Hauser, M. R. Lamb, H. Ledford, J. C. Long, J. Minagawa, M. D. Page, J. Pan, W. Pootakham, S. Roje, A. Rose, E. Stahlberg, A. M. Terauchi, P. Yang, S. Ball, C. Bowler, C. L. Dieckmann, V. N. Gladyshev, P. Green, R. Jorgensen, S. Mayfield, B. Mueller-Roeber, S. Rajamani, R. T. Sayre, P. Brokstein, I. Dubchak, D. Goodstein, L. Hornick, Y. W. Huang, J. Jhaveri, Y. Luo, D. Martinez, W. C. Ngau, B. Otillar, A. Poliakov, A. Porter, L. Szajkowski, G. Werner, K. Zhou, I. V. Grigoriev, D. S. Rokhsar and A. R. Grossman (2007). "The Chlamydomonas genome reveals the evolution of key animal and plant functions." Science **318**(5848): 245-250.

Moco, S., J. Vervoort, R. J. Bino, R. C. H. De Vos and R. Bino (2007). "Metabolomics technologies and metabolite identification." <u>TrAC Trends in Analytical Chemistry</u> **26**(9): 855-866.

Noctor, G. and C. H. Foyer (1998). "Ascorbate and Glutathione: Keeping Active Oxygen Under Control." <u>Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol</u> **49**: 249-279.

Novitskaya, L., S. J. Trevanion, S. Driscoll, C. H. Foyer and G. Noctor (2002). "How does photorespiration modulate leaf amino acid contents? A dual approach through modelling and metabolite analysis." <u>Plant Cell Environ</u> **25**(7): 821-835.

Okay, O. S., B. Karacik, S. Basak, B. Henkelmann, S. Bernhoft and K. W. Schramm (2009). "PCB and PCDD/F in sediments and mussels of the Istanbul strait (Turkey)." <u>Chemosphere</u> **76**(2): 159-166.

Oliver, S. G., M. K. Winson, D. B. Kell and F. Baganz (1998). "Systematic functional analysis of the yeast genome." <u>Trends in Biotechnology</u> **16**(9): 373-378.

Park, J. H., S. Y. Lee, T. Y. Kim and H. U. Kim (2008). "Application of systems biology for bioprocess development." <u>Trends Biotechnol</u> **26**(8): 404-412.

Perera, F. P., Z. Li, R. Whyatt, L. Hoepner, S. Wang, D. Camann and V. Rauh (2009). "Prenatal airborne polycyclic aromatic hydrocarbon exposure and child IQ at age 5 years." <u>Pediatrics</u> **124**(2): e195-202.

Perera, F. P., V. Rauh, R. M. Whyatt, W. Y. Tsai, D. Tang, D. Diaz, L. Hoepner, D. Barr, Y. H. Tu, D. Camann and P. Kinney (2006). "Effect of prenatal exposure to airborne polycyclic aromatic hydrocarbons on neurodevelopment in the first 3 years of life among inner-city children." <u>Environmental health perspectives</u> **114**(8): 1287-1292.

Pflugmacher, S. and H. Sandermann, Jr. (1998). "Cytochrome P450 monooxygenases for fatty acids and xenobiotics in marine macroalgae." <u>Plant Physiol</u> **117**(1): 123-128.

Pinu, F., P. B. Edwards, S. Jouanneau, P. Kilmartin, R. Gardner and S. Villas-Boas (2013). "Sauvignon blanc metabolomics: grape juice metabolites affecting the development of varietal thiols and other aroma compounds in wines." <u>Metabolomics</u>: 1-18.

Pinu, F. R., S. Jouanneau, L. Nicolau, R. C. Gardner and S. G. Villas-Boas (2012). "Concentrations of the Volatile Thiol 3-Mercaptohexanol in Sauvignon blanc Wines: No Correlation with Juice Precursors." <u>American Journal of Enology and Viticulture</u> **63**(3): 407-412.

Pokora, W. and Z. Tukaj (2010). "The combined effect of anthracene and cadmium on photosynthetic activity of three *Desmodesmus* (Chlorophyta) species." <u>Ecotoxicol Environ</u> <u>Saf</u> **73**(6): 1207-1213.

Proschold, T., E. H. Harris and A. W. Coleman (2005). "Portrait of a species: *Chlamydomonas reinhardtii*." <u>Genetics</u> **170**(4): 1601-1610.

Puzanskiy, R. K., A. L. Shavarda, E. R. Tarakhovskaya and M. F. Shishova (2015). "Analysis of metabolic profile of *Chlamydomonas reinhardtii* cultivated under autotrophic conditions." <u>Applied Biochemistry and Microbiology</u> **51**(1): 83-94.

Renberg, L., A. I. Johansson, T. Shutova, H. Stenlund, A. Aksmann, J. A. Raven, P. Gardestrom, T. Moritz and G. Samuelsson (2010). "A metabolomic approach to study major metabolite changes during acclimation to limiting CO2 in Chlamydomonas reinhardtii." <u>Plant physiology</u> **154**(1): 187-196.

Rosales-Mendoza, S. (2013). "Future directions for the development of Chlamydomonasbased vaccines." <u>Expert review of vaccines</u> 12(9): 1011-1019.

Rubinelli, P., S. Siripornadulsil, F. Gao-Rubinelli and R. T. Sayre (2002). "Cadmium- and iron-stress-inducible gene expression in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*: evidence for H43 protein function in iron assimilation." <u>Planta</u> **215**(1): 1-13.

Samanta, S. K., O. V. Singh and R. K. Jain (2002). "Polycyclic aromatic hydrocarbons: environmental pollution and bioremediation." <u>Trends Biotechnol</u> **20**(6): 243-248.

Sandermann, H., Jr. (1992). "Plant metabolism of xenobiotics." <u>Trends Biochem Sci</u> 17(2): 82-84.

Sansone, S. A., T. Fan, R. Goodacre, J. L. Griffin, N. W. Hardy, R. Kaddurah-Daouk, B. S. Kristal, J. Lindon, P. Mendes, N. Morrison, B. Nikolau, D. Robertson, L. W. Sumner, C. Taylor, M. van der Werf, B. van Ommen and O. Fiehn (2007). "The metabolomics standards initiative." <u>Nature biotechnology</u> **25**(8): 846-848.

Shahidul Islam, M. and M. Tanaka (2004). "Impacts of pollution on coastal and marine ecosystems including coastal and marine fisheries and approach for management: a review and synthesis." <u>Mar Pollut Bull</u> **48**(7-8): 624-649.

Shao, H. B., L. Y. Chu, Z. H. Lu and C. M. Kang (2007). "Primary antioxidant free radical scavenging and redox signaling pathways in higher plant cells." Int J Biol Sci **4**(1): 8-14.

Shen, L., F. Wania, Y. D. Lei, C. Teixeira, D. C. Muir and T. F. Bidleman (2005). "Atmospheric distribution and long-range transport behavior of organochlorine pesticides in North America." <u>Environ Sci Technol</u> **39**(2): 409-420.

Shimada, T., A. Sugie, T. Yamada, H. Kawazoe, M. Hashimoto, E. Azuma, T. Nakajima, K. Inoue and Y. Oda (2003). "Dose-response studies on the induction of liver cytochromes P4501A1 and 1B1 by polycyclic aromatic hydrocarbons in arylhydrocarbon-responsive C57BL/6J mice." <u>Xenobiotica</u> **33**(9): 957-971.

Shulaev, V. (2006). "Metabolomics technology and bioinformatics." <u>Briefings in bioinformatics</u> 7(2): 128-139.

Singh, H., M. R. Shukla, K. V. Chary and B. J. Rao (2014). "Acetate and bicarbonate assimilation and metabolite formation in *Chlamydomonas reinhardtii*: a 13C-NMR study." <u>PloS one</u> **9**(9): e106457.

Smart, K. F., R. B. Aggio, J. R. Van Houtte and S. G. Villas-Boas (2010). "Analytical platform for metabolome analysis of microbial cells using methyl chloroformate derivatization followed by gas chromatography-mass spectrometry." <u>Nat Protoc</u> **5**(10): 1709-1729.

Smith, C. A., G. O'Maille, E. J. Want, C. Qin, S. A. Trauger, T. R. Brandon, D. E. Custodio, R. Abagyan and G. Siuzdak (2005). "METLIN: a metabolite mass spectral database." <u>Therapeutic drug monitoring</u> **27**(6): 747-751.

Smith, C. A., E. J. Want, G. O'Maille, R. Abagyan and G. Siuzdak (2006). "XCMS: processing mass spectrometry data for metabolite profiling using nonlinear peak alignment, matching, and identification." <u>Analytical chemistry</u> **78**(3): 779-787.

Söderholm, S. L., M. Damm and C. O. Kappe (2010). "Microwave-assisted derivatization procedures for gas chromatography/mass spectrometry analysis." <u>Mol Divers</u> **14**(4): 869-888.

Subramanian, V., A. Dubini, D. P. Astling, L. M. Laurens, W. M. Old, A. R. Grossman, M. C. Posewitz and M. Seibert (2014). "Profiling *Chlamydomonas* metabolism under dark, anoxic H2-producing conditions using a combined proteomic, transcriptomic, and metabolomic approach." Journal of proteome research **13**(12): 5431-5451.

Sumner, L. W., A. Amberg, D. Barrett, M. H. Beale, R. Beger, C. A. Daykin, T. W. Fan, O. Fiehn, R. Goodacre, J. L. Griffin, T. Hankemeier, N. Hardy, J. Harnly, R. Higashi, J. Kopka, A. N. Lane, J. C. Lindon, P. Marriott, A. W. Nicholls, M. D. Reily, J. J. Thaden and M. R. Viant (2007). "Proposed minimum reporting standards for chemical analysis Chemical Analysis Working Group (CAWG) Metabolomics Standards Initiative (MSI)." <u>Metabolomics : Official journal of the Metabolomic Society</u> **3**(3): 211-221.

Sweetlove, L. J., K. F. Beard, A. Nunes-Nesi, A. R. Fernie and R. G. Ratcliffe (2010). "Not just a circle: flux modes in the plant TCA cycle." <u>Trends in plant science</u> **15**(8): 462-470.

Szabados, L. and A. Savoure (2010). "Proline: a multifunctional amino acid." <u>Trends in plant</u> science **15**(2): 89-97.

Szaefer, H., V. Krajka-Kuzniak and W. Baer-Dubowska (2008). "The effect of initiating doses of benzo[a]pyrene and 7,12-dimethylbenz[a]anthracene on the expression of PAH activating enzymes and its modulation by plant phenols." <u>Toxicology</u> **251**(1-3): 28-34.

Theodoridis, G. A., H. G. Gika, E. J. Want and I. D. Wilson (2012). "Liquid chromatographymass spectrometry based global metabolite profiling: a review." <u>Analytica chimica acta</u> **711**: 7-16.

Torres, M. A., M. P. Barros, S. C. Campos, E. Pinto, S. Rajamani, R. T. Sayre and P. Colepicolo (2008). "Biochemical biomarkers in algae and marine pollution: a review." <u>Ecotoxicol Environ Saf</u> **71**(1): 1-15.

Torzillo, G., A. Scoma, C. Faraloni and L. Giannelli (2014). "Advances in the biotechnology of hydrogen production with the microalga *Chlamydomonas reinhardtii*." <u>Critical reviews in biotechnology</u>.

Tukaj, S. and Z. Tukaj (2010). "Distinct chemical contaminants induce the synthesis of Hsp70 proteins in green microalgae *Desmodesmus subspicatus*: Heat pretreatment increases cadmium resistance." Journal of Thermal Biology **35**(5): 239-244.

Valledor, L., M. Escandon, M. Meijon, E. Nukarinen, M. J. Canal and W. Weckwerth (2014). "A universal protocol for the combined isolation of metabolites, DNA, long RNAs, small RNAs, and proteins from plants and microorganisms." <u>Plant J **79**(1)</u>: 173-180.

Vermeulen, N. P. E., G. Donné-Op den Kelder and J. N. M. Commandeur (1992). Formation of and protection against toxic reactive intermediates. <u>Perspectives in medicinal chemistry</u>. B. Testa, E. Kyburz, W. Fuhrer and R. Giger. Basel, Verlag Helvetica Chimica Acta: 573-593.

Villas-Bôas, S. G., S. Mas, M. Akesson, J. Smedsgaard and J. Nielsen (2005). "Mass spectrometry in metabolome analysis." <u>Mass Spectrom Rev</u> **24**(5): 613-646.

Villas-Boas, S. G., J. F. Moxley, M. Akesson, G. Stephanopoulos and J. Nielsen (2005). "High-throughput metabolic state analysis: the missing link in integrated functional genomics of yeasts." <u>The Biochemical journal</u> **388**(Pt 2): 669-677.

Villas-Boas, S. G., S. Rasmussen and G. A. Lane (2005). "Metabolomics or metabolite profiles?" <u>Trends Biotechnol</u> 23(8): 385-386.

Villas-Bôas, S. G., K. F. Smart, S. Sivakumaran and G. A. Lane (2011). "Alkylation or Silylation for Analysis of Amino and Non-Amino Organic Acids by GC-MS?" <u>Metabolites</u> **1**(1): 3-20.

Wang, Q. Z., C. Y. Wu, T. Chen, X. Chen and X. M. Zhao (2006). "Integrating metabolomics into a systems biology framework to exploit metabolic complexity: strategies and applications in microorganisms." <u>Appl Microbiol Biotechnol</u> **70**(2): 151-161.

Wang, S., Y. Sheng, M. Feng, J. Leszczynski, L. Wang, H. Tachikawa and H. Yu (2007). "Light-induced cytotoxicity of 16 polycyclic aromatic hydrocarbons on the US EPA priority pollutant list in human skin HaCaT keratinocytes: Relationship between phototoxicity and excited state properties." <u>Environmental Toxicology</u> **22**(3): 318-327.

Warshawsky, D., T. Cody, M. Radike, R. Reilman, B. Schumann, K. LaDow and J. Schneider (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." <u>Chem Biol Interact</u> **97**(2): 131-148.

Wilce, M. C. and M. W. Parker (1994). "Structure and function of glutathione S-transferases." <u>Biochim Biophys Acta</u> **1205**(1): 1-18.

Williams, C. (1996). "Combatting marine pollution from land-based activities: Australian initiatives." Ocean & Coastal Management **33**(1-3): 87-112.

Wishart, D. S. (2011). "Advances in metabolite identification." <u>Bioanalysis</u> 3(15): 1769-1782.

Wishart, D. S., T. Jewison, A. C. Guo, M. Wilson, C. Knox, Y. Liu, Y. Djoumbou, R. Mandal, F. Aziat, E. Dong, S. Bouatra, I. Sinelnikov, D. Arndt, J. Xia, P. Liu, F. Yallou, T. Bjorndahl, R. Perez-Pineiro, R. Eisner, F. Allen, V. Neveu, R. Greiner and A. Scalbert (2013). "HMDB 3.0--The Human Metabolome Database in 2013." <u>Nucleic acids research</u> **41**(Database issue): D801-807.

Wishart, D. S., C. Knox, A. C. Guo, R. Eisner, N. Young, B. Gautam, D. D. Hau, N. Psychogios, E. Dong, S. Bouatra, R. Mandal, I. Sinelnikov, J. Xia, L. Jia, J. A. Cruz, E. Lim, C. A. Sobsey, S. Shrivastava, P. Huang, P. Liu, L. Fang, J. Peng, R. Fradette, D. Cheng, D. Tzur, M. Clements, A. Lewis, A. De Souza, A. Zuniga, M. Dawe, Y. Xiong, D. Clive, R. Greiner, A. Nazyrova, R. Shaykhutdinov, L. Li, H. J. Vogel and I. Forsythe (2009). "HMDB: a knowledgebase for the human metabolome." <u>Nucleic Acids Res</u> **37**(Database issue): D603-610.

Xia, J., I. V. Sinelnikov, B. Han and D. S. Wishart (2015). "MetaboAnalyst 3.0-making metabolomics more meaningful." <u>Nucleic acids research</u>.

Zbigniew, T. and P. Wojciech (2006). "Individual and combined effect of anthracene, cadmium, and chloridazone on growth and activity of SOD izoformes in three *Scenedesmus* species." <u>Ecotoxicol Environ Saf</u> **65**(3): 323-331.

Zhang, Y. X. and S. Tao (2009). "Global atmospheric emission inventory of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) for 2004." <u>Atmospheric Environment</u> **43**(4): 812-819.

8 ANEXO

Metabolic Response of *Chlamydomonas reinhardtii* exposed to anthracene Eliezer Stefanello and Pio Colepicolo*

Biochemistry Department, Chemistry Institute, São Paulo University, Av. Prof. Lineu Prestes, 748, São Paulo, SP, Brazil

* Correspondence to Pio Colepicolo (piocolep@iq.usp.br)

ABSTRACT

Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) are frequently environmental pollutants found in a variety of environments, and can be found at concentrations that can be hazardous to aquatic organisms. When *Chlamydomonas reinhardtii* cells are grown in presence of anthracene (ANT), a three-ring acutely toxic PAH, photosynthesis is impaired, reducing growth rate and reactive species are generated as well. Here, using a metabolomics-based approach, we aim to investigate the metabolic effects caused by ANT in *C. reinhardtii* growth after 24 h of exposure. In the present study, we report markedly alterations on the metabolism of three main classes of metabolites: fatty acids, carboxylic acids and amino acids. Furthermore, we propose that the main source of energy and carbons assimilation comes from acetate metabolism and glyoxylate pathway.

KEYWORDS: Metabolomics, Photosynthesis, Methyl chloroformate, Polycyclic aromatic hydrocarbons, Glyoxylate pathway, GC-MS

INTRODUCTION

Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) are among the most frequently environmental pollutants and can be found in a variety of environments such as air, soil, fresh water, seawater, particulate matter, sediments and even food (Wang *et al.*, 2007; Torres *et al.*, 2008; Cristale *et al.*, 2012). These molecules are mainly produced by the incomplete combustion of organic material and fossil fuels, which results from industrial processes and other human activities. The report of the global atmospheric emission inventory of PAHs, displayed that the major anthropogenic sources of PAH comes from biomass burning such as coal and petroleum combustion (57%), mainly in United States, India and China; wildfires

(17%), especially in South American countries and consumer product usage (7%) (Zhang and Tao, 2009). Because of their ubiquitous distribution and high toxicity, many PAHs are recommended for investigation by the U.S. Environmental Protection Agency (US EPA) (Dabestani and Ivanov, 1999). These compounds can absorb light, especially in the UVA and UVB region, and it has been reported that they become particularly more toxic when exposed to light (Lampi et al., 2006; Wang et al., 2006; Okay and Karacik, 2007). Their toxicity comes mainly from generating reactive species, caused by the excited state after absorbing energy from light, and this energy can be released by transferring to molecular oxygen, generating reactive oxygen species (ROS), free radicals, or photo-modified PAH products that can damage cellular constituents (Grote et al., 2005; Okay and Karacik, 2007). Those molecules are frequently found in aquatic environment, transported by surface waters and atmosphere, and most of the PAH are absorbed by particulate matter and can be found deposited in sediments. Because of their small size, phytoplankton can act as particulate matter and absorb PAH, causing accumulation, biomagnification through food chain or can lead to drastic reduction in biomass of primary producers potentially affecting subsequent trophic levels (Torres et al., 2008; Xia et al., 2015). In aquatic organisms, their toxicity is often associated with their hydrophobic properties, inducing a conformational change in biomembranes and, as a result, increase their permeability (McCann and Solomon, 2000). One of these compounds, anthracene (ANT), a three-ring PAH, is notably known to inhibit photosynthesis and leading overproduction of reactive species, which can readily accumulate in biological membranes (Aksmann et al., 2011; Aksmann et al., 2014). Due to its highly hydrophobic nature, it's manly found associated with particulate matter in concentrations close to 3 µg/g of surface sediments and up to 90 mg/kg soil (Weissenfels et al., 1992; Dong et al., 2012). In the green algae Chlamydomonas reinhardtii, it was demonstrated that ANT can disrupt photosynthesis by lowering the quantum efficiency of electron trapping and transport, decreasing the number of active Photosystem II reaction centres and impairment of Photosystem II - Photosystem I cooperation (Aksmann and Tukaj, 2008). The impairment caused by ANT suggests that this molecule acts as an uncoupler, causing H⁺ leakage from thylakoid membranes (Aksmann et al., 2011). The inhibition of photophosphorylation leads to overproduction of ROS, that lead to a 4-fold increase in Fe-SOD activity. Similarly, a 2-fold increase in catalase activity was found after 24 hours of exposure of C. reinhardtii to ANT (Aksmann et al., 2014). Chlamydomonas reinhardtii is known to have a very flexible metabolism, and can switch rapidly between fully autotrophic to fully heterotrophic using

alternative carbon source. As ANT disrupt photosynthesis, the algae must find a way to keep up with its energy demands. To this end, to investigate the metabolic response of *C*. *reinhardtii* exposed to ANT, we have applied a metabolomics approach based on gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) metabolomics approach which may provide an insightful view of its metabolic flexibility and adaptation to hazardous situations.

MATERIAL AND METHODS

Chemicals

The internal standard ¹³C-alanine, the derivatization reagent methyl chloroformate (MCF), pyridine, methanol, chloroform, sodium bicarbonate, anhydrous sodium sulphate and anthracene were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, USA). Dimethyl sulfoxide (DMSO) was purchased from (Tedia Company Inc., USA). Sodium hydroxide was purchased from Synth (Diadema – SP, Brazil). All chemicals were of analytical grade.

Culture conditions

Chlamydomonas reinhardtii strain CC-125 was purchased from Chlamydomonas Resource Center, University of Minnesota, USA. Anthracene was dissolved in DMSO. DMSO (0.1% v/v) had no significant effect on growth, photosynthesis, respiration or chlorophyll fluorescence on *Chlamydomonas reinhardtii* cells (Aksmann and Tukaj, 2008). The batch cultures were set up by dilution of the pre-culture to an initial optical density of 0.05. Algae were grown for 24 h in 500 mL glass test tubes containing 200 mL of TAP media (Gorman and Levine, 1965) under agitation at 150 rpm and constant temperature of 28 °C. The light cycle used for growth was set to 14:10 (light:dark) with two fluorescent light 20W "Luz do dia Especial" lamps (Osram do Brasil), providing 70 µmol of photon m⁻² s⁻¹. Chemicals were added to the cultures at the start of the experiment. All control samples contains DMSO (0.1% v/v) to compensate for any possible effect.

Quenching

After 24h, cells reached log phase, and 4 replicates of 20 mL of each condition were injected into 50 mL centrifuge tubes (Nalgene, Thermo Scientific) containing 20 mL of -80

°C cold quenching solution. The quenching solution is composed of 70 % methanol in water supplemented with TAP salts for isosmotic condition. The tubes were then kept in ethanol bath at -20°C to minimize any enzymatic activity. Cells were collected by centrifugation at 10000 g for 15 min with the centrifuge and rotor cooled at -20°C (Beckman Coulter). Supernatant was decanted and residual liquid carefully removed (Bölling and Fiehn, 2005; Lee do and Fiehn, 2008). Immediately after quenching, extraction was carried on.

Extraction of metabolites

The protocol is adapted from Valledor and co-workers (2014). Eight hundred microliters of cold (-20)°C) metabolite buffer extraction containing methanol:chloroform:water (2.5:1:0.5) were added to the quenched cells as well as 10 µL of 20 mmol/L of ¹³C-alanine as internal standard. Samples were homogenized in vortex for 30 seconds, transferred to 2 mL microcentrifuge tubes and kept on -20 °C for 20 minutes. Samples were centrifuged at 12000 g for 5 min at -20 °C and the supernatant were transferred to 2 ml microcentrifuge tubes that contained 800 µl of phase separation mix consisting of chloroform:water (1:1). Tubes with metabolites were vigorously homogenized and centrifuged at 12000 g and 5 min at room temperature. The two phases were clearly defined with a sharp interface. The polar upper phase was transferred to 15 mL tubes. The pellet was re-extracted and the polar phases were combined. Five milliliters of ultra-pure water was added to the polar phase and the samples were frozen in -80 °C. After that, the samples were lyophilized and are ready for derivatization (Valledor et al., 2014). The remaining pellet was stored on freezer for protein quantitation.

Protein quantification using a modified Bradford method

The frozen pellets were resuspended in 1 mL of 0.2 mol/L of NaOH and boiled for 5 minutes. The samples were cooled on ice for 5 min and centrifuged at 2000 g for 5 min to eliminate possible precipitates. The supernatants were used for colorimetric Bradford method. The calibration standards (bovine albumin) were submitted to the same process for correction of any possible interference.

Methyl chlroformate (MCF) derivatization

This method was used for derivatizing amino and non-amino organic acids, and some primary amines and alcohols. With the lyophilized samples, 200 μ L of 1 M NaOH was added to the sample, and then was transferred to a silanized reaction tube. MCF derivatization was carried out as described by After derivatization, all the samples were injected on to a GC–MS (Shimadzu GC 2010 Plus coupled to a MSD 2010 Ultra) with a quadrupole mass selective detector (EI) operated at 70 eV. The column used was a Zebron ZB-1701 (Phenomenex), 30 m x 250 μ m (internal diameter) x 0.15 μ m (film thickness), with 5 m guard column. The MS was operated in scan mode (start after 5.8 min; mass range 38–650 a.m.u. at 1.47 scans/s (Smart *et al.*, 2010).

Data mining of GC-MS raw data and Data Analysis

AMDIS software (NIST, Boulder, CO, USA) was used for deconvoluting GC-MS chromatograms and identifying metabolites using an MCF MS library provided by Dr. Silas Villas-Bôas lab (Auckland University, New Zealand) following the protocol described by Smart and co-workers (2010) (Smart *et al.*, 2010). The identifications were based on both the MS spectrum of the derivatized metabolite and its respective chromatographic retention time. The relative abundance of identified metabolites was determined through a R package (<u>www.r-project.org</u>), Metab (Aggio *et al.*, 2011). The resulting values were normalized by the protein content in each replicate as well as by the abundance of internal standard added during extraction (¹³C-alanine). Statistical analysis were carried out using the MetaboAnalyst plataform (<u>www.metaboanalyst.ca</u>) (Xia *et al.*, 2015).

RESULTS

Toxic effects of ANT on population growth

After 24 h of growth, control cells of *C. reinhardtii* reached exponential growth phase (OD_{750nm} = 0.2), and as showed in Figure 1, ANT influenced the growth population in a concentration dependent manner. The lower concentrations tested (1.25, 2.5 and 5 μ mol/L)

did not affected the population growth significantly ($p \le 0.05$). On the other hand, at higher concentrations, ANT inhibited growth population by 57% (10 µmol/L), and with the highest tested concentration (20 µmol/L) induced algicidal effects, leading to population decrease below the initial density ($p \le 0.05$).



Figure 1 – *Chlamydomonas reinhardtii* growth inhibition to increasing concentrations of ANT (1.25, 2.5, 5, 10 and 20 μ mol/L) after 24 h of exposure. Each value is an arithmetic mean of three independent experiments, bars represent the standard deviation. The curve fit was calculated using the sigmoid fit.

The EC₅₀ value calculated from fitted sigmoid curve was $9.437 \pm 1.096 \mu mol/L$. For further experiments, the nominal concentration of 9 $\mu mol/L$ was used. For comparison purposes, experiments with two strains of *C. reinhardtii*, cw92 and CC-125 exposed to anthracene, the EC₅₀ were, respectively, 1.6 and 5 $\mu mol/L$ (Aksmann and Tukaj, 2008; Aksmann *et al.*, 2011; Aksmann *et al.*, 2014). This show that our result are on par with data found on literature.

Intracellular metabolic profile of *Chlamydomonas reinhardtii* exposed to ANT Identification of metabolites and data mining

After exposure 24 h of exposure, 4 replicates of each biological sample were quenched and derivatized as described in Material and Methods. Three independent experiments were performed. After analysis in GC-MS, we were able to identified 34 metabolites classified in three main classes and are summarized in the Table S1. The carboxylic acids and their derivatives were the main class of metabolites identified our GC-MS analysis, accounting for 15 molecules, followed by 10 amino acids and their derivatives and finally 8 fatty acids were annotated.

Statistical analysis

Statistical analysis was performed utilizing the suit MetaboAnalyst, an online website that perform the most common types of statistical analysis utilized in metabolomics and we found that only 3 metabolites (Citrate, Octanoic acid and Valine) were not altered over ANT exposition when compared to control cell (Figure 2 grey circles).



Figure 2 – Volcano plot from metabolites identified by GC-MS analysis. The red circles represent features above the threshold for fold change (2) and t-test threshold ($p \le 0.05$) compared to control samples. The grey circles represent values that were not significantly altered in *C. reinhardtii* exposed to ANT. Both values are log transformed. For more detailed information see Table S3.

The remaining 31 metabolites (red circles) were found with at least two-fold change and with *p*-value ≤ 0.05 in culture samples exposed to and ANT. Interestingly, the results presented on Figure 2 indicated that only higher cellular levels of organic acids, amino acids and fatty acids were found after *C. reinhardti* was exposed to ANT in comparison to control samples.

Prediction of Metabolic State of C. reinhardtii exposed to ANT

Using the profile of intracellular metabolites identified in the samples of *C. reinhardtii* cells growing in the presence or absence of ANT, we created a comparative metabolic activity

profile using the pathway analysis module of MetaboAnalyst (Xia *et al.*, 2015). The metabolic activities of *C. reinhardtii* cells under ANT were compared with those in cells cultured in the absence of ANT. These include a range of metabolic pathways from the metabolism of amino acids, carbon, energy and lipids metabolites (Figure 3). In particular, glycine, serine and threonine metabolism; glutathione metabolism, citrate cycle and glyoxylate metabolism exhibited the highest impact on the metabolism of *C. reinhardtii* exposed to ANT.



Figure 3 – Impact on metabolism of *C. reinhardtii* under exposure to ANT. Metabolic pathways that are significantly more affected during ANT exposure are found in upper right corner. Here, we found that the metabolic pathway more affected by ANT were (1) Glycine, serine and threonine metabolism; (2) Glyoxylate pathway and (3) Glutathione pathway. For more detailed information see Table S4.

DISCUSSION

The main goal of our work was to evaluate the impact caused by ANT exposure in C. reinhardtii. This microalgae possess a very flexible metabolism and possess the ability to switch from completely photoautotrophic state to solely acetate-based heterotrophic or mixotrophic states (Johnson and Alric, 2013). As a physiological response to different environmental stresses, microalgae changes their biochemical composition (Chia et al., 2015), such as general metabolic response when microalgae are facing a stress situation is lipid accumulation as reported for cadmium stress, nitrogen and sulfur depleted cells and starch deficient cells (Matthew et al., 2009; Johnson and Alric, 2013; Chia et al., 2015). Thus, it was not a surprise that higher levels of fatty acids were found when C. reinhardtii was exposed to ANT. Lipid storage and stress response are a complex response in algae and is expected to be multifactorial depending on acetate and light regulation, or at least residual photosynthesis (Johnson and Alric, 2013). Similarly to fatty acids, another strong physiological response in microalgae metabolism is the amino acids accumulation in cells facing a stress condition including nutrient deprivation, cadmium exposure, light stress and CO₂ limitation (Bölling and Fiehn, 2005; Matthew et al., 2009; Renberg et al., 2010; Davis et al., 2013; Chia et al., 2015). With the exception of valine, all amino acids found in our GC-MS analysis showed a marked relative accumulation in cultures exposed to ANT. These changes in amino acids metabolism could be the result in protein catabolism due to damage caused in photosynthesis or damages caused by ROS generated by ANT exposure. Furthermore, this increase in amino acids may reflect a mechanism to buffer changes in central carbon and nitrogen metabolism, particularly proline because of its proposed radical scavenging properties and it is known to accumulate in algae and plants when exposed to a variety of stresses (Szabados and Savoure, 2010). Another important molecule found in our analysis was glutathione. This comes in line with previous works that demonstrated that ANT exposure leads to ROS production (Aksmann et al., 2014). In the topology analysis (Figure 3), the most impacted amino acid pathway was the glycine, serine and threonine metabolism, an important pathway that maintain the nitrogen balance inside the cell. In normal photorespiratory metabolism, glycine is produced from glyoxylate, another highly impacted pathway found in our analysis, and this amino acid accumulate under nitrogen deprivation and photorespiratory conditions (Novitskaya et al., 2002). As demonstrated previously (Figure 3), carboxylic acids production, especially glyoxylate cycle, were positively up-regulated after ANT exposure. In addition, it is generally assumed that the acetate assimilation takes place primarily through the glyoxylate and tricarboxylic acid (TCA) cycle pathways (Singh et al., 2014) and it is established that glyoxylate cycle is preferred over TCA cycle by *C. reinhardtii* (Sweetlove *et al.*, 2010). This is in agreement with our findings that showed increase accumulation of glyoxylate and TCA cycle intermediates, like succinate and malate. Furthermore, malate accumulation is dependent of glyoxylate and acetate, triggering the transcription of *Mas1*gene. The product of this gene catalyse the reaction between glyoxylate and acetyl-CoA forming malate as a final product. This might lead us to suggest that this could be an alternative to the disruption of photosynthesis of *C. reinhardtii* caused by ANT. Taken all together, we can suggest that to compensate for deficient photosynthesis, heterotrophic acetate metabolism producing acetyl-CoA is an important energy source, and glyoxylate cycle plays a central role during stress caused by ANT. Furthermore, incorporation of carbon through glyoxylate cycle can enable synthesis of more complex molecules like amino acids, lipids and carboxylic acids.

CONCLUSION

In this work, we found that *Chlamydomonas reinhardtii* accumulates fatty acids, carboxylic acids and amino acids after exposure to ANT, using a metabolomic approach. Additionally, we suggested that the main source of energy in photosynthetic disrupted cell exposed to ANT comes from acetate assimilation an carbon incorporation through glyoxylate cycle.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by grant from Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP (2010/14893-9).

REFERENCES

- Aggio, R., S. G. Villas-Boas, *et al.* (2011). "Metab: an R package for high-throughput analysis of metabolomics data generated by GC-MS." Bioinformatics **27**(16): 2316-2318.
- Aksmann, A., W. Pokora, *et al.* (2014). "Time-dependent changes in antioxidative enzyme expression and photosynthetic activity of *Chlamydomonas reinhardtii* cells under acute exposure to cadmium and anthracene." Ecotoxicol Environ Saf **110**: 31-40.
- Aksmann, A., T. Shutova, et al. (2011). "The mechanism of anthracene interaction with photosynthetic apparatus: a study using intact cells, thylakoid membranes and PS II complexes isolated from *Chlamydomonas reinhardtii*." Aquat Toxicol **104**(3-4): 205-210.
- Aksmann, A. & Z. Tukaj (2008). "Intact anthracene inhibits photosynthesis in algal cells: a fluorescence induction study on *Chlamydomonas reinhardtii* cw92 strain." Chemosphere 74(1): 26-32.
- Bölling, C. & O. Fiehn (2005). "Metabolite profiling of *Chlamydomonas reinhardtii* under nutrient deprivation." Plant Physiol **139**(4): 1995-2005.
- Chia, M. A., A. T. Lombardi, *et al.* (2015). "Combined nitrogen limitation and cadmium stress stimulate total carbohydrates, lipids, protein and amino acid accumulation in *Chlorella vulgaris* (Trebouxiophyceae)." Aquatic toxicology **160**: 87-95.
- Cristale, J., F. S. Silva, *et al.* (2012). "Influence of sugarcane burning on indoor/outdoor PAH air pollution in Brazil." Environmental Pollution **169**(0): 210-216.
- Dabestani, R. & I. N. Ivanov (1999). "A Compilation of Physical, Spectroscopic and Photophysical Properties of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons." Photochemistry and Photobiology **70**(1): 10-34.
- Davis, M. C., O. Fiehn, *et al.* (2013). "Metabolic acclimation to excess light intensity in *Chlamydomonas reinhardtii*." Plant, cell & environment **36**(7): 1391-1405.
- Dong, C. D., C. F. Chen, *et al.* (2012). "Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in industrial harbor sediments by GC-MS." International journal of environmental research and public health 9(6): 2175-2188.
- Gorman, D. S. & R. P. Levine (1965). "Cytochrome f and plastocyanin: their sequence in the photosynthetic electron transport chain of *Chlamydomonas reinhardi*." Proc Natl Acad Sci U S A 54(6): 1665-1669.

- Grote, M., G. Schuurmann, *et al.* (2005). "Modeling photoinduced algal toxicity of polycyclic aromatic hydrocarbons." Environ Sci Technol **39**(11): 4141-4149.
- Johnson, X. & J. Alric (2013). "Central carbon metabolism and electron transport in *Chlamydomonas reinhardtii*: metabolic constraints for carbon partitioning between oil and starch." Eukaryotic cell 12(6): 776-793.
- Lampi, M. A., J. Gurska, *et al.* (2006). "Photoinduced toxicity of polycyclic aromatic hydrocarbons to Daphnia magna: ultraviolet-mediated effects and the toxicity of polycyclic aromatic hydrocarbon photoproducts." Environ Toxicol Chem 25(4): 1079-1087.
- Lee do, Y. & O. Fiehn (2008). "High quality metabolomic data for *Chlamydomonas reinhardtii*." Plant Methods **4**: 7.
- Matthew, T., W. Zhou, et al. (2009). "The metabolome of Chlamydomonas reinhardtii following induction of anaerobic H2 production by sulfur depletion." The Journal of biological chemistry 284(35): 23415-23425.
- McCann, J. H. & K. R. Solomon (2000). "The effect of creosote on membrane ion leakage in *Myriophyllum spicatum L*." Aquatic Toxicology **50**(3): 275-284.
- Novitskaya, L., S. J. Trevanion, *et al.* (2002). "How does photorespiration modulate leaf amino acid contents? A dual approach through modelling and metabolite analysis." Plant Cell Environ 25(7): 821-835.
- Okay, O. S. & B. Karacik (2007). "Photoinduced toxicity of selected PAHs to the marine microalga Phaeodactylum tricornutum." J Environ Sci Health A Tox Hazard Subst Environ Eng 42(6): 707-714.
- Renberg, L., A. I. Johansson, *et al.* (2010). "A metabolomic approach to study major metabolite changes during acclimation to limiting CO2 in Chlamydomonas reinhardtii." Plant physiology **154**(1): 187-196.
- Singh, H., M. R. Shukla, et al. (2014). "Acetate and bicarbonate assimilation and metabolite formation in *Chlamydomonas reinhardtii*: a 13C-NMR study." PloS one 9(9): e106457.
- Smart, K. F., R. B. Aggio, *et al.* (2010). "Analytical platform for metabolome analysis of microbial cells using methyl chloroformate derivatization followed by gas chromatography-mass spectrometry." Nat Protoc 5(10): 1709-1729.
- Sweetlove, L. J., K. F. Beard, *et al.* (2010). "Not just a circle: flux modes in the plant TCA cycle." Trends in plant science **15**(8): 462-470.

- Szabados, L. & A. Savoure (2010). "Proline: a multifunctional amino acid." Trends in plant science **15**(2): 89-97.
- Torres, M. A., M. P. Barros, *et al.* (2008). "Biochemical biomarkers in algae and marine pollution: a review." Ecotoxicol Environ Saf **71**(1): 1-15.
- Valledor, L., M. Escandon, *et al.* (2014). "A universal protocol for the combined isolation of metabolites, DNA, long RNAs, small RNAs, and proteins from plants and microorganisms." Plant J **79**(1): 173-180.
- Wang, Q. Z., C. Y. Wu, et al. (2006). "Integrating metabolomics into a systems biology framework to exploit metabolic complexity: strategies and applications in microorganisms." Appl Microbiol Biotechnol 70(2): 151-161.
- Wang, S., Y. Sheng, et al. (2007). "Light-induced cytotoxicity of 16 polycyclic aromatic hydrocarbons on the US EPA priority pollutant list in human skin HaCaT keratinocytes: Relationship between phototoxicity and excited state properties." Environmental Toxicology 22(3): 318-327.
- Weissenfels, W., H.-J. Klewer, *et al.* (1992). "Adsorption of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by soil particles: influence on biodegradability and biotoxicity." Appl Microbiol Biotechnol **36**(5): 689-696.
- Xia, J., I. V. Sinelnikov, *et al.* (2015). "MetaboAnalyst 3.0-making metabolomics more meaningful." Nucleic acids research.
- Xia, X., H. Li, *et al.* (2015). "How does predation affect the bioaccumulation of hydrophobic organic compounds in aquatic organisms?" Environmental science & technology 49(8): 4911-4920.
- Zhang, Y. X. & S. Tao (2009). "Global atmospheric emission inventory of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) for 2004." Atmospheric Environment **43**(4): 812-819.
Suplementary Information

Metabolic Response of *Chlamydomonas reinhardtii* exposed to anthracene Eliezer Stefanello and Pio Colepicolo* Biochemistry Department, Chemistry Institute, São Paulo University, Av. Prof. Lineu Prestes, 748, São Paulo, SP, Brazil

* Correspondence to Pio Colepicolo (piocolep@iq.usp.br)

Table S1 – Data on anthracene toxicity for different green microalgae species and EC_{50} endpoints. Adapted fromAksmann and Tukaj, 2008.

Organism	Toxicicty	Condition/Data source						
Chlamydomonas reinhardtii CC-125	$EC_{50/24h} = 9.43 \ \mu mol/L$	Visible light; EC_{50} calculated from						
		optical density. Present work						
Chlamydomonas reinhardtii cw92	$EC_{50/24h} = 1.6 \ \mu mol/L$	Visible light; EC_{50} calculated from						
		population density. (Aksmann and Tukaj,						
		2008).						
Chlamydomonas reinhardtii CC-125	$EC_{50/24h} = 5 \ \mu mol/L$	Visible light; EC_{50} calculated from						
		population density. (Aksmann, et al,						
		2011).						
Scenedesmus armatus	$EC_{50/24h}=1.4\ \mu mol/L$	Visible light; EC_{50} calculated from						
		population density. (Aksmann and Tuk						
		2004).						
Scenedesmus vacuolatus	$EC_{50/24h}=2.8~\mu mol/L$	Visible light; EC_{50} calculated from						
		population density. (Grote, et al, 2005).						
Scenedesmus subspicatus	$EC_{50/7d} = 58.4 \ \mu mol/L$	Visible light; EC ₅₀ calculated from área						
		below the growth curve. (Djomo, et al,						
		2004).						
Scenedesmus capricornatum	EC _{50/22h} = 2,09 nmol/L	Visible ligth + UV; EC ₅₀ calculated from						
		growth rate. (Gala and Giesy, 1992).						

Table S2 – Intracelular metabolites identified by GC-MS using MCF derivatizationGroup of MetabolitesMetabolites

Group of Metabolites				metabolit	05						
Amino acids and their derivatives		Glicine,	Glut	amic	acid,	Glut	athione,	Isoleuc	ine,		
				Leucine,	Pro	line,	Putresc	ine,	Serine,	Threon	ine,
				Valine							
Carboxylic	acids	and	their	2-Oxoval	eric	acid,	3-Hy	drox	yoctanoic	acid,	3-
derivatives				Methyl-2-	-oxov	valeric	acid	, 3	-Methyl-2	2-oxoval	eric
				acid, 4-A	minc	butiri	c acid,	Ben	zoic acid	l, Carba	mic

	acid, Citric acid, Fumaric acid, Glyoxylic acid, Lact							
	acid, Malic acid, Malonic acid, Nicotinamide,							
	Succinic acid							
Fatty acids and their derivatives	Decanoic acid, Dodecanoic acid, gamma-linolenic							
	acid, Hexanoic acid, Myristic acid, Octanoic acid,							
	Palmitic acid, Stearic acid							

Tabela S3 – Metabolites identified by volcano plot analysis with fold change (FC) above/below the threshold (2) and *p*-values ≤ 0.05 of *C. reinhardtii* exposed to ANT. Dataset was log transformed and data is ranked from higher to lowest *p*-value.

Metabolites	FC	log2(FC)	p.value
Palmitic acid	2.9283	1.55	1.77E-10
Myristic acid	2.7483	1.4586	1.08E-09
3-Methyl-2-oxovaleric acid	2.4424	1.2883	9.49E-09
Stearic acid	2.5549	1.3533	1.82E-08
Nicotinamide	2.4102	1.2692	2.32E-08
Dodecanoic acid	2.5469	1.3487	3.36E-08
Linolenic acid	2.5661	1.3596	4.38E-08
Isoleucine	3.1169	1.6401	1.06E-07
2-Oxovaleric acid	2.441	1.2875	1.24E-07
Glyoxylic acid	2.4888	1.3155	1.62E-07
3-Methyl-2-oxopentanoic acid	2.3312	1.2211	1.84E-07
Leucine	3.0782	1.6221	2.40E-07
4-Aminobutyric acid	2.521	1.334	2.60E-07
Succinic acid	2.1995	1.1372	3.05E-07
Benzoic acid	2.4034	1.2651	3.16E-07
Threonine	2.2717	1.1838	3.32E-07
Decanoic acid	2.5343	1.3416	6.68E-07
Proline	2.4732	1.3064	8.83E-06
Aspartic acid	2.2164	1.1482	1.17E-05
Lactic acid	2.6461	1.4039	1.30E-05
Glycine	3.0181	1.5936	1.77E-05
Hexanoic acid	2.0592	1.0421	4.11E-05

Glutamic acid	2.5648	1.3588	0.000352
3-Hydroxyoctanoic acid	2.4565	1.2966	0.000954
Malic acid	2.4565	1.2966	0.000954
Putrescine	2.6836	1.4242	0.00151
Glutathione	2.0091	1.0066	0.002195
Fumaric acid	2.2326	1.1587	0.004009
Carbamate	2.1286	1.0899	0.017511

 Tabela S4 – Detailed results from pathway analysis of C. reinhardtii exposed to ANT.

				-			
	Total	Hit		log(p	Holm		Impac
	Cmpd	S	Raw p)	adjust	FDR	t
Fatty acid elongation in			1.77E-	22.4		2.39E-	
mitochondria	13	1	10	54	4.78E-09	09	0
			1.77E-	22.4		2.39E-	
Fatty acid metabolism	34	1	10	54	4.78E-09	09	0
			1.56E-	20.2		1.41E-	
Fatty acid biosynthesis	49	4	09	77	3.91E-08	08	0
Biosynthesis of unsaturated fatty			3.72E-	19.4		2.51E-	
acids	42	3	09	11	8.92E-08	08	0
			4.38E-	16.9		2.37E-	
alpha-Linolenic acid metabolism	23	1	08	43	1.01E-06	07	0.16
Valine, leucine and isoleucine			6.38E-	16.5		2.82E-	0.018
biosynthesis	26	3	08	68	1.40E-06	07	65
Valine, leucine and isoleucine			8.37E-	16.2		2.82E-	
degradation	34	2	08	96	1.76E-06	07	0
			8.37E-	16.2		2.82E-	
Glucosinolate biosynthesis	54	2	08	96	1.76E-06	07	0
Glycine, serine and threonine			1.15E-	15.9		3.19E-	0.534
metabolism	30	4	07	79	2.18E-06	07	13
			1.27E-	15.8		3.19E-	
Butanoate metabolism	18	2	07	78	2.29E-06	07	0
Glyoxylate and dicarboxylate			1.30E-	15.8		3.19E-	0.336
metabolism	17	3	07	55	2.29E-06	07	73

			2.74E-	15.1		6.16E-	0.093
Aminoacyl-tRNA biosynthesis	67	6	07	11	4.38E-06	07	02
			3.05E-	15.0		6.33E-	
Propanoate metabolism	15	1	07	04	4.57E-06	07	0
Alanine, aspartate and glutamate			1.25E-	13.5		2.40E-	0.005
metabolism	22	3	06	96	1.74E-05	06	75
			1.71E-	13.2		3.08E-	0.086
Arginine and proline metabolism	38	4	06	79	2.22E-05	06	69
			1.13E-	11.3		1.72E-	
Tyrosine metabolism	18	2	05	9	0.000136	05	0
			1.15E-	11.3		1.72E-	0.166
Methane metabolism	11	2	05	75	0.000136	05	67
			1.15E-	11.3		1.72E-	
Cyanoamino acid metabolism	11	2	05	75	0.000136	05	0
			1.30E-	11.2		1.76E-	
Glycolysis or Gluconeogenesis	25	1	05	48	0.000136	05	0
			1.30E-	11.2		1.76E-	
Pyruvate metabolism	21	1	05	48	0.000136	05	0
			1.77E-	10.9		2.27E-	
Nitrogen metabolism	15	1	05	45	0.000136	05	0
			2.99E-	10.4		3.68E-	0.427
Glutathione metabolism	26	3	05	16	0.00018	05	52
			3.25E-	10.3		3.81E-	0.175
Citrate cycle (TCA cycle)	20	3	05	35	0.00018	05	31
Cysteine and methionine			0.0002	8.29		0.0002	
metabolism	34	1	5	28	0.001001	6	0
			0.0002	8.29		0.0002	
Sphingolipid metabolism	13	1	5	28	0.001001	6	0
			0.0002	8.29		0.0002	
Sulfur metabolism	12	1	5	28	0.001001	6	0
Pantothenate and CoA			0.0645	2.74		0.0645	
biosynthesis	14	1	3	06	0.06453	3	0