UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA

Departamento de Bioquímica.

TESE - DOUTORADO

TÍTULO:

MODULAÇÃO DOS NÍVEIS DE PIGMENTOS E ÁCIDOS GRAXOS
EM ALGAS MARINHAS: FUNÇÃO DOS CAROTENÓIDES E
EFEITOS DO ESTRESSE AMBIENTAL

Aluno: Ernani Pinto Junior

Orientador: Prof. Dr. Pio Colepicolo Neto

São Paulo

Data do Depósito do Trabalho na SPG: 07 de maio de 2002.

**“Modulação dos Níveis de Pigmentos e
Ácidos Graxos em Algas Marinhas:
Função dos Carotenóides e Efeitos do
Estresse Ambiental”**

ERNANI PINTO JUNIOR

Tese de Doutorado submetida ao Instituto de Química da Universidade de São Paulo como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Doutor em Ciências – Área: Bioquímica.

Aprovado por:

Prof. Dr. PIO COLEPICOLO NETO
IQ – USP
(Orientador e Presidente)

Profa. Dra. IOLANDA MIDEA CUCCOVIA
IQ – USP

Profa. Dra. ANA CAMPA
FCF – USP

Profa. Dra. ESTELA MARIA PLASTINO
IB – USP

Prof. Dr. NORBERTO PEPORINE LOPES
FCF RP – USP

SÃO PAULO
02 DE AGOSTO 2002.

***“Science is the great antidote to the poison
of enthusiasm and **superstition**”.***

Adam Smith

Dedico esta tese à Fernanda, pelo carinho, compreensão e incentivo durante a minha carreira científica.

Em memória de minhas avós, **Maria dos Santos Alvarenga** e **Rita Quirino de Oliveira Pinto**, e de **Justina Lopes Cussi**, esta por ter proporcionado os momentos mais incríveis dos meus anos de faculdade.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, irmãos e familiares, pelo carinho e apoio de sempre;

Ao amigo e orientador, Dr. Pio Colepicolo, cuja confiança e estímulo constantes foram essenciais ao meu amadurecimento científico;

Aos companheiros de laboratório, Alcely, Keith, Helô, Paty Blaster, Tona, Ana, Drica, Vanessão, Sara e Maisa pela amizade e convívio estimulantes;

Aos técnicos Ednailson P. Carvalho e Sandra R. Souza, pelo suporte durante todos estes anos;

Aos amigos do Depto. de Bioquímica-USP, em especial ao Satélite, Paty e ao Stefano, pela disposição em me acompanhar para os famosos cafezinhos;

A Karina, minha pupila querida, pela amizade, carinho, cervejas no BC e Peter, e ajuda constante.

Ao Giba, pelos "schemes" e bons momentos na Suécia e no laboratório;

As Dras. P. Snoeijs, M. Pédersen e Ana Carvalho, pela colaboração científica e incentivo ao meu aprimoramento profissional;

Ao Betão, por ter me apresentado Belém do Pará e pelo incentivo no começo e durante minha carreira científica;

Ao Piva, pelas enxadas revisadas e amizade sincera.

Ao Mac e Edgar, que durante vários anos compartilharam momentos hilariantes na época de república e até hoje.

Ao Instituto de Química da USP, pelas excelentes condições de trabalho;

À Fapesp, pelo apoio financeiro essencial ao desenvolvimento deste trabalho;

A Cecília e Teresa, pela amizade e pelos valiosos comentários.

ABREVIATURAS

ACN: acetonitrila
AcOEt: acetato de etila
Apx: ascorbato peroxidase
ATP: adenosina trifosfato
BHT: 2,6- terc- butil-4-metil tolueno
BSA: albumina sérica bovina
t-ButOOH: *terc*-butil-hidroperóxido
CAT: catalase
C18:3c : ácido cis linolenico
C22:6c : ácido cis aradonico
cit c: citocromo c
CYP450: citocromo P450
CCD: cromatografia de camada delgada
CG: cromatografia gasosa
DCM: diclorometano
d.e.: diâmetro externo
d.i.: diâmetro interno
DMAPP: dimetilalilpirofosfato
DMF: dimetilformamida
EB: extrato bruto
EDTA : ácido etileno diamino tetra acético
EmeOH: extrato metanólico
ERO: espécies reativas de oxigênio
FADH₂ : flavina adenina dinucleotídeo reduzida
FCL: lipossomo de fosfatidilcolina
FCL/AST: lipossomo incorporado com astaxantina
FCL/LIC: lipossomo incorporado com licopeno
FCL/PER: lipossomo incorporado com peridinina
FCP: "fucoxanthin-Chl a/c protein"
FPP: farnesil pirofosfato
GPP: geranilpirofosfato
GGPP: geranilgeraniolpirofosfato
GPx: glutathione peroxidase
GR: glutathione reductase
GSH: glutathione reduzida
GSSG: glutathione oxidada
h: hora
HPLC: "high performance liquid chromatography" - cromatografia líquida de alta eficiência.
IPP: isoprenil pirofosfato
IV: infra vermelho
LC: fosfatidilcolina
LE: regime de luz:escuro de 12:12 horas

LHCs: "light-harvesting-complex"
MDA: malonaldeído
MeOH: metanol
min: minuto
MT: metal
NADP⁺: nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (oxidada)
NADPH: nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (reduzida)
PCB: bifenilas policloradas
PCP ("peridinin-chlorophyll protein")
PF: peso fresco
PI: padrão interno
PKC: proteína quinase C
PPPP: prefitoeno pirofosfato
POD: peroxidases
PS: peso seco
PSI: fotossistema I
PSII: fotossistema II
PUFAs: ácidos graxos poli-insaturados
Rfs: fatores de retenção
RMN: ressonância magnética nuclear
RUBISCO: ribulose-1,5-bifosfato carboxilase
s: segundo
SOD: superóxido dismutase
Tris: tris (hidroxi metil) amino metano
TBA: ácido tiobarbitúrico
TBARS: "Thiobarbituric Acid Reactive Substances" – substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico.
TDF: tiamina difosfato
TL: tiamina livre
TMP: tiamina monofosfato
TTP: tiamina trifosfato
UV: radiação ultravioleta
WHO: World Health Organization - Organização Mundial da Saúde

RESUMO

O estresse ambiental sobre algas marinhas pode ser causado por poluentes, ausência de nutrientes, variação da temperatura ou da intensidade luminosa. Embora vários grupos estudem os efeitos do estresse ambiental sobre a ecologia de animais marinhos, nos últimos anos, contudo, poucos pesquisadores têm investigado o seu efeito sobre a fisiologia das algas marinhas, sobretudo sobre a biossíntese e função de carotenóides e ácidos graxos. Deste modo, foram abordados experimentalmente a atividade antioxidante *in vitro* de alguns carotenóides encontrados em algas (determinação da constante de supressão (K_Q) de oxigênio singlete ($O_2 (^1\Delta_g)$) e redução da lipoperoxidação em lipossomos incorporados com carotenóides) bem como a monitoração da biossíntese de pigmentos e os níveis de ácidos graxos em algumas espécies de algas cultivadas em situações de estresse ambiental, como exposição a metais pesados (*Gracilaria tenuistipitata* e *Lingulodinium polyedrum*), alta densidade populacional (*Amphidinium cartareae*, *Nitzschia microcephala*, *Lingulodinium polyedrum*, *Minutocellus polymorphus* e *Tetraselmis gracilis*), e intensidade luminosa (*Lingulodinium polyedrum*). Ainda, nas algas expostas a estas condições adversas, parâmetros de estresse oxidativo e indicadores enzimáticos do metabolismo oxidativo foram medidos, como a atividade de superóxido dismutase, catalase, ascorbato peroxidase, e o doseamento dos níveis de malonaldeído (MDA), tióis e carbonilas de proteínas.

Por RMN de 1H , EM e HPLC com a co-injeção de padrões, foram identificados vários carotenos (β -caroteno e licopeno), xantofilas (peridinina, luteína, diadinoxantina, diatoxantina entre outras) e três tipos de clorofilas (*a*, *b* e *c*) das macro e micro algas estudadas. Paralelamente, seguindo as mesmas técnicas cromatográficas, estudamos a interconversão de tiamina com a identificação das três formas desta vitamina (livre, mono e difosfato).

Nos ensaios *in vitro*, as K_Q s da peridinina, carotenóide isolado de *Lingulodinium polyedrum*, em dois sistemas de solventes ($CDCl_3$: $0,95 \times 10^9 M^{-1}.s^{-1}$ e D_2O/CD_3COCD_3 1:1: $5,0 \times 10^9 M^{-1}.s^{-1}$) sugere que este pigmento apresenta uma

melhor função protetora contra os efeitos deletérios do O_2 ($^1\Delta_g$) em ambiente hidrofílico. A presença de peridinina e astaxantina incorporadas em lipossomos preenchidos com Fe^{2+} /EDTA foi determinante para diminuir os efeitos danosos de H_2O_2 e *t*-ButOOH, mostrando que a ação desses pigmentos depende da permeabilidade dos agentes oxidantes através da bicamada lipídica. Ambos carotenóides apresentaram atividade quando a peroxidação foi provocada pelo lado externo da bicamada.

A concentração dos ácidos graxos em culturas de *Lingulodinium polyedrum* durante o ciclo claro:escuro sugere que o aumento de C18:3 e C22:6 durante a fase clara ocorreu para compensar a lipoperoxidação (os níveis de MDA foram altos durante a fase clara) e manter a integridade e homeostase celular. Em culturas de *G. tenuistipitata* expostas a Cd^{2+} e Cu^{2+} , os níveis do ácido C20:4 (n-6) aumentaram cerca de 30% no tratamento com Cd^{2+} , provavelmente para preservar a integridade de membrana em resposta ao desbalanço redox provocado por esse metal. Em contrapartida, os níveis de C20:4 (n-6) decaíram cerca de 15% no tratamento com Cu^{2+} , evidenciando a especificidade desse metal em atingir as membranas tilacóides no cloroplasto. O ácido C18:3 (n-4) foi detectado apenas no tratamento com Cu^{2+} .

Os resultados encontrados para a monitoração da biossíntese de carotenóides abrem novas perspectivas para a compreensão dos mecanismos bioquímicos e fisiológicos adotados por algas marinhas cultivadas em ambientes adversos. Diferentes respostas foram encontradas para os níveis de pigmentos para as micro e macroalgas estudadas, mostrando que a biossíntese e a atividade das enzimas envolvidas no metabolismo oxidativo podem variar nas diferentes espécies e conforme o estímulo empregado.

ABSTRACT

Environmental stress on marine algae is provoked by pollutants, lack of nutrients, temperature oscillation or high light. Although some researchers have investigated environmental stress effects on marine animals ecology, lately, however, few groups have studied its effects on marine algae physiology, i.e. carotenoid function and biosynthesis and fatty acids contents. Thus, the *in vitro* activity, such as the quenching of $O_2 (^1\Delta_g)$ (K_Q) and the reduction of liposome peroxidation incorporated with carotenoids, of some pigments founded in algae were determined as well as the their biosynthesis when some species were growth under stressful condition, for example, heavy metal exposition (*Gracilaria tenuistipitata* and *Lingulodinium polyedrum*), cell density (*Amphidinium cartareae*, *Nitzschia microcephala*, *Lingulodinium polyedrum*, *Minutocellus polymorphus* and *Tetraselmis gracilis*) and high light (*Lingulodinium polyedrum*). In addition, some parameters of oxidative stress and enzymatic markers of oxidative metabolism such as superoxide dismutase, catalase and ascorbate peroxidase activities, malondialdehyde (MDA), protein carbonyls and thiols contents, were measured.

Some carotenes (β -carotene and lycopene), xanthophylls (peridinin, lutein, diadinoxanthin, diatoxanthin, etc) and three chlorophylls (*a*, *b* and *c*) were identified either by 1H NMR and MS or standards spiked in HPLC in the species studied. Also, using HPLC techniques, we studied the thiamine interconversion identifying three forms of this vitamin (free, mono- and diphosphate).

The K_Q s obtained for peridinin, isolated from *Lingulodinium polyedrum*, using two solvent systems ($CDCl_3$: $0,95 \times 10^9 M^{-1}.s^{-1}$ and D_2O/CD_3COCD_3 1:1: $5,0 \times 10^9 M^{-1}.s^{-1}$) suggest this pigment is more effective against the deleterious effects of $O_2 (^1\Delta_g)$ in hydrophilic environment. Peridinin and astaxanthin incorporated to liposomes filled with $Fe^{2+}/EDTA$ decreased the lipoperoxidation when H_2O_2 e *t*-ButOOH were added, showing that their function depending on the peroxidation promoters permeability through the membrane. Also, both carotenoids were able to protect the membrane when the lipoperoxidation was promoted outside.

The fatty acid contents measured in cultures of *L. polyedrum* during the light:dark cycle suggest that the increase of C18:3 and C22:6 levels during the light phase occurred to compensate the lipoperoxidation, since the levels of MDA were high in the same phase, and to keep the membrane integrity and cell homeostasis. The levels of C20:4 (n-6) increased about 30% when cultures of *G. tenuistipitata* were exposed to Cd^{2+} may be to preserve the cell membranes in response to misbalance caused by this heavy metal. On the other hand, the levels of C20:4 (n-6) decreased almost 15% during the treatment with Cu^{2+} , showing an evidence that this metal can affect the tilakoid membranes. The fatty acid C18:3 (n-4) was only detected in the assay with Cu^{2+} .

The carotenoid biosynthesis results bring new perspectives concerning the comprehension of the biochemistry and physiology mechanisms employed by marine algae against stressful environmental conditions. Different responses were founded for the carotenoid contents, showing that the biosynthesis and the activity of the enzymes involved in the oxidative metabolism can vary according to species or stimuli used.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	01
1.1. Características e diversidade das algas marinhas.	01
1.2. Função e biossíntese de carotenóides	05
1.3. Estresse oxidativo	10
1.3.1. Geração de espécies reativas de oxigênio pela respiração e fotossíntese.	11
1.3.2. Enzimas antioxidantes	16
1.3.3. Antioxidantes de baixo peso molecular	19
1.4. Algas marinhas versus estresse oxidativo	22
2. OBJETIVOS E JUSTIFICATIVAS	29
3. MATERIAIS E MÉTODOS	30
3.1. Cultivo das algas.	30
3.2. Isolamento dos carotenóides presentes em <i>Lingulodinium polyedrum</i> .	30
3.2.1. Determinação estrutural	31
3.3. Análise quantitativa dos carotenóides em extratos de <i>Lingulodinium polyedrum</i> .	32
3.4. Atividade antioxidante dos carotenóides:	33
3.4.1. Determinação da constante de supressão de O_2 ($^1\Delta_g$).	33
3.4.2. Avaliação da inibição da peroxidação lipídica em lipossomos.	35
3.4.2.1. Preparo de lipossomos multilamelares (FCL):	35
3.4.2.2. Preparo de lipossomos multilamelares incorporados com Fe^{2+} (Fe-FCL):	36
3.4.2.3. Indução da peroxidação lipídica.	36
3.4.2.4. Medidas da extensão da lipoperoxidação (teste TBARS)	37
3.4.2.5. Dosagem de Fe^{2+} .	38
3.4.3. Análise estatística.	38
3.5. Biossíntese de carotenóides durante a curva de crescimento de algumas microalgas.	38
3.5.1. Análise dos pigmentos por HPLC.	39
3.5.2. Atividade enzimática de SOD.	39
3.5.3. Análise estatística.	40
3.6. Efeito de sombreamento sobre a biossíntese de carotenóides em culturas de <i>Amphidinium carterae</i> e <i>Nitzschia microcephala</i> .	40
3.6.1. Análise dos pigmentos por HPLC.	41
3.6.2. Análise de tiamina e de seus estéres fosfatos por HPLC.	41
3.6.3. Atividade enzimática de SOD.	42
3.6.4. Medidas dos níveis de tióis de proteínas.	42
3.6.5. Análise estatística.	42
3.7. Biossíntese de carotenóides em culturas de <i>Lingulodinium polyedrum</i> expostas a Hg^{2+} , Pb^{2+} , Cd^{2+} e Cu^{2+} .	43
3.7.1. Análise estatística.	43
3.8. Efeitos Cd^{2+} e Cu^{2+} sobre o sistema antioxidante de <i>Gracilaria tenuistipitata</i> .	43
3.8.1. Análise dos pigmentos por HPLC	44

3.8.2. Medida dos níveis de compostos reativos ao ácido tiobarbitúrico (TBARs)	44
3.8.3. Medidas dos níveis de carbonilas de proteínas	45
3.8.4. Medidas dos níveis de ácidos graxos	45
3.8.5. Atividade enzimática de SOD, Catalase e Apx.	45
3.8.6. Análise estatística.	46
3.9. Níveis de ácidos graxos e pigmentos em culturas de <u>Lingulodinium polyedrum</u> durante o ciclo claro-escuro.	46
3.9.1. Análise dos pigmentos por HPLC.	47
3.9.2. Análise dos ácidos graxos por eletroforese capilar.	47
3.9.3. Medida dos níveis de MDA por HPLC.	48
3.9.4. Análise estatística.	48
4. RESULTADOS	49
4.1. Isolamento e elucidação estrutural dos carotenóides peridinina e β -caroteno de <u>Lingulodinium polyedrum</u> .	49
4.2. Análise quantitativa dos pigmentos presentes em <u>Lingulodinium polyedrum</u> .	52
4.3. Atividade antioxidante dos carotenóides:	53
4.3.1. Determinação da constante de supressão de O_2 ($^1\Delta_g$).	53
4.3.2. Avaliação da inibição da peroxidação lipídica em lipossomos preparados com astaxantina, peridinina e licopeno.	55
4.4. Biossíntese de carotenóides durante a curva de crescimento de <u>Lingulodinium polyedrum</u> , <u>Tetraselmis gracilis</u> e <u>Minutocelus polymorphus</u> .	60
4.4.1. Atividade enzimática de SOD.	61
4.4.2. Análise dos pigmentos por HPLC.	62
4.5. Efeito de sombreamento sobre a biossíntese de carotenóides em culturas de <u>Amphidinium carterae</u> e <u>Nitzschia microcephala</u> .	64
4.6. Biossíntese de carotenóides em culturas de <u>L. polyedrum</u> expostas a Hg^{2+} , Pb^{2+} , Cd^{2+} e Cu^{2+} .	71
4.7. Efeitos Cd^{2+} e Cu^{2+} sobre o sistema antioxidante de <u>Gracilaria tenuistipitata</u> .	72
4.7.1. Monitoração da biossíntese de carotenóides por HPLC.	73
4.7.2. Medida dos níveis de MDA.	73
4.7.3. Medidas dos níveis de carbonilas de proteínas.	74
4.7.4. Atividade enzimática de SOD, CAT e Apx	75
4.7.5. Medidas dos níveis de ácidos graxos.	76
4.8. Níveis de ácidos graxos e pigmentos em culturas de <u>Lingulodinium polyedrum</u> durante o ciclo claro-escuro.	77
5. DISCUSSÃO	82
5.1. Isolamento e identificação dos carotenóides presentes em <u>Lingulodinium polyedrum</u> .	82
5.2. Análise quantitativa do extrato metanólico bruto de <u>Lingulodinium polyedrum</u> .	83
5.3. Atividade antioxidante de alguns carotenóides de algas marinhas.	83
5.3.1. Determinação das constantes de supressão de O_2 ($^1\Delta_g$).	83
5.3.2. Ação protetora da peridinina e astaxantina contra lipoperoxidação em membranas multilamelares.	84

5.3.2.1. Lipossomos não preenchidos (FCL)	84
5.3.2.2. Lipossomos preenchidos com Fe^{2+} (Fe-FCL).	87
5.4. O efeito do crescimento das culturas de <u>Lingulodinium polyedrum</u> , <u>Minutocellus polymorphus</u> e <u>Tetraselmis gracilis</u> na concentração dos pigmentos e atividade de SOD.	89
5.5. O efeito do sombreamento nas culturas de <u>Amphidinium carterae</u> e <u>Nitzschia microcephala</u> sob a concentração dos pigmentos, tiamina, grupos tióis de proteínas e atividade de SOD	90
5.6. Tratamento das culturas de <u>Lingulodinium polyedrum</u> com metais poluentes.	93
5.7. Efeito dos cátions Cd^{2+} e Cu^{2+} na macroalga <u>Gracilaria tenuistipitata</u>	94
5.8. Variação de ácidos graxos, pigmentos e MDA durante o ciclo luz:escuro em <u>Lingulodinium polyedrum</u> .	96
6. CONCLUSÕES	98
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	99
8. CURRICULUM VITAE	114

1. INTRODUÇÃO

1.1. Características e diversidade das algas marinhas.

Os primeiros organismos vivos surgiram na Terra há 3,5 bilhões de anos. Esses organismos não possuíam um núcleo bem definido e outros compartimentos celulares complexos, e obtinham energia ora como heterótrofos a consumir matéria orgânica do ambiente aquático a sua volta, ora como autótrofos utilizando material inorgânico. Autótrofos incluíam formas quimiossintéticas, similares a bactérias encontradas nos dias de hoje próximo a geotermas, nas profundezas dos oceanos ou as sulfobactérias que dispunham de um fotossistema simples na fotossíntese (Sze 1998).

As primeiras algas (cianobactérias), apareceram há 3,46 bilhões de anos (Schopf 1993). Estas introduziram a fotossíntese com dois foto-sistemas, nos quais a H_2O é consumida e O_2 é gerado como subproduto. Esse O_2 liberado afetou profundamente a Terra. O acúmulo de O_2 na atmosfera permitiu a formação da camada de ozônio, a qual protege a superfície terrestre contra a radiação ultravioleta. Além disso, o O_2 permitiu o desenvolvimento da respiração aeróbica em células que obtinham energia com mais eficiência mediante a quebra de matéria orgânica. Sob essas novas condições, outro tipo de célula, com núcleo e organelas complexas, surgiu à cerca de 2,1 bilhões de anos atrás (Han & Runnegar 1992). Entre essas prematuras células eucarióticas algumas foram às precursoras das células eucarióticas de hoje. Atualmente, as algas continuam sendo importantes produtoras de O_2 e matéria orgânica no ambiente oceânico, estuarino e de água doce, enquanto outras algas adaptaram-se ao ambiente terrestre ou passaram a fazer parte de associações simbióticas com outros organismos (Sze 1998).

As algas evoluíram para um diverso grupo de organismos fotossintéticos, apresentando uma grande diversidade de formas, desde células microscópicas simples até algas multicelulares com vários metros de comprimento. Suas

estruturas celulares, suas formas e seus pigmentos fotossintéticos apresentam grande variação. As algas, assim como as demais plantas, possuem seus sistemas fotossintéticos baseados na clorofila-*a*. Contudo, as algas não apresentam as estruturas reprodutivas complexas das plantas. O grupo das algas inclui poucas espécies sem cores ou não-fotossintéticas que são relatadas como espécies heterótrofas (Sze 1998).

Tradicionalmente, o estudo das algas, é chamado ficologia. No sistema de divisão dos organismos vivos com cinco reinos, as algas eucarióticas são colocadas no reino Protista, o qual também inclui fungos protistas e protozoa, e as algas procarióticas no reino Monera, com outras eubactérias. Evidências moleculares recentes sugerem que os antecessores dos diferentes grupos de algas eucarióticas podem ter adquirido o sistema fotossintético por meio de diferentes origens e por isso, são menos relacionadas umas às outras do que outros grupos de protistas. Isso indica que as algas representam um número independente de linhas evolucionárias e portanto, estão bem definidas nos grupos taxonômicos. As algas podem ser classificadas em oito principais divisões ou filos com dezessete classes. Essas divisões, e mesmo as classes contidas nas divisões, exibem grande diversidade.

As algas são consideradas a base da cadeia alimentar em todos os sistemas aquáticos, servindo de fonte de alimentos para moluscos, equinodermas, crustáceos e peixes nos seus diferentes estágios de crescimento. O valor nutricional de uma espécie de alga depende de diferentes características, tais como formato e tamanho, digestibilidade e toxicidade. Mas, o que parece ser determinante para estabelecer a qualidade de alimento transferido para outro nível trófico da cadeia é a sua composição química e bioquímica (níveis de ácidos graxos, esteróides, carotenóides, aminoácidos, açúcares, minerais e vitaminas). A importância do fitoplâncton marinho transcende o seu valor nutricional, pois este também é responsável pela produção de aproximadamente 50% de O₂ e a maior parte de dimetilsulfeto liberado para a atmosfera (Nagalakshmi & Prasad 1998, Gibson *et al* 1990, Stefels & van Boekel 1993).

Nessa tese investigamos a modulação dos níveis de pigmentos e ácidos graxos em algumas espécies de algas marinhas expostas a situações de estresse ambiental. Alguns aspectos fisiológicos, bioquímicos e de importância ecológica das algas aqui estudadas serão abordados a seguir.

Os dinoflagelados possuem peculiaridades que tornam suas afinidades filogenéticas e história evolutiva enigmáticas. De fato, em razão das características aparentemente primitivas, esses organismos já foram considerados intermediários evolutivos entre procariontes e eucariontes (Herzog & Maroteaux 1986). Dentre tais características incluem-se peculiaridades do núcleo, o qual possui cromossomos permanentemente condensados, além da ausência de histonas e nucleossomo (Rizzo 1991). A divisão mitótica é distinta da dos demais eucariontes e a quantidade de DNA genômico é excepcionalmente grande, atingindo cerca de 200 pg por núcleo, comparativamente aos 3,2 pg por núcleo, encontrado em células humanas (Holm-Hansen 1969). Entretanto, análises filogenéticas recentes têm indicado um alto grau de parentesco com ciliados, sugerindo uma divergência mais tardia dos dinoflagelados em relação aos procariontes, na escala evolutiva (Saunders *et al* 1997).

Outra característica importante destes organismos é a presença de cloroplastos atípicos, circundados por três membranas e contendo um pigmento carotenóide distinto chamado peridina. Este pigmento é encontrado somente em espécies de dinoflagelados, onde forma um complexo com a clorofila, conhecido por PCP ("peridinin-chlorophyll protein"), o qual é hidrossolúvel e de estrutura distinta (Hofmann *et al* 1996). A origem dos cloroplastos em dinoflagelados é ainda um tema polêmico, podendo ter ocorrido pela endossimbiose secundária com um procarionte ou com um eucarionte fotossintético (Gibbs 1981).

Certas espécies de dinoflagelados como as dos gêneros *Lingulodinium* e *Pyrocystis* são ainda bioluminescentes, estando entre os 6% dos dinoflagelados responsáveis pela "fosforescência dos oceanos". A emissão rítmica de luz azul (490 nm) nestes organismos parece ser importante para evitar sua predação pelo zooplâncton (Abrahams & Townsend 1993). Além do ritmo de bioluminescência,

outros processos também demonstraram ser regulados circadianamente em *L. polyedrum*, como divisão celular, motilidade, fotossíntese, assimilação de nitrogênio e metabolismo oxidativo (Hastings *et al* 1961, Homma & Hastings 1989, Hollnagel *et al* 1996, Ramalho *et al* 1995, Roenneberg & Hastings 1991). O rápido desenvolvimento das pesquisas nessa área transformou os dinoflagelados em excelentes organismos, servindo de modelos ao estudo de ritmos biológicos em eucariontes. Entretanto, muitos dos aspectos biológicos dos dinoflagelados, como a sua organização genômica e o controle da expressão de seus genes, permanecem ainda obscuros.

A taxonomia do grupo das algas vermelhas não é devidamente compreendida. Quanto ao gênero *Gracilaria* (*Gracilariales*), mais de 150 espécies têm sido nomeadas e a interpretação do gênero tem sido descrita como caótica (Bird & Rice 1990). A existência de polimorfismo e de variação genética dentro de uma única espécie aumentou a confusão acerca das espécies descritas (Crichtley 1993). Entretanto, houve nos últimos anos um considerável avanço na compreensão da biologia celular das algas vermelhas, particularmente em nível estrutural, em razão do refinamento nas metodologias de fixação e infiltração de tecidos (Murray & Dixon 1992).

Segundo Pueschel (1990), as algas vermelhas possuem características celulares que as distinguem de quaisquer outros eucariotos, incluindo cloroplastos atípicos por não apresentarem organização em tilacóides empilhados e por terem grânulos de pigmentos associados nos chamados ficobilissomos, depósitos de grânulos de amido no citoplasma, padrões não usuais de associação do complexo de Golgi a outras organelas celulares, ausência completa de cílios ou flagelos, dentre outras.

O gênero *Gracilaria* tem grande importância econômica, por ser fonte de extração de ficocolóides (ágar-ágar) que apresentam uma larga aplicação industrial e biotecnológica. Estimou-se em 1989 que cerca de 5.000 toneladas de agar eram processadas a partir de 25.000 a 30.000 t de *Gracilaria* coletada

diretamente do mar no Chile, Argentina, Brasil e África do Sul, e de tanques na China, Taiwan e Ilha Hainan (Santelices & Doty 1989, Lopes 2001).

O constante aumento na demanda de mercado aliado à inexistência de manejo de cultura tem levado à diminuição das populações desta macroalga nos bancos naturais e, por isso, tem-se implementado o cultivo em tanques e mesmo em mar aberto (Chiang & Lin 1989, Oliveira & Alveal 1990, Santelices & Doty 1989). Estudos recentes revelam que o crescimento, a quantidade e a qualidade de ágar em *Gracilaria* são limitados pela quantidade de nitrogênio disponível no meio, e também pela variação das condições ambientais (Chiang & Lin 1989, Macchiavello 1994). Portanto, existe grande interesse na melhor compreensão dos mecanismos de nutrição e crescimento em *Gracilaria* (Crichtley 1993).

A macroalga *Gracilaria tenuistipitata* var. *liui* Zhang et Xia é uma linhagem originária do sul da China, a qual tem a habilidade de crescer em salinidades que podem variar de 7 a 47‰ com um ótimo de crescimento a 21‰. Esta espécie exibe uma grande tolerância a variações de temperatura e é resistente ao ataque de epífitas. Como as demais espécies do gênero, produz elevada quantidade de agarocolóides, e por isso desperta grande interesse econômico em virtude das aplicações biotecnológicas da agarose (Haglund & Pédersen 1993).

1.2. Função e biossíntese de carotenóides

Na fotossíntese, os pigmentos absorvem luz, a qual é convertida em energia química nas moléculas de ATP e NADPH, substâncias que serão empregadas na síntese de moléculas orgânicas derivadas do CO₂ incorporado. A faixa do espectro de luz que é utilizado pela fotossíntese é 400 – 700 nm, e esta região é referida como radiação fotossinteticamente ativa. Como pode ser visto na figura 1, os carotenóides absorvem em regiões espectrais complementares às das clorofilas, auxiliando assim a coleta de luz no processo fotossintético.

Os carotenóides são pigmentos naturais e ocorrem em bactérias fotossintéticas e não fotossintéticas, algas, fungos, plantas, pássaros, insetos,

crustáceos e peixes. O esqueleto dessa molécula é construído a partir de oito unidades isoprenóides C_5 . A maior parte apresenta estrutura linear C_{40} com ligações duplas conjugadas. O termo caroteno designa um carotenóide constituído somente por hidrogênio e carbono. Já a xantofila refere-se ao carotenóide que apresenta um ou mais grupos funcionais contendo oxigênio. O número de ligações duplas determina a propriedade espectral que o carotenóide terá. Geralmente absorvem luz entre a faixa de 400 a 600 nm.

Figura 1. Perfil dos espectros de absorção das clorofilas e dos carotenóides (<http://generalhorticulture.tamu.edu>).

As reações iniciais da biossíntese de carotenóides são mediadas por um precursor do isopreno C_5 , o isoprenil pirofostato (IPP). O ácido mevalônico é convertido em IPP, o qual sob isomerização terá como resultado a formação do dimetilalilpirofosfato (DMAPP). Uma molécula de IPP é condensada com uma molécula de DMAPP pela enzima preniltransferase para formar geranilpirofosfato (GPP, C_{10}). Adições subsequentes de moléculas de IPP conduzem à formação de farnesil pirofosfato (FPP, C_{15}) e, por conseguinte, geranilgeraniolpirofosfato (GGPP, C_{20}). Todos os pirofosfatos intermediários até GGPP (inclusive) também são utilizados em outras ramificações da rota de biossíntese de outros

isoprenóides. FPP é um precursor de esqualenos e esteróides, enquanto o GGPP é utilizado na síntese de fitohormônios, como as giberelinas por exemplo, e nas cadeias laterais de fitil das quinonas, como a ubiquinona e a plastoquinona.

A condensação de duas moléculas do intermediário C₂₀ GGPP produz o prefitoeno pirofostato (PPPP). Esta é a primeira reação da rota biossintética dos isoprenóides considerada exclusiva para produzir carotenos (Goodwin 1988). As reações de geração do prefitoeno e o fitoeno são catalisadas pela primeira enzima específica para os carotenóides, a fitoeno sintetase (Dogbo *et al* 1988). O fitoeno é oxidado a neurosporeno, que é um intermediário comum à maioria dos organismos carotegênicos. Nos organismos contendo carotenóides cíclicos, como as plantas, a próxima etapa é o ganho de insaturações, a começar pelo neurosporeno e terminando no licopeno, seguido da ciclização à β -caroteno. A hidroxilação do β -caroteno resulta na formação da zeaxantina. As várias posições das duplas ligações insaturadas nos anéis resultam em uma variedade de xantofilas. A figura 2 mostra a biossíntese de fitoeno e a figura 3 a biossíntese de β -caroteno (Armstrong & Hearst 1996).

Nos últimos anos várias etapas enzimáticas foram estabelecidas geneticamente e as seqüências de muitos organismos já estão disponíveis (Armstrong *et al* 1993, Hoshino *et al* 1993, Tabata *et al* 1994). Entretanto, nota-se que é difícil purificar enzimas envolvidas na biossíntese de carotenóides, pois a maior parte destas enzimas está ligada à membrana. Acredita-se que as enzimas da biossíntese dos carotenóides formam um complexo multienzimático.

Figura 2. Biossíntese do fitoeno.

Estudos de enzimas que introduzem grupos funcionais oxigenados em carotenos para produzir xantofilas, a grande maioria dos carotenóides, ainda são recentes (Armstrong & Hearst 1996).

Figura 3. Biossíntese do β -caroteno

1.3. Estresse oxidativo

Um importante componente das estratégias adaptativas é a transdução do sinal de estresse entre os meios extra e intracelulares, disparando as diversas respostas moleculares (Burdon 1996). Entretanto, tal via de sinalização é complexa, com mecanismos e natureza de fatores envolvidos bastante variáveis. Recentemente, processos de sinalização redox têm sido descritos, envolvendo diferentes moléculas redox sensíveis e espécies reativas de oxigênio (ERO) como moduladores (Suzuki *et al* 1997). De fato, efeitos de diferentes fatores de estresse ambiental convergem à uma via bioquímica comum, caracterizada por elevações na concentração celular de ERO, tais como ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o oxigênio singlete [$O_2 (^1\Delta_g)$] e o radical hidroxila ($HO^\bullet$). Este desbalanço metabólico em que a condição pró-oxidante predomina, em relação a antioxidante, é conhecido como estresse oxidativo celular. Apesar da sua função protetora contra infecção microbiana em células fagocitárias (Halliwell & Gutteridge 1999) e do seu papel enquanto moléculas sinalizadoras em diferentes processos celulares (Khan & Wilson 1995), as ERO também são conhecidas pelos seus efeitos deletérios sobre as células, em razão da sua capacidade de reagir e oxidar biomoléculas fundamentais como os lipídeos de membrana, proteínas e ácidos nucléicos, provocando alterações drásticas de suas conformações nativas e, conseqüentemente, de suas funções biológicas. Estudos recentes em mamíferos sugerem a participação de ERO como agentes efetivos no desenvolvimento de diversas patologias pulmonares, hepáticas e cardíacas, decorrentes de lipoperoxidação e alterações histopatológicas nestes tecidos (Jamal & Sprowls 1987, Salovsky *et al* 1992, Kostic *et al* 1993), bem como no desenvolvimento de porfiria e câncer (Zhong *et al* 1990, Monteiro *et al* 1991). A modulação destas espécies antioxidantes é, portanto, de grande relevância para uma resposta adaptativa para o organismo suportar condições adversas (figura 4). Altos níveis da capacidade antioxidante em células estão relacionadas ao aumento da tolerância a vários tipos de estresse ambiental (Halliwell 1987).

Figura 4. Antioxidantes e resistência ao estresse ambiental. Diferentes fatores de estresse ambiental podem promover um estado pró-oxidante celular, por meio da estimulação da produção de ERO. Nestas condições, a indução de antioxidantes é um importante mecanismo de defesa, prevenindo lesões oxidativas e consequentes danos celulares.

1.3.1. Geração de espécies reativas de oxigênio pela respiração e fotossíntese.

Os organismos aeróbios têm como principal fonte de energia a fosforilação oxidativa. Nesse processo, elétrons do NADH ou do FADH₂ são transferidos para o O₂ para gerar ATP e H₂O por meio de uma cadeia de transportadores de elétrons. A necessidade do aceptor O₂ para os elétrons é fundamental para a sobrevivência de aeróbios. Contudo, sua presença leva à formação de espécies semi-reduzidas altamente reativas causando efeitos deletérios a biomoléculas como os lipídeos de membrana, proteínas, clorofila e DNA (Halliwell & Gutteridge 1999).

Uma fonte biológica comum de produção de O₂^{•-} é a redução do O₂ por um único elétron. Neste sentido, os cloroplastos e as mitocôndrias constituem uma importante fonte geradora de ERO em organismos fotossintetizantes. Nestas organelas, a alta concentração de O₂ e o fluxo de elétrons requeridos nos

processos fotossintético e respiratório favorecem a condição pró-oxidante. Outra importante fonte de ERO em sistemas biológicos é a formação de complexos com metais de transição, uma vez que estes são eficientes catalisadores de reações redox e indutores de estresse oxidativo celular. Assim, diferentes fatores de pressão ambiental como, por exemplo, fatores que interferem na fotossíntese ou que aumentam a disponibilidade de metais para reações químicas, podem instalar um estresse secundário nos organismos, o estresse oxidativo. Nestas condições, a ativação do sistema de defesa antioxidante celular é essencial para a sobrevivência dos organismos (figura 4).

A utilização metabólica do O_2 na obtenção de energia trouxe grandes vantagens aos organismos. Na fosforilação oxidativa, o O_2 atua comoceptor final de elétrons, onde é reduzido a água, sendo esta a via metabólica responsável pela manutenção do equilíbrio energético dos seres aeróbios. Entretanto, apesar do O_2 ser essencial para a sobrevivência destes organismos, ele pode se tornar tóxico em razão da formação intracelular de bioprodutos decorrentes de seu metabolismo, as ERO. Algumas destas espécies semi-reduzidas são altamente reativas, podendo provocar sérios danos celulares, levando inclusive à letalidade. A toxicidade do O_2 provém da formação de produtos decorrentes da sua redução ou excitação a outros estados. A redução completa do O_2 à água requer quatro elétrons. Quando esta redução do O_2 se processa em passos univalentes, há a formação de intermediários reativos, entre eles o $O_2^{\bullet-}$, o H_2O_2 e o $HO^{\bullet}$, como mostra a figura 5.

Figura 5. Principais vias de redução univalente do O_2 e formação de ERO (espécies em vermelho na figura).

O O_2 apresenta dois elétrons desemparelhados com spins paralelos, requerendo uma inversão de spin quando um par de elétrons lhe é adicionado, conforme o princípio de exclusão de Pauli. Como esta inversão de spin ocorre durante um período relativamente longo, o O_2 tem maior tendência a reagir com espécies que possuem elétrons desemparelhados, do que com substratos doadores de pares de elétrons (Salin 1987). Nestas condições, forma-se o $O_2^{\bullet-}$ que também pode estar presente na forma protonada como radical hidroperoxila ($HO_2^{\bullet}$). O $O_2^{\bullet-}$ também pode ser produzido pela redução univalente do O_2 ou oxidação univalente do H_2O_2 . O $O_2^{\bullet-}$ pode ainda ser formado enzimaticamente por certas flavoproteínas desidrogenases (Freeman & Crapo 1982, Farber *et al* 1990) ou espontaneamente pela auto-oxidação de substratos como ferridoxinas, hidroquinonas, tióis e hemeproteínas reduzidas (Fridovich 1974). O H_2O_2 , assim como o $O_2^{\bullet-}$, pode agir tanto como oxidante quanto redutor, sendo a mais estável das ERO. Sua reação com substratos orgânicos não é muito eficiente, mas possui grande tendência a formar complexos com metais de transição. A mais reativa das ERO é o $HO^{\bullet}$, produto da redução univalente do H_2O_2 . Em razão de o seu alto poder oxidante, o $HO^{\bullet}$ reage com o primeiro substrato disponível, apresentando grande potencial destrutivo em sistemas biológicos (Halliwell & Gutteridge 1999).

As ERO eletronicamente excitadas podem ser geradas quando elétrons são elevados ao orbital mais alto e seu spin é invertido. Este spin antiparalelo resultante é referido como estado singlete. Quando a energia suficiente é fornecida ao O_2 , este passa do estado fundamental triplete para o estado excitado singlete - $O_2 (^1\Delta_g)$. O $O_2 (^1\Delta_g)$ pode ser formado em diferentes sistemas químicos, bioquímicos ou fotoquímicos. Em vegetais, um mecanismo muito comum de formação de $O_2 (^1\Delta_g)$ é o sistema fotossensibilizante, no qual os pigmentos vegetais absorvem um fóton e o transferem para o O_2 . Neste sistema, os pigmentos carotenóides, abundantes em folhas, frutos e flores nos vegetais, desempenham importante função antioxidante, atuando como supressores de $O_2 (^1\Delta_g)$ (Di Mascio *et al* 1995).

As membranas tilacóides são compostas por uma alta proporção de galactolipídeos (cerca de 75%) contendo ácidos graxos altamente insaturados e ausência de colesterol ou quantidades não detectáveis de esteróis (Gounaris & Barber 1983). Por isso, as membranas tilacóides são um sistema relativamente fluido, comparado com outras membranas biológicas (Havaux 1998). Nos cloroplastos, os mecanismos geradores de ERO incluem reações fotodinâmicas. Alta energia luminosa pode aumentar os níveis de moléculas excitadas como, por exemplo, clorofila triplete e $O_2 (^1\Delta_g)$. Esta última espécie é altamente eletrofílica, podendo oxidar novas moléculas. O $O_2^{\bullet-}$ também pode ser gerado pela redução do O_2 pela ferridoxina reduzida no fotossistema I (PSI), em reação conhecida como Reação de Mehler (Foyer 1996). A difusão do $O_2^{\bullet-}$ ao estroma pode levar à sua dismutação espontânea, gerando H_2O_2 e O_2 . A reação entre H_2O_2 e metais forma o potente oxidante $HO^\bullet$, causando danos moleculares. Além disso, os lipídeos da membrana do envelope do cloroplasto e dos seus tilacóides contêm uma alta porcentagem de ácidos graxos polinsaturados (PUFAs) sendo, portanto, muito susceptíveis à peroxidação. Em condições normais, esses mecanismos geradores de ERO são lentos, podendo, porém, ser acelerados sob exposição a xenobióticos ou altas intensidades luminosas.

Uma importante fonte de estresse oxidativo em sistemas biológicos é a intoxicação com metais, uma vez que estes são eficientes catalisadores de reações redox. Um dos metais mais importantes em sistemas biológicos é o Fe^{3+} , seguido do Cu^{2+} . A concentração iônica de Fe^{3+} no sangue humano é mantida em níveis baixos em razão da sua alta reatividade com O_2 e H_2O_2 . Proteínas como a transferrina, um “scavenger” de Fe^{3+} , ferritina e hemosiderina, armazenadoras de Fe^{3+} , possuem importante papel na manutenção dos níveis séricos deste metal. A formação de $\text{HO}^\bullet$ pode ocorrer pela complexação entre metais e H_2O_2 , de acordo com a Reação de Fenton (reação 1) ou pela reação entre $\text{O}_2^{\bullet-}$ e H_2O_2 , catalisada por íons metálicos (MT), conhecida como Reação de Haber-Weiss (reação 2):

A oxidação de biomoléculas também pode ser catalisada por metais. O Fe^{3+} , por exemplo, é um conhecido catalisador de peroxidação lipídica, estando diretamente envolvido tanto na iniciação quanto na propagação da lipoperoxidação. Além disso, os metais catalisam a oxidação de proteínas e DNA e podem potencializar a toxicidade de xenobióticos como o paraquat (figura 6).

Figura 6. Formação de ERO mediada por metais e paraquat.

Assim, a exposição aos metais, em razão da poluição ambiental, pode ativar diferentes mecanismos geradores de ERO e instalar um estado de estresse oxidativo celular. Nessas condições, a sobrevivência dos organismos fotossintetizantes em ambientes contaminados deve ser altamente dependente de mecanismos de defesa capazes de prevenir o insulto oxidativo nos cloroplastos.

1.3.2. Enzimas antioxidantes

Apesar da alta reatividade das ERO, estas podem ser toleradas e são utilizadas em determinados níveis pelos organismos. Diferentes substâncias exercem papel de fundamental importância na destruição espontânea e metabolização destas espécies. Os organismos apresentam uma bateria de enzimas responsáveis pelo controle dos níveis celulares das ERO (figura 7). A superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e peroxidases (POD) são responsáveis pela manutenção do equilíbrio entre produção e remoção de ERO, fundamental para a sobrevivência dos seres aeróbios.

Figura 7. Participação das enzimas responsáveis pelo controle dos níveis de ânion superóxido, peróxido de hidrogênio e peróxidos orgânicos.

A CAT é uma enzima tetramérica que possui um grupo heme ligado ao seu sítio ativo, presente na maioria dos organismos aeróbios. Nos vegetais, a CAT encontra-se predominantemente nos peroxissomos e aparentemente ausente nos

cloroplastos (Salin 1987). Assim, a remoção de H_2O_2 nestas organelas é promovida pelas peroxidases, presentes em grandes quantidades nos tecidos vegetais. Estas enzimas, além do papel antioxidante, participam de vários outros processos fisiológicos como lignificação, desenvolvimento e crescimento vegetal. A indução da atividade de peroxidases também tem sido considerada uma resposta geral a várias condições de estresse, como contaminação por metais e processos fisiológicos que envolvam H_2O_2 (Van Assche & Clijsters 1990).

Em animais, a enzima glutathione peroxidase (GPx) desempenha papel de particular importância na detoxificação de H_2O_2 . Trata-se de uma seleno-enzima que utiliza o tripeptídeo tiólico glutathione (GSH), como doador de elétrons para a redução de H_2O_2 . A glutathione oxidada (GSSG) pode ser novamente convertida à sua forma reduzida pela enzima glutathione redutase (GR), a qual utiliza elétrons do NADPH para o restabelecimento dos níveis intracelulares de GSH. Apesar da presença do substrato GSH e da enzima GR, a presença da seleno-enzima GPx em plantas é pouco freqüente (Halliwell & Gutteridge 1999).

Um outro importante mecanismo de remoção de H_2O_2 em vegetais, particularmente nos cloroplastos, é o ciclo ascorbato-glutathione. Nele, o ascorbato é peroxidado a deidroascorbato pela enzima ascorbato peroxidase (Apx) e este é novamente reduzido pela GSH. Os níveis de GSH são restabelecidos pela enzima GR. Neste ciclo, o H_2O_2 é removido pelo NADPH gerado na fotossíntese (figura 8).

Figura 8. Ciclo ascorbato-glutathione (Halliwell & Gutteridge 1999).

Recentemente, o papel da enzima SOD em organismos, submetidos a estresses ambientais, tem recebido grande atenção. A importância da SOD reside

no fato desta ser a enzima antioxidante de maior distribuição entre os organismos e por esta controlar os níveis celulares de $O_2^{\bullet-}$, que apesar de não ser uma espécie altamente reativa, tem sua toxicidade atribuída à função precursora na formação de espécies mais reativas ou citotóxicas (Fridovich 1986, Hassan 1988) (figura 9). Trata-se de uma família de metalo-enzimas, classificadas de acordo com o seu co-fator metálico. Até o momento, foram descritas cinco isoformas da enzima: as mais comumente encontradas são a FeSOD, MnSOD e a CuZnSOD. Recentemente, duas novas e distintas isoformas, NiSOD e FeZnSOD, foram descritas em fungos do gênero *Streptomyces*, o que sugere diferentes origens evolutivas para esta enzima, salientando a importância da sua função biológica (Kim *et al* 1998, Youn *et al* 1996).

Algumas fontes de $O_2^{\bullet-}$	Reação de $O_2^{\bullet-}$ com Fe^{3+} ou ER	k ($M^{-1}.s^{-1}$)
Fotossíntese	$\cdot NO \longrightarrow ONOO^{\bullet-}$	7×10^9
Respiração	$RSH \longrightarrow HO_2^- + RS^{\bullet-}$	10^3
Radiações	$O_2^{\bullet-} \longrightarrow O_2 + H_2O_2$	10^5
Xenobióticos	$Fe^{3+} \longrightarrow O_2 + Fe^{2+}$	10^6
	$H_2O_2 \xrightarrow{Fe^{2+}/Fe^{3+}} O_2 + 2(HO^{\bullet-})$	10^2

Figura 9. Ânion superóxido como mediador de danos oxidativos celulares. O $O_2^{\bullet-}$ produzido em diferentes situações pode reagir com Fe^{3+} ou com outras espécies reativas (ER), gerando espécies químicas de maior potencial citotóxico.

A SOD é encontrada em grandes quantidades nos organismos aeróbios, embora ausente ou em quantidades muito pequenas, em anaeróbios obrigatórios (Fridovich 1982). As isoformas desta enzima apresentam-se diferentemente distribuídas, conforme o compartimento celular e o organismo em questão. Em geral, as isoformas predominantes em procariontes são MnSOD e FeSOD, ambas localizadas no citoplasma, enquanto os eucariontes possuem uma MnSOD presente na matriz mitocondrial e uma CuZnSOD presente no citoplasma (Asada *et al* 1980,

De Jesus *et al* 1989). As plantas superiores geralmente contêm, além das isoformas já mencionadas, uma FeSOD presente nos cloroplastos (Kwiatowski 1987).

Por ser amplamente distribuída entre os organismos, a SOD é utilizada como um indicador bioquímico de processos biológicos envolvendo ERO, particularmente de condições de estresse oxidativo promovido por exposição à UV, xenobióticos, extremos de temperatura e luminosidade, entre outros (Perl-Treves & Galun 1991, Rijstenbil *et al* 1994, Malanga & Puntarulo 1995). Em geral, a ativação da SOD ocorre por intermédio de fatores de transcrição redox-modulados. As características bioquímicas, o papel biológico da SOD e seu substrato foram recentemente revisadas por Fridovich (1997). Apesar dos avanços nos estudos desta área, os mecanismos envolvidos na regulação da SOD ainda não foram bem esclarecidos, principalmente em organismos fotossintetizantes. Os efeitos de um estresse particular, sobre a expressão do gene para SOD, parece ser governado pelo sítio subcelular no qual o estresse oxidativo é instalado, embora não se tenha conhecimento da maneira como tal resposta seja mediada.

Desta forma, o estudo da regulação de enzimas de defesa, como a SOD, faz-se necessário para o esclarecimento dos mecanismos bioquímicos e moleculares envolvidos nas respostas adaptativas que conferem resistência aos organismos às diferentes formas de estresse ambiental, ora decorrentes dos impactos da atividade antrópica ora das variações naturais (cíclicas ou não) do ambiente.

1.3.3. Antioxidantes de baixo peso molecular

Entre as substâncias que fazem parte do sistema não-enzimático de defesa antioxidante encontram-se a vitamina C, vitamina E, carotenóides, flavonóides, bilirrubina, ácido úrico, tióis. Além destes, os compostos fenólicos, abundantes em vegetais, ajudam a atenuar danos oxidativos (Rice-Evans *et al* 1991 e 1996). A tabela 1 mostra os principais antioxidantes naturais e seus alvos principais de reação.

Outro aspecto interessante no controle dos níveis de ERO é a presença de carotenóides. Os carotenóides são os responsáveis pelo controle e supressão de moléculas eletronicamente excitadas como $O_2 (^1\Delta_g)$, por um processo chamado supressão física. Este processo envolve transferência de energia de excitação do $O_2 (^1\Delta_g)$ para carotenos, levando à formação de carotenos no estado triplete excitado. A energia de excitação é então dissipada mediante interações rotacionais e vibracionais para o solvente. Também, os polienos protegem o ataque do $O_2 (^1\Delta_g)$ sobre a clorofila, não permitindo, portanto, a fotodestruição dessa molécula. As figuras 10.1 e 10.2 mostram as estruturas químicas dos principais polienos encontrados na natureza.

Tabela 1. Principais componentes da defesa antioxidante celular de baixo peso molecular e seus respectivos alvos.

Antioxidante	Alvo
ascorbato	$O_2 (^1\Delta_g)$, $HO^\bullet$, $O_2^\bullet$, $HO_2^\bullet$
β -caroteno	$O_2 (^1\Delta_g)$, $RO_2^\bullet$
α -tocoferol	$RO_2^\bullet$, cadeia de radicais inespecífica
glutathiona	$O_2 (^1\Delta_g)$, quelante de metais
urato e metalotioneínas	$HO^\bullet$, quelante de metais
flavonóides	$O_2 (^1\Delta_g)$, $HO^\bullet$, $O_2^\bullet$, $HO_2^\bullet$

Figura 10.1. Estruturas Moleculares de Políenos.

Figura 10.2. Estruturas de alguns carotenóides comuns encontrados em algas e plantas.

Assim, os organismos dispõem de estratégias de defesa antioxidante contra desbalanços do metabolismo oxidativo. De acordo com Sies (1993), há três etapas de defesa. (i) Prevenção da formação de ERO, que inclui a quelação de íons metálicos por proteínas específicas, como as metalotioneínas em animais e peptídeos conhecidos como fitoquelatinas, nos vegetais (Grill & Winnacker 1985). Há também a prevenção da formação de ERO por radiação UV, realizada por pigmentos especializados como os carotenóides e micosporinas. (ii) Intercepção ou inativação das ERO que, uma vez formadas, podem causar danos aos componentes celulares. Nesta etapa, as ERO são transformadas em produtos finais não reativos e/ou transferidas para outros compartimentos celulares menos sensíveis à oxidação, pelos diversos componentes antioxidantes presentes nas células. (iii) A última etapa de defesa é o reparo dos danos causados pelas ERO.

1.4. Algas marinhas versus estresse oxidativo

Diversos poluentes podem ser introduzidos em ambientes costeiros mediante fontes pontuais e não pontuais, trazendo efeitos prejudiciais à biota marinha e à própria saúde humana. Os contaminantes possuem várias vias de acesso ao mar, sendo introduzidos principalmente em razão de efluentes industriais e municipais, lançados por emissários submarinos, onde diferentes produtos químicos como compostos organoclorados, bifenilas policloradas (PCB), organometálicos e metais pesados, além de um grande volume de matéria orgânica, são lançados ao mar. Como consequência do aumento gradativo da poluição ambiental, organismos marinhos, incluindo algas planctônicas, são expostos a diferentes contaminantes químicos, os quais apresentam graus variados de toxicidade. Muitos desses elementos possuem origem natural e são reciclados no ambiente pelos ciclos biogeoquímicos, tornando-se disponíveis aos organismos. Contudo, a partir da revolução industrial, novas fontes destes elementos surgiram influenciando a sua ciclagem natural e conseqüentemente a sua disponibilidade aos diferentes processos biológicos (Okamoto 2000).

Embora muitos metais sejam essenciais ao crescimento celular, metais como cádmio (Cd), mercúrio (Hg) e chumbo (Pb) não são essenciais e consistem em elementos extremamente tóxicos. Tais elementos promovem diversos efeitos prejudiciais ao fitoplâncton marinho, incluindo a inibição da síntese protéica e de pigmentos, do crescimento, da divisão celular, das taxas respiratória e fotossintética, modificações morfológicas, redução da biodiversidade e promoção de estresse oxidativo celular (Babish & Stotzky 1985, Courgeon *et al* 1984, Davies 1978, Laube *et al* 1980, Murthy & Mohanty 1991, Skinner & Tunekian 1973, Trevors *et al* 1986, VanBogelen *et al* 1987, Zhong *et al* 1990). A produção mundial de cobre (Cu), Cd, Pb, e Hg, a liberação no oceano, a concentração em águas oceânicas e a toxicidade ao fitoplâncton no ambiente marinho encontram-se descritas na Tabela 2.

Tabela 2. Produção mundial de cobre (Cu), cádmio (Cd), chumbo (Pb), e mercúrio (Hg), a liberação anual no oceano, a concentração em águas oceânicas e a toxicidade ao fitoplâncton no ambiente marinho.

Metal	Produção*	Quantidade liberada por ano no ambiente*	Concentração em Águas Oceânicas**	Concentração de Inibição ao Crescimento** ***
Hg	$1,4 \times 10^4$	7	$0,15 \times 10^{-3}$	0,0005 - 0,5
Cd	1×10^4	60	$0,11 \times 10^{-3}$	0,025 - 140
Pb	$3,5 \times 10^3$	2350	$0,03 \times 10^{-3}$	0,250 - 250
Cu	9×10^6	4500	$2,00 \times 10^{-3}$	0,01 - 6,5

Dados extraídos de Skinner & Turekian (1973) e Davies (1978).*(t/ano); **(ppm; mg.l⁻¹), ***(inibição em algumas espécies de algas).

Apesar de não serem redox ativos, metais como o Cd²⁺, Hg²⁺ e Pb²⁺ também são capazes de promover estresse oxidativo celular (Stohs & Bagchi 1995), produzindo peroxidação lipídica e danos em DNA, embora os mecanismos

envolvidos sejam indiretos. Sabe-se que estes metais possuem alta afinidade com grupos sulfidrilícos (-SH), podendo inativar enzimas que participam de passos metabólicos importantes ou complexar-se com a GSH, reduzindo a capacidade antioxidante celular (Halliwell & Gutteridge 1999). Além disto, estes metais podem competir com outros metais de importância biológica como cálcio (Ca^{2+}), alterando a sua homeostase e provocando a ativação de vários sistemas Ca^{2+} -dependentes, entre eles a ativação de endonucleases, e Fe^{3+} , alterando a sua disponibilidade a reações redox. Alguns metais pesados também são capazes de interferir no processo fotossintético, favorecendo o escoamento de elétrons ao O_2 (Asada & Takahashi 1987, Tschiersch & Ohmann 1993). Apesar dos organismos disporem de estratégias defensivas, a exposição aos metais (ou outros xenobióticos), como consequência da poluição ambiental, pode sobrepujar a defesa antioxidante e instalar o quadro de estresse oxidativo celular. Nestas condições, o controle dos níveis celulares de antioxidantes é fundamental para sobrevivência dos organismos em ambientes contaminados.

As variações ambientais decorrentes da atividade antrópica resultam, muitas vezes, em mudanças drásticas do meio, acarretando danos severos à biota (Davison & Pearson 1996). O acúmulo de metais tóxicos pelo fitoplâncton pode ser bastante aumentado pela cadeia alimentar marinha, em razão da sua rápida assimilação pelos organismos e retenção por longos períodos em seus tecidos. Assim, um dos principais problemas com relação à poluição por metais é a alta meia-vida biológica destes elementos. Nesse sentido, o fitoplâncton é provavelmente o mais importante vetor biológico de metais tóxicos, uma vez que estes organismos constituem a maior fração da biomassa de produtores primários dos oceanos e representam o primeiro ponto de entrada de poluentes na cadeia alimentar marinha. Em decorrência da exposição a estes metais, vários efeitos nocivos aos organismos têm sido documentados, incluindo alterações no metabolismo oxidativo das células, que podem significar o passo inicial para a promoção de diversos danos celulares (Vangronsveld & Clijsters 1994).

Nos ambientes aquáticos, a radiação ultravioleta, representada pelas frações UV-A e UV-B, pode penetrar a profundidades variáveis, dependendo da concentração de matéria particulada e de substâncias orgânicas dissolvidas presentes. Em regiões costeiras, a profundidade de penetração da radiação UV pode não ultrapassar 1 m, enquanto em águas claras oceânicas, pode penetrar até algumas dezenas de metros, desempenhando um papel ecológico preponderante, na medida que afeta o fluxo de nutrientes, os ciclos biogeoquímicos e a estrutura da cadeia alimentar (Häder 1996; Hessen *et al* 1997).

Em decorrência do aumento da radiação UV-B, uma ampla gama de efeitos genéticos, morfológicos, fisiológicos e bioquímicos sobre os organismos fotossintetizantes são descritos na literatura. Um dos aspectos mais estudados é a inibição da fotossíntese (Helbling *et al* 1992 e 1996, Herrmann *et al* 1996, Lesser 1996a, b, Lesser *et al* 1996, Schofield *et al* 1995), já que afeta não só a fixação de carbono dos organismos fotossintetizantes, como também todo o suprimento de carbono dos níveis tróficos superiores (Hessen *et al* 1997). Esta tem sido atribuída à inibição da atividade do fotossistema II (Schofield *et al* 1995), à diminuição da concentração de clorofila (Goes *et al* 1994, Lesser 1996a, b) e à redução dos estoques de RUBISCO (ribulose-1,5-bifosfato carboxilase), enzima-chave na incorporação do gás carbônico sob a forma orgânica (Lesser 1996a e 1996b). O declínio das taxas fotossintéticas associa-se também a uma redução dos estoques de carboidratos solúveis das células do fitoplâncton (Goes *et al* 1996). Além disso, a exposição do fitoplâncton à radiação UV acarreta inúmeros efeitos sobre diferentes respostas biológicas, os quais resultam, em grande parte, do aumento da geração de espécies ERO nas células (Malanga & Puntarulo 1995, Lesser 1996b).

Como já mencionado anteriormente, os dinoflagelados são algas unicelulares que habitam os ambientes marinho e de água doce. Cerca de metade das espécies de dinoflagelados é fotossintetizante, enquanto a outra metade é composta por espécies heterotróficas ou parasitas. Desta forma, estes organismos

possuem grande importância ecológica, pois atuam como produtores primários e consumidores na cadeia trófica aquática. Além disto, muitas espécies são simbiontes, como as do gênero *Symbiodinium*, sendo responsáveis pela atividade fotossintética necessária ao desenvolvimento de corais. Dinoflagelados são também economicamente importantes por produzirem neurotoxinas, cujos efeitos prejudiciais são potencializados durante eventos de marés vermelhas (figura 11) (Levin 1992).

Figura 11. Maré vermelha e estrutura molecular da saxitoxina, responsável pelo envenenamento de peixes e humanos (<http://www.enviroliteracy.org>).

Muitos dinoflagelados apresentam reprodução tanto assexuada quanto sexuada. No gênero *Lingulodinium*, a reprodução sexuada leva à formação de um cisto (hipnozigoto). Cistos também são formados assexuadamente. Sabe-se que diferentes fatores como luz (fotoperíodo), temperatura, densidade celular e carência nutricional são capazes de induzir a formação destes cistos assexuais em *Lingulodinium* (Anderson *et al* 1984). O encistamento em dinoflagelados desempenha importante papel na dispersão e sobrevivência destas algas sob condições ambientais desfavoráveis estando, provavelmente, relacionado ao fenômeno das marés vermelhas (Steidinger 1993, White & Lewis 1982). Quando expostos a metais poluentes (Cu^{2+} , Cd^{2+} , Hg^{2+} e Pb^{2+}), *L. polyedrum* forma cistos sugerindo assim que a sobrevivência dos mesmos às altas concentrações de metais pode ser devida à sua formação (Okamoto & Colepicolo 1998). Os metais pesados afetam o metabolismo das ERO em algas. Por exemplo, podem aumentar os níveis de oxidação de proteína e lipídeos, os níveis de β -caroteno e da atividade de SOD e Apx, além de uma diminuição dos níveis de GSH em *L. polyedrum*. Em outras espécies de algas, como a prasinophyceae *Tetraselmis*

gracilis, os metais pesados podem aumentar a atividade de SOD. Na diatomácea *Ditylum brightwellii* e na alga unicelular verde *Selenastrum capricornutum* a atividade de Apx também pode aumentar. E foi observado uma diminuição na relação redox de glutathione na macroalga verde *Enteromorpha prolifera* e na macrophyta *Ceratophyllum demersum* (Devi & Prasad 1998, Rijstenbil *et al* 1994 e 1998).

2. OBJETIVOS E JUSTIFICATIVAS

Em razão do papel fundamental dos carotenóides na proteção da integridade física e na organização das membranas dos cloroplastos, planejou-se abordar os seguintes aspectos neste trabalho:

(i) Atividade antioxidante *in vitro* de alguns carotenóides algais, com a realização de experimentos visando-se determinar a constante de supressão de O_2 ($^1\Delta_g$) da peridina isolada de *Lingulodinium polyedrum* e o grau de proteção da peridina e astaxantina em lipossomos de fosfatidilcolina.

(ii) Biossíntese de carotenóides em algas cultivadas sob estresse ambiental, causado por exposição a metais pesados (*Gracilaria tenuistipitata* e *Lingulodinium polyedrum*), alta densidade populacional (*Amphidinium carterae* e *Nitzschia microcephala*), limitação por luz e nutrientes (*Lingulodinium polyedrum*, *Minutocellus polymorphus* e *Tetraselmis gracilis*).

(iii) Biossíntese de carotenóides em algas cultivadas sob regimes cíclicos de luz (*Lingulodinium polyedrum*).

Nas algas expostas aos diferentes fatores de estresse ambiental, analisamos ainda:

(iv) a interconvertibilidade de tiamina (*Amphidinium carterae* e *Nitzschia microcephala*).

(v) Atividade de SOD (*Lingulodinium polyedrum*, *Minutocellus polymorphus* e *Tetraselmis gracilis*, *Amphidinium carterae* e *Nitzschia microcephala*), atividade de CAT, Apx, conteúdo de MDA e tióis (*Amphidinium carterae* e *Nitzschia microcephala*).

(vi) Níveis de ácidos graxos e atividade de SOD, CAT, Apx, conteúdo de MDA e carbonilas de proteínas para *Gracilaria tenuistipitata* cultivada na presença de metais.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Cultivo das algas

As culturas unialgais (não axênicas) de microalgas utilizadas para os estudos foram *Lingulodinium polyedrum* (Stein) Dodge (*Gonyaulacales*, *Chromophyta*), *Tetraselmis gracilis* (Kyllin) Butcher (*Chlorodendrales*, *Chlorophyta*), *Minutocellus polymorphus* (Hargraves & Guillard) Hasle, von Stosch & Syvertsen (*Cymatosirales*, *Chromophyta*), *Amphidinium carterae* Hulburt (*Gymnodiniales*, *Chromophyta*) e *Nitzschia microcephala* Gran. (*Bacillariales*, *Chromophyta*). As culturas foram mantidas em laboratório, em frascos Fernbach contendo 1,5 L de meio de cultura f/2 (Guillard & Ryther 1962) omitindo o silicato, em incubadoras (Precision Scientific, modelo 818) com ciclos de 12hs de luz:12hs de escuro, alternados. A temperatura foi ajustada para 19 ± 2 °C e a irradiância durante o período diurno (claro) foi de $120 \mu\text{mol.fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ medida por um quantameter (Biophysical Instruments Inc., modelo QSL-100, sensor esférico). As condições de cultivo para a macroalga *Gracilaria tenuistipitata* Chang et Xia (*Gracilariales*, *Rhodophyta*) estão descritas no item 3.7.

Todos os experimentos foram realizados na fase exponencial de crescimento das algas, exceto quando especificado.

3.2. Isolamento dos carotenóides presentes em *Lingulodinium polyedrum*.

Todos os procedimentos foram realizados ao abrigo da luz e com a temperatura controlada (0°C). Um volume de aproximadamente 25 L de cultura celular em fase exponencial de crescimento foi centrifugado a 11500 g. Testes iniciais com DCM não foram eficientes para extrair os carotenóides. Ao precipitado

contendo as células, adicionou-se MeOH e extraíram-se os pigmentos em ultrassom por 15 min, mantendo-se a temperatura do banho em torno de 10 °C. Após a extração, os tubos foram centrifugados (11500 g a 10 °C), o sobrenadante foi recolhido, e aos precipitados adicionou-se MeOH e repetiu-se a extração com ultrassom até que não houvesse mais pigmentos (Hitachi, λ de 445 e 660 nm). Os sobrenadantes foram concentrados em rotaevaporador a temperatura ambiente. O extrato metanólico bruto seco foi denominado EMeOH e possuía massa de 450 mg.

O EMeOH foi ressuspenso em MeOH e aplicado em quatro alíquotas no Cromatotron, que é um aparelho que usa uma placa circular de sílica gel (1 mm de espessura), a qual gira durante a eluição em atmosfera de N₂. As amostras são aplicadas próximo ao centro da placa e, por aceleração centrípeta e eluição do solvente, ocorre a separação. O eluente é bombeado para a placa através de uma bomba peristáltica. O sistema de solventes utilizado foi um gradiente de 200 mL de Hexano/Acetona 8:2, 200 mL de Hexano/Acetona 7:3, 100 mL de AcOEt 100% e 100mL de MeOH 90%. As frações foram coletadas segundo absorção no visível.

Para cada alíquota foram coletadas quatorze frações. As que apresentavam manchas únicas e R_fs iguais em TLC (Hexano/Acetona 7:3) foram reunidas e denominadas do seguinte modo: TR-01 (2 mg); TR-05 apresentou duas manchas amarelas distintas (25 mg); TR-07 (20 mg) e TR-12 (2 mg). As demais frações apresentavam massa acima de 5 mg, mas estavam em mistura com clorofila.

3.2.1. Determinação estrutural

Todas as frações foram analisadas por RMN de ¹H e IV e apenas TR-07 e TR-01 foram analisadas por espectrometria de massa Electrospray. Após a interpretação dos espectros, concluiu-se que a fração TR-07 correspondia a peridininina e TR-01 ao β -caroteno. Não foi possível a determinação estrutural das outras frações em razão da baixa massa.

3.3. Análise quantitativa dos carotenóides em extratos de *Lingulodinium polyedrum* por HPLC.

O carotenóide bixina, que ocorre em plantas da espécie *Bixa orellana*, foi utilizado como padrão interno (PI). Tanto no preparo das curvas de calibração, quanto nas análises das amostras, houve a adição de PI.

Os solventes utilizados como fase móvel foram MeOH, AcOEt e H₂O. O gradiente que se mostrou mais adequado está apresentado na Tabela 3. O fluxo foi de 1,0 mL/min e o λ foi de 445 nm. A coluna utilizada foi a Hibar RP-18, 250 x 4 mm, partícula de 5 μ m (Merck®).

Tabela 3: Programa de eluição para os carotenóides A = Água, B = MeOH, C = AcOEt

Tempo (min)	A (%)	B (%)	C (%)
0	18	52	30
10	12	33	55
15	12	33	55
23	6	19	75
30	6	19	75

As etapas que se seguem descrevem a metodologia empregada para a análise do extrato bruto: (i) Filtraram-se aproximadamente 300 mL de cultura densa (10^5 a 10^6 células/mL) em papel de filtro Whatman nº 4. (ii) As células foram raspadas cuidadosamente e transferidas para eppendorfs previamente pesados. (iii) Os eppendorfs contendo as células foram congelados rapidamente em N₂ líquido. (iv) As células foram liofilizadas em Speed Vac® e, logo após, obteve-se o peso seco. (v) Uma solução estoque de bixina foi preparada na concentração de 4 mM para ser usada como PI. (vi) Adicionou-se um volume da solução estoque de PI (256 μ M). A concentração do extrato bruto (EB) foi de 3mg/mL. (vii) Os frascos contendo a solução com as células foram deixados no ultra-som por 10 min. (viii) A solução foi então filtrada usando membrana 0,22 μ m (Millipore®). (ix) A

solução foi transferida para um frasco com tampa de teflon, especial para injetores automáticos de HPLC. O volume injetado foi de 15 μL . Deste modo, a concentração de bixina permaneceu invariável a 256 μM .

Foram determinadas as curvas para se dosar peridinina, β -caroteno, e clorofila-*a*. As análises foram feitas em HPLC usando-se o gradiente mencionado na Tabela 3. Para se determinar a curva padrão, empregaram-se concentrações crescentes dos pigmentos mencionados e a mesma concentração de bixina (256 μM). A curva foi determinada dividindo-se a área do pico do pigmento pela área do pico da bixina em função da concentração do pigmento. As equações de retas obtidas foram usadas para se dosar os pigmentos.

3.4. Atividade antioxidante dos carotenóides:

3.4.1. Determinação da constante de supressão de O_2 ($^1\Delta_g$).

As soluções dos carotenóides foram preparadas usando CHCl_3 como solvente. O sensibilizador usado foi a perinaftenona. Empregou-se também, um outro sistema de solvente e sensibilizador para a peridinina, $\text{D}_2\text{O}/\text{CD}_3\text{COCD}_3$ 1:1 e azul de metileno, respectivamente. A técnica escolhida foi a geração de O_2 ($^1\Delta_g$) por sensibilizador pela emissão de laser no infravermelho próximo por tempo resolvido ("Time-resolved NIR-emission of singlet molecular oxygen generated by photosensitizer").

As concentrações usadas foram 1 mM para bixina e peridinina e 0,1 mM para β -caroteno e licopeno. Os experimentos foram realizados em colaboração com o Prof. Dr. Luis Henrique Catalani, do Departamento de Química Fundamental do Instituto de Química - USP, Disciplina de Química Orgânica e do Prof. Dr. Paolo Di Mascio, do Departamento de Bioquímica do Instituto de Química - USP.

O sensibilizador, no caso a perinaftenona em CHCl_3 , ao ser excitada pelo laser, passa ao estado tripleto. Nesta forma ela transfere para o O_2 (que está

adsorvido no solvente) esta energia transformando-o em singlete. Este ou decai naturalmente para O_2 ou é suprimido por um supressor, no caso os carotenóides usados como mostra o esquema 1.

Esquema 1. (a) e (b) Excitação do sensibilizador por laser e transformação de O_2 ($^3\Sigma_g^-$) em O_2 ($^1\Delta_g$) por transferência. (c) e (d) Emissão de luz ($\lambda=1270$ nm) no decaimento de O_2 ($^1\Delta_g$) a O_2 ($^3\Sigma_g^-$). (e) O_2 ($^1\Delta_g$) sendo suprimido por carotenóides. (f) Oxidação química do supressor.

O aparelho utilizado para gerar o laser foi um Q-switched Nd-YAG laser (Spectron Laser System; $\lambda_{em}=355$ nm; 6ns de FWHM; 60 mJ/pulso). A emissão de O_2 ($^1\Delta_g$) a 1270 nm foi medida por meio de um Ge-fotodiodo (EG&G Judson Model J16D-M204-R05M-60, CA, USA) refrigerado com N_2 líquido, com um filtro de banda Spectrogon BP-1270-080-S. O sinal, detectado em ângulo reto, foi amplificado pelo aparelho EG&G Judson Model PA-9-60 e enviado para um digitalizador HP Modelo 54510B conectado a um microcomputador.

O experimento foi realizado adicionando-se um volume fixo das soluções dos carotenóides em uma cubeta contendo uma solução de perinaftenona 500 μM .

Primeiro, um pulso de laser era aplicado a uma solução de perinaftenona sem a adição de carotenóide. Com isso, determinava-se o decaimento do $O_2 (^1\Delta_g)$ em $CHCl_3$. E então, adicionava-se sucessivamente um volume fixo de carotenóide e aplicava-se um pulso de laser. O decaimento em cada adição era armazenado e a curva exponencial formada fornecia o τ , que é o inverso do tempo de decaimento. Foram determinadas retas plotando τ vs concentração de carotenóides. Os coeficientes angulares das retas formadas forneceram os K_q s para cada carotenóide.

Para se determinar a K_q da peridinina em mais um sistema usou-se uma solução de azul de metileno 100 μM em D_2O/CD_3COCD_3 1:1 e uma solução de peridinina 1mM na mesma mistura de solvente.

3.4.2. Avaliação da inibição da peroxidação lipídica em lipossomos.

Estes experimentos foram realizados em colaboração com o Dr. Marcelo Paes de Barros durante o período de treinamento na Universidade de Estocolmo – Suécia.

3.4.2.1 Preparo de lipossomos multilamelares (FCL):

Para evitar a formação de agregados e perda de material durante o processo, as soluções com os carotenóides foram preparadas no mesmo solvente que a fosfatidilcolina (clorofórmio, $CHCl_3$) e suas concentrações foram ajustadas usando-se o coeficiente de absorvidade molar de cada molécula (Dawson *et al* 1986).

Uma alíquota de 500 μL de uma solução de fosfatidilcolina (100 mg/mL) em $CHCl_3$ foi adicionada em um tubo de ensaio junto com uma quantidade das soluções de carotenóides, obedecendo à proporção 0,5% carotenóides:lecitina (25 μM e 5 mM, respectivamente). A fosfatidilcolina extraída de gema de ovo foi escolhida por apresentar insaturações que são alvos preferíveis para ERO como $HO^\bullet$ ou $O_2 (^1\Delta_g)$ (Truscott 1990). Após breve agitação, o $CHCl_3$ foi evaporado sob fluxo de N_2 em um rota-evaporador, com velocidade baixa, para permitir que se

formasse um filme uniforme nas paredes do tubo. Os tubos de ensaio contendo esses filmes foram mantidos por 12 horas no escuro, sob vácuo, para garantir a eliminação de traços de CHCl_3 . As vesículas de FCL foram preparadas adicionando-se tampão fosfato 100 mM, pH = 7.4, sobre o filme, seguido de homogenização usando-se Vortex por 5 min. Para evitar a formação de agregados, as vesículas foram preparadas a 40 °C, temperatura a qual é bem acima da temperatura de transição para a fosfatidilcolina de gema de ovo (-10 ± 5 °C) (Phospholipids Handbook 1993). A suspensão foi ainda centrifugada a 15000 rpm por 20 min. para eliminar agregados residuais .

3.4.2.2 *Preparo de lipossomos multilamelares incorporados com Fe^{2+} (Fe-FCL):*

Para se preparar os lipossomos com ferro incorporado, os filmes com os carotenóides foram misturados com 5 mL de uma solução contendo tampão fosfato (pH=7,4) 100 mM e Fe^{2+} :EDTA 5 mM (para uma concentração final de Fe^{2+} de 0,1 mM), seguido de homogenização por Vortex. O procedimento foi exatamente o mesmo para os lipossomos preparados livres de metais. Para eliminar complexos de ferro ligados externamente ou livres em solução, uma diálise foi incluída. Cerca de 5 mL da solução de lipossomos foi dialisada em membrana para diálise (Spectra/Por, MWCO 2000), à temperatura ambiente, com 2 L de água destilada por 2 h, sob agitação magnética lenta. A concentração de ferro foi verificada antes e depois do processo de diálise para estimar a perda de complexos de ferro durante o processo.

3.4.2.3 *Indução da peroxidação lipídica.*

As vesículas FCL e Fe-FCL, que continham concentrações significativas de lipídios insaturados (Bondia-Martinez *et al* 1998), foram oxidadas por meio de incubação por 45 min à 30 °C com soluções de concentração 1 mM de diferentes iniciadores: H_2O_2 , *t*-ButOOH ou ácido ascórbico. Para estimular a peroxidação lipídica em FCL, uma solução contendo Fe^{2+} :EDTA foi simultaneamente

adicionada. Trolox (0,5 mM em tampão fosfato pH 7,4) e butilhidroxitolueno (BHT) 5 μ M foram usados como controle. Trolox, um derivado hidrossolúvel do α -tocoferol com atividade semelhante (Guo & Packer 2000), foi usado como sonda para verificar os sítios de geração de ERO nas vesículas multilamelares, pois, em razão de seu caráter hidrofílico, não é esperado que atravesse a bicamada lipídica (figura 12).

Figura 12. Esquema ilustrativo da atividade antioxidante do Trolox contra ERO produzidas por H_2O_2 , $t\text{-ButOOH}$ e ascorbato em FCL e Fe-FCL em membranas unilamelares.

3.4.2.4. Medidas da extensão da lipoperoxidação (teste TBARS).

Após o período de incubação, a reação oxidativa foi interrompida adicionando-se 20 μ L de BHT (4% em EtOH). Para produzir adutos coloridos detectáveis a 535 nm, 350 μ L da amostra foram incubados com 700 μ L de ácido tiobarbitúrico (TBA) 0,375% em HCl 0,25 M e Triton X-100 1% por 15 min, à 100 $^{\circ}$ C. Depois de alcançada a temperatura ambiente, as soluções foram analisadas

em um espectrofotômetro Hitachi (535 nm). Controles para detectar a absorção residual dos carotenóides foram realizados a 535 nm em HCl 0,25 M mais uma solução de Triton X-100 1% sem TBA.

3.4.2.5. Dosagem de Fe^{2+} .

O ferro incorporado nos lipossomos foi verificado antes e depois do procedimento de diálise por um método ligeiramente modificado, descrito por Bralet *et al* (1992). Aliquotas de 300 μ L foram tomadas das suspensões com lipossomos e 3 μ L de Triton X-100 foram adicionados para romper as vesículas. Foram também adicionados às amostras, tampão glicina (50 mM, pH = 2,5) contendo ascorbato na concentração 20 mg/mL, pepsina 10 mg/mL e 2,2'-bipiridina 5 mM. Logo após a incubação por 2 h à 37 °C, a absorbância foi medida a 520 nm e os resultados foram comparados a uma curva padrão de $FeSO_4 \cdot 7H_2O$.

3.4.3. Análise estatística.

Todos os dados apresentados são médias $\pm$ desvio padrão e as análises estatísticas foram determinadas pelo teste "t-Student" com nível de significância de 5%.

3.5. Biossíntese de carotenóides durante a curva de crescimento de algumas microalgas.

A Dra. Teresa C. Sigaud-Kutner, aluna de pós-doutorado do laboratório do Prof. Pío Colepicolo, colaborou na elaboração e nas análises desenvolvidas nestes experimentos.

Culturas de *L. polyedrum*, *Minutocellus polymorphus* e *Tetraselmis gracilis* foram iniciadas em meio f/2 (Guillard 1975) com 10^3 cels/ml, 10^5 cels/ml e 10^4 cels/ml, respectivamente, a partir de culturas estoques. Várias gerações dessas células foram transferidas semanalmente para um novo meio com o objetivo de se obter inóculos em bom estado fisiológico. Durante o experimento as células foram acompanhadas por 21 dias (*L. polyedrum*) ou 24 dias (*M. polymorphus* e *T. gracilis*), com triplicatas para cada tempo experimental. Os frascos foram

incubados a 19 ± 2 °C, $120 \mu\text{mol.fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, sob um regime luz:escuro de 12:12 horas (LE), sendo agitados e trocados de lugar na incubadora em cada dia experimental. Foi feito um rodizio dos frascos para padronização das condições abióticas.

Considerando o começo do período de luz como tempo zero (LE 0), as amostras foram coletadas entre o LE 4-9 para todas as espécies, em cada dia experimental. Duas alíquotas das culturas de volumes iguais a 195 mL ou 395 mL (dias 0 e 3 do experimento: 195 mL e dias 7, 10, 14, 17, 21 e 24: 395 mL) foram destinadas para ensaios de SOD e pigmentos fotossintéticos. As amostras foram filtradas em papel de filtro Whatman 541 (*L. polyedrum*) ou centrifugadas a 13000 g, por 20 min, a 20 °C (*M. polymorphus* e *T. gracilis*). Os filtros e os precipitados foram imediatamente congelados em N₂ líquido e estocados a -80 °C até as análises.

3.5.1. Análise dos pigmentos por HPLC.

As células coletadas segundo o procedimento 3.5 foram submetidas a análises por HPLC para se determinar a variação da biossíntese de carotenóides. As amostras foram quantificadas de acordo com o método descrito no item 3.3 para todas as espécies estudadas.

3.5.2. Atividade enzimática de SOD.

Simultaneamente, as amostras coletadas também foram preparadas para análise da atividade de SOD. Para algumas espécies foram necessários procedimentos diferentes que se mostraram mais eficientes. As células de *L. polyedrum* e *M. polymorphus* foram trituradas em N₂ líquido em 1 mL de tampão fosfato (0,1 M, pH = 7.4). As células de *T. gracilis* foram rompidas por uma bomba de nitrogênio em 1,5 mL de tampão fosfato (0,1 M, pH = 7.4), sob 2000 psi, durante 20 min, a 4 °C. Os extratos brutos foram centrifugados a 4 °C, a 13000 g por 15 min e o sobrenadante foi usado para as análises. A atividade de SOD total foi detectada indiretamente pela inibição da redução do citocromo c (cít c) (McCord & Fridovich 1968). Nesse método, SOD compete com o cit c pelo O₂⁻ gerado pelo

sistema hipoxantina/xantina oxidase. O ensaio foi determinado usando-se várias quantidades do sobrenadante, e a redução do cit c foi seguida a 550 nm por 60 seg. A unidade de atividade de SOD é definida como a quantidade que causa 50% da inibição na redução a 25 °C. Os resultados foram expressos por mg de proteína, que foi determinada pelo método de Bradford (1976).

3.5.3. Análise estatística.

Todos os dados apresentados são médias $\pm$ desvio padrão. As análises estatísticas foram determinadas pelo teste “t-Student” com nível de significância de 5%, complementados pelo teste de Tukey de comparação múltipla.

3.6. Efeito do aumento da densidade celular sobre a biossíntese de carotenóides em culturas de *Amphidinium carterae* e *Nitzschia microcephala*.

Estes experimentos foram desenvolvidos durante treinamento na Universidade de Uppasala – Suécia, com a colaboração da Dra. Pauli Snoeijs. *Amphidinium carterae* (dinoflagelado) e *Nitzschia microcephala* (diatomácea) foram cultivadas em meio f/2. No dia 0 do experimento, erlenmeyers foram preparados, com as seguintes concentrações: 10^2 , 10^3 ou 10^4 células/mL. Quinze réplicas foram preparadas para cada densidade de células e para cada espécie. Foram então usados 90 frascos no experimento. Os frascos foram incubados a 20 °C, irradiância de $120 \mu\text{mol.fótons.m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, sob um regime luz:escuro (12hs:12hs). Os frascos foram agitados e trocados de lugar na incubadora em cada dia experimental. Três frascos de cada densidade celular, de cada espécie, foram coletados nos dias 0, 2, 4, 6 e 8, no período compreendido entre 4-6 hs do ciclo de luz. Para as análises de pigmentos e tiamina foram filtrados em papel de filtro Whatman GF/F 40 mL das culturas e para a determinação de SOD e grupos tióis de proteínas foram centrifugados 10 mL, a 10 °C, a 4000 rpm por 10 min. Os filtros e os precipitados foram imediatamente congelados em N₂ líquido e estocados a -80 °C até as análises. Volumes equivalentes a 10 mL das culturas foram fixados com lugol e as células foram contadas em câmaras hematocitométricas.

3.6.1. *Análise dos pigmentos por HPLC.*

Para a análise dos pigmentos do experimento sobre o efeito de sombreamento, foi utilizado o método descrito por Jeffrey com algumas modificações (Jeffrey *et al* 1997). Os filtros foram sonicados por 1 min em MeOH gelado e centrifugados a 3000 rpm, a 4°C por 4 min, usando o método de Wright & Shearer (1984). A solução final consistiu de 800 mL do extrato e 200 mL de NH₄Ac. Antes das análises, as soluções foram filtradas em membrana 0,22 µm (Millipore). Foi usada uma coluna de fase reversa Spherisorb 5 ODS, 250 x 4,60 mm, 5 µm, Phenomenex. O gradiente utilizado foi (tempo, %A - MeOH, %B - ACN/NH₄Ac 8:2, %C - AcOEt): (0 min, 100, 0, 0), (2 min, 0, 100, 0), (17 min, 0, 20, 80), (18,5 min, 0, 20, 80), (22 min, 0, 100, 0), (24 min, 100, 0, 0), (30 min, 100, 0, 0). O fluxo foi de 1 mL/min e o volume injetado foi de 100 µL. As curvas de calibração para os pigmentos foram preparadas nas mesmas condições das amostras.

Os detalhes das condições cromatográficas usadas no experimento do efeito do sombreamento seguem abaixo. O aparelho utilizado para as análises dos carotenóides foi um HPLC Milton Roy™ equipado com um detector UV-VIS (spectroMonitor 3100), acoplado a um sistema múltiplo de solventes (Milton Roy™ CM 4000). Para as análises dos cromatogramas foi usado o software Chrom-card™ (versão 1.21 para Windows) com comprimento de onda fixo em 445nm.

3.6.2. *Análise de tiamina e de seus ésteres fosfatos por HPLC.*

O meio f/2 usado para o cultivo das duas espécies apresentava tiamina livre em sua composição na concentração de 0,3 nM. Para se avaliar a captação e interconversão de tiamina e seus ésteres fosfatos em culturas, seguiu-se o seguinte procedimento. As culturas foram coletadas em filtros Whatman™ GF/F. Os filtros com as algas foram sonicados por 2 min com 2 mL de 0,1 M HCl. Os extratos foram centrifugados a 11000 rpm, a 10 °C por 10 min. Em 600 µL de sobrenadante, 50 µL de K₄Fe(CN)₆ (30 mM), 300 µL de NaOH (1 M) e 550 µL de MeOH foram adicionados consecutivamente. As amostras foram vigorosamente

agitadas e filtradas em membrana 0,22 µm Millipore e injetadas para análise em HPLC.

Foi usado um sistema de HPLC Merck L-7250, com injetor automático e resfriador de amostras (ajustado para 4 °C durante as análises). Empregou-se um detector de fluorescência Jasco, modelo 821-FP. O volume injetado foi de 100 µL. O software e a interface usados foram Merck D7000 e HSM-LaChrom D-7000, respectivamente. O detector foi ajustado a 375 nm de excitação e 450 nm de emissão, com ganho X1000. O fluxo foi de 1 mL/min e a fase móvel foi MeOH e tampão fosfato 100 mM, pH 7.4, na proporção de 43:57 v/v. A coluna utilizada foi uma Corricon, Reprosil-Pur NH₂ (5 µm, 250 mm x 4.6 mm D.I.), protegida por uma pré-coluna com a mesma fase.

3.6.3. Atividade enzimática de SOD.

Como parâmetro de estresse oxidativo foi determinada a atividade de SOD nas culturas sob o efeito de sombreamento. Após a centrifugação das culturas, os precipitados de *A. carterae* e *N. microcephala* foram sonicados por 2 min, com banho de gelo, com 1 mL de tampão fosfato (0,1 M, pH = 7.4). A determinação da atividade enzimática foi realizada de acordo com a descrição do item 3.5.2.

3.6.4. Medidas dos níveis de tióis de proteínas.

Os grupos tióis foram medidos segundo o método descrito por Murphy & Kehrer (1989) usando glutathiona reduzida como padrão. A concentração de grupos tióis de proteínas (-SH) foi usado como medida de estresse oxidativo: quanto mais intenso o estresse oxidativo maior serão os níveis de tióis oxidados e menor a concentração de grupos tióis nas células.

3.6.5. Análises estatísticas.

Os testes "t-Student" e ANOVA foram usados para análise de variância para determinar as diferenças entre as amostras com nível de significância de 95%.

3.7. Biossíntese de carotenóides em culturas de Lingulodinium polyedrum expostas a Hg^{2+} , Pb^{2+} , Cd^{2+} e Cu^{2+} .

Culturas de *L. polyedrum* foram expostas a sais de $HgCl_2$, $CdCl_2$, $Pb(NO_3)_2$ e $CuCl_2$ conforme descrito em Okamoto *et al* (2001). Os tratamentos foram crônicos e agudos. No modelo crônico as concentrações desses sais no tempo zero na cultura foram de 5 ppb Hg^{2+} , 0,5 ppm Cd^{2+} , 2,0 ppm Pb^{2+} e 0,1 ppm Cu^{2+} . As células permaneceram 30 dias nestas condições. Já no modelo agudo, as concentrações iniciais foram de 10 ppb Hg^{2+} , 1,0 ppm Cd^{2+} , 5,0 ppm Pb^{2+} e 0,25 ppm Cu^{2+} por e o período de permanência das células, 48 hs.

As amostras foram coletadas por centrifugação e imediatamente extraídas em MeOH, em banho de gelo e sob sonicação por 10 min. As análises em HPLC foram conduzidas conforme descrito no item 3.3.

3.7.1. Análises estatísticas.

As diferenças significantes estatisticamente entre os tratamentos foram determinadas pela análise de variância (ANOVA) dos dados complementados pelo teste de Dunnet. Todas conclusões foram baseadas com nível de significância de 95%.

3.8. Efeitos de Cd^{2+} e Cu^{2+} sobre o sistema antioxidante de Gracilaria tenuistipitata.

O planejamento e as análises das atividades enzimáticas aqui apresentadas tiveram a colaboração do Dr. Jonas Cólén, aluno de pós-doutorado do laboratório do Prof. Pio Colepicolo.

A alga *Gracilaria tenuistipitata* foi cultivada segundo Haglund *et al* (1996) (meio Provasoli (1968) com algumas modificações), sob uma intensidade de 125 $\mu\text{mol f\acute{o}tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, a 20 °C em água do mar diluída para 20 ppt com água destilada, aerada, sob um regime de luz:escuro (12hs:12hs). Nenhum nutriente foi adicionado durante o experimento e o meio foi trocado até o início do mesmo. Os metais pesados foram adicionados em soluções de $CdCl_2$ e $CuSO_4.5H_2O$. Durante

os experimentos as condições foram idênticas, exceto os níveis de luz; duas irradiâncias foram usadas, 40 e 250 $\mu\text{mol.fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. A densidade inicial das algas nos experimentos, expressa como peso fresco (PF), foi 1 g/L. O crescimento foi medido como aumento de PF após secagem com papel toalha. A taxa de crescimento foi similar após dois e quatro dias de cultivo. As coletas foram feitas três horas após o início do período da luz. As amostras foram congeladas em N₂ líquido e armazenadas a -80 °C até as análises. A duração do experimento foi de 4 dias tanto para o controle quanto para as amostras.

3.8.1. Análise dos pigmentos por HPLC

A extração foi conduzida com dimetilformamida (DMF) na proporção de 200 mg PF/mL em ultrassom de banho por 10 min. Após a filtração usando filtros Millipore 0,45 μm , as amostras estavam prontas para análise por HPLC (método de análise para os pigmentos contidos em *G. tenuistipitata* realizado conforme descrito no item 3.3). Também foi construída uma curva padrão de luteína para que este pigmento pudesse ser quantificado nos extratos brutos.

3.8.2. Medida dos níveis de compostos reativos ao ácido tiobarbitúrico (TBARs)

A peroxidação lipídica foi estudada por meio dos níveis dos compostos reativos ao ácido tiobarbitúrico (TBARs), o qual foi analisado de acordo com Salama & Pearce (1993). Cerca de 200 mg de *G. tenuistipitata* do controle e tratadas com metais foram pesados e triturados em N₂ líquido, misturados com 1 mL de ácido tricloroacético 20% e com ácido tiobarbitúrico 0,2%, incubados por 30 min em água em ebulição. Após esse procedimento, o homogenado foi diluído para 10 mL e medido a 532 nm. O coeficiente de extinção usado foi de 150 $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

3.8.3. Medidas dos níveis de carbonilas de proteínas

Os danos às proteínas foram medidos de acordo com Rice-Evans *et al* (1991), através das medidas de grupos carbonilas. As amostras foram trituradas em N₂ líquido e extraídas com tampão fosfato 50 mM (pH = 7,0) contendo Triton X-100 0,25% e centrifugadas a 16.000g por 5 min a 4 °C. Os extratos foram incubados em uma solução 10 mM de 2,4-dinitrofenilhidrazina por 60 min à temperatura ambiente. As proteínas foram precipitadas com ácido tricloroacético e o precipitado formado, após centrifugação, foi lavado duas vezes com etanol:acetato de etila (1:1), e depois dissolvido em uma solução de guanidina 6M. Os níveis de carbonilas foram determinados a 370 nm ($\epsilon = 22 \text{ mM.cm}^{-1}$).

3.8.4. Medidas dos níveis de ácidos graxos

Os ácidos graxos foram quantificados por cromatografia gasosa por transesterificação do extrato metanólico bruto a quente (Liu 1994). Para as análises, a alga *Gracilaria* foi inicialmente liofilizada e pesada. Logo após, 3 mL de uma mistura hexano/cloreto de acetila (1:1) foram adicionados ao material liofilizado. Essa mistura foi aquecida a 90°C por 2 horas. Quando a mistura atingiu a temperatura ambiente, foi adicionado 1 volume de água Milli-Q. A fase orgânica foi evaporada sob N₂(g) e ressuspensa em 1 mL de hexano. Essa solução foi injetada no CG para a detecção e quantificação dos ácidos graxos. Os padrões usados para identificação e quantificação foram: C14:0, C16:0, C16:1 (n-7), C18:0, C18:1 (n-9), C18:1 (n-7), C18:2 (n-6), C18:3 (n-6), C20:4 (n-6), C20:5 (n-3), C22:6 (n-3), C18:5 (n-4). Estas análises foram conduzidas na Universidade Católica do Porto, em colaboração com a Dra. Ana Carvalho.

3.8.5. Atividade enzimática de SOD, CAT e Apx

Cerca de 200 mg das amostras foram trituradas em N₂ líquido para extração com tampão fosfato 50 mM (pH = 7,0) contendo Triton X-100 0,25%, fluoreto de fenilmetilsulfonil 1 mM, 1% de isopropanol e 1% de polivinilpirrolidona (MM 360000). O tampão de extração para Apx também continha ascorbato 0,5

mM e EDTA 0,1 mM. Os extratos foram centrifugados a 16000 *g* por 5 minutos a 4°C antes dos ensaios. A atividade de SOD foi medida conforme descrito no item 3.5.2. A atividade de CAT foi determinada de acordo com Aebi (1984), seguindo o decréscimo da absorbância a 240 nm após adição de uma solução de H₂O₂ 11 mM. A atividade de Apx foi determinada seguindo-se o decréscimo da absorbância a 290 nm adicionando-se uma solução de H₂O₂ em tampão fosfato contendo ascorbato 0,5 mM (Nakano & Asada 1981). Os ensaios enzimáticos foram realizados em triplicata e a 25°C. A concentração de proteína foi medida segundo o método descrito por Bradford (1976) usando-se albumina bovina como padrão.

3.8.6. Análises estatísticas.

Todos os dados apresentados são médias $\pm$ desvio padrão e as análises estatísticas foram determinadas pelo teste "t-Student" com nível de significância de 95%.

3.9. Níveis de ácidos graxos e pigmentos em culturas de *Lincolodinium polyedrum* durante o ciclo claro-escuro.

Culturas de *L. polyedrum* foram cultivadas em meio Guillard f/2 (Guillard, 1975) sob períodos alternados de 12 hs luz: 12 hs escuro ($120 \mu\text{mol f\acute{o}tons}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$), a $19 \pm 1^\circ\text{C}$, para uma concentração celular de cerca de 10^4 cels.mL⁻¹. As densidades de células fixadas com Lugol foram estimadas pelas médias de contagens ao microscópio em câmaras tipo hemocitômetros (Nageotte). As culturas celulares foram coletadas a cada 3 hs durante 24 hs, em frascos em triplicata.

Para medir a concentração dos pigmentos, MDA e ácidos graxos, três alíquotas de 200 mL das culturas foram filtradas em papel de filtro Whatman em cada tempo experimental. As células foram transferidas para tubos eppendorfs, imediatamente congeladas em N₂ líquido, protegidas contra a luz e armazenadas a -80 °C.

3.9.1. Análise dos pigmentos por HPLC.

As amostras foram submetidas à extração com MeOH e analisadas em HPLC conforme o item 3.3.

3.9.2. Análise dos ácidos graxos por eletroforese capilar.

Essas análises foram feitas em colaboração com a Profa. Dra. Marina Tavares, do Departamento de Química Fundamental do Instituto de Química-USP, usando um aparelho de eletroforese capilar. As soluções estoques de C18:3c e C22:6c foram preparadas em MeOH na concentração de $170 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ e armazenadas a -20°C . A solução de eletrólito usada foi um tampão tetraborato de sódio $10 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, pH 9, contendo $10 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ de Brij 35 (Aldrich), 20% MeOH e 25% ACN.

C22:6c e C18:3c foram determinados seguindo o procedimento descrito por Oliveira (2001). As amostras foram saponificadas tratando-se 10 mg PF de *L. polyedrum* coletadas conforme descrito anteriormente com 1 mL de uma solução de NaOH em MeOH ($0.5 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$) a $75\text{-}80^\circ\text{C}$ por 5 min. Todos os experimentos foram conduzidos em um sistema de eletroforese (model HP^{3D}CE, Agilent Technologies, Palo Alto, CA), equipado como um detector “photo diode array” a 200 nm, com um controlador de temperatura mantido a 25°C . A aquisição de dados foi realizada em um “software” HP ChemStation, rev A.06.01. As amostras foram injetadas hidrodinamicamente (50 mbar, 4 s) e o sistema de eletroforese foi operado sob condições de polaridade normal e de voltagem constante +30 kV. Foi utilizado um capilar de sílica-fundida Polymicro Technologies com dimensões totais de 38.5 cm x 30 cm efetivos e $75 \mu\text{m}$ d.i., $375 \mu\text{m}$ d.e. No começo das análises, o capilar era acondicionado em um fluxo sob alta pressão de NaOH $1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ por 5 min, H_2O deionizada por 5 min e finalmente, em uma solução de eletrólito por 10 min.

3.9.3. Medida dos níveis de MDA por HPLC.

A concentração de MDA em *L. polyedrum* foi determinada seguindo-se o protocolo descrito por Esterbauer *et al* (1984) com algumas modificações. Foi adicionado 1 mL de ACN a 3 mg de células coletadas. Após incubação em ultrassom de banho por 10 min, as amostras foram filtradas em membrana Millipore 0,45 μm e aliquotas de 100 μL foram injetadas no HPLC para quantificação de MDA. A análise foi conduzida usando-se uma coluna amino (250 mm x 4.6 mm; 5 μm de tamanho da partícula; Phenomenex), com uma pré-coluna de 5 μm , também amino (Phenomenex). O fluxo foi de 1.0 mL·min⁻¹ e a detecção a 270 nm. A fase móvel empregada foi ACN/ 0.03 M Tampão TRIS, pH = 7.4 (1:9 v/v). O MDA foi quantificado e identificado comparando o seu tempo de retenção e espectro de absorção com aquele encontrado para o padrão. O padrão de MDA foi preparado a partir do malonaldeído-bisdietilacetal (Merck), por hidrólise com H₂SO₄ concentrado por 2 hs como descrito por Esterbauer *et al* (1984).

3.9.4. Análise estatísticas dos resultados.

Os dados obtidos nesse experimento foram expressos como médias e desvio padrão. Os resultados foram testados para significância ($P < 0,05$), por comparação da média obtida no período de luz contra a média obtida no período escuro usando o “independent t-test” (Origin® 6.0).

4. RESULTADOS

4.1. Isolamento e elucidação estrutural dos carotenóides peridinina e β -caroteno de *Lingulodinium polyedrum*.

A técnica Chromatotron permitiu que dois carotenóides fossem isolados, a peridinina (fração TR-07, figura 13) e o β -caroteno (fração TR-01, figura 14), em uma só etapa e sob atmosfera de N_2 . Os dados obtidos das análises de RMN de 1H , FT-IR e espectrometria de massa (figura 15) usadas para a determinação estrutural descritas abaixo foram similares àqueles encontrados na literatura (Krane *et al* 1992 e Britton *et al* 1995).

Figura 13. Estrutura da peridinina.

As constantes de acoplamento e deslocamentos químicos para a peridinina estão descritas abaixo onde: *m*-multiplete, *d*-dublete, *s*-singleto, *J*-constante de acoplamento, *ax*-axial, *eq*-equatorial.

RMN de 1H : (500 MHz; δ in ppm) ($CDCl_3$): δ 1.40 (1H, *m*, H-2_{ax}), δ 1.99 (1H, *m*, H-2_{eq}), δ 5.38 (1H, *m*, H-3), δ 1.50 (1H, *m*, H-4_{ax}), δ 2.28 (1H, *m*, H-4_{ax}), δ 6.05 (1H, *s*, H-8_{ax}), δ 6.11 (δ , *J* = 11,6 Hz, 1H, H-12), δ 6.61 (2H, *m*, H-13, H-15'), δ 6.38 (1H, *m*, H-14), δ 6.51 (1H, *m*, H-15), δ 1.38 (3H, *s*, Me-16), δ 1.07 (3H, *s*, Me-17), δ 1.35 (3H, *s*, Me-18), δ 1.80 (1H, *s*, Me-19), δ 6.45 (1H, *m*, H-14'), δ 5.73 (1H, *m*, H-12'), δ 7.02 (1H, *s*, H-10'), δ 6.37 (*d*, *J* = 15,6 Hz, 2H, *m*, H-08'), δ 7.17 (*d*, *J* = 15,6 Hz, 2H, *m*, H-07'), δ 1.64 (1H, *m*, H-4'_{ax}), δ 2.41 (1H, *m*, H-4'_{eq}), δ 3.91 (1H, *m*, H-

3'), δ 1.24 (1H, *m*, H-2'ax), δ 1.65 (1H, *m*, H-2'eq), δ 1.20 (3H, *m*, Me-16'), δ 0.97 (3H, *m*, Me-17'), δ 1.21 (3H, *m*, Me-18'), δ 2.22 (3H, *m*, H-20').

Os dados obtidos por FT-IR (cm^{-1}) para a peridinina foram: 3425 (OH), 2959, 2922 e 2853 (CH), 1929 (aleno), 1741 (C=O, acetato), 1642, 1521, 1456 (CH_2), 1253 (C-O, acetato), 1369 (*gem*- CH_3), 1162, 1125, 1030 e 985 (*trans* C=C).

Figura 14. Estrutura do β -caroteno.

As constantes de acoplamento e deslocamentos químicos para o β -caroteno estão descritas abaixo onde: *m*-multiplete, *t*-triplete, *d*-dublete, *dd*-duplo dublete, *s*-singleto, *J*-constante de acoplamento, ax-axial, eq-equatorial.

RMN de ^1H : (500 MHz; δ em ppm) (CDCl_3): δ 1.47 (1H, *m*, H-2ax), δ 1.61 (1H, *m*, H-3), δ 2.02 (*t*, $J = 6,3$ Hz, 1H, H-4ax), δ 6.17 (1H, *m*, H-7), δ 6.17 (1H, *m*, H-8), δ 6.16 (*d*, $J = 10,8$ Hz, 1H, H-10), δ 6.65 (*dd*, $J = 10,8$ Hz; 14,8, 1H, H-11), δ 6.35 (*d*, $J = 14,8$ Hz, 1H, H-12), δ 6.25 (1H, *m*, H-14), δ 6.63 (1H, *m*, H-15), δ 1.03 (1H, *s*, H-16), δ 1.03 (1H, *s*, H-17), δ 1.72 (1H, *s*, H-18), δ 1.97 (1H, *s*, H-1'), δ 1.97 (1H, *s*, H-20), δ 1.62 (1H, *m*, H-3'), δ 2.02 (*d*, $J = 6,3$ Hz, 1H, H-4'ax), δ 6.17 (1H, *m*, H-7'), δ 6.16 (1H, *m*, H-8'), δ 6.15 (*d*, $J = 10,8$ Hz, 1H, H-10'), δ 6.65 (*dd*, $J = 10,8$ Hz; 14,8, 1H, H-11'), δ 6.35 (*d*, $J = 14,8$ Hz, 1H, H-12'), δ 6.25 (1H, *m*, H-14'), δ 6.63 (1H, *m*, H-15'), δ 1.03 (1H, *s*, H-16'), δ 1.03 (1H, *s*, H-17'), δ 1.72 (1H, *s*, H-18'), δ 1.97 (1H, *s*, H-19'), δ 1.97 (1H, *s*, H-20').

Figura 15. Espectros de massa pela técnica Electrospray para o β -caroteno (A) e a peridinina (B) extraídos da alga *L. polyedrum*.

4.2. Análise quantitativa dos carotenóides em extratos de *Lingulodinium polyedrum* por HPLC.

Embora o gradiente desenvolvido seja ternário, as análises foram reprodutivas e com excelente separação dos pigmentos. O perfil do cromatograma abaixo (figura 16) abaixo mostra a eficiência da separação. Os picos são: 1 - peridinina, 2 - bixina (PI), 3 - clorofila A e 4 - β -caroteno.

Figura 16. Perfil em HPLC do extrato metanólico de *L. polyedrum*. D-1, D-2, D-3 e D-4 não foram identificados.

4.3. Atividade antioxidante dos carotenóides:

4.3.1. Determinação da constante de supressão de $O_2 (^1\Delta_g)$.

A figura 17 mostra como é o decaimento do $O_2 (^1\Delta_g)$ em $CDCl_3$ e a supressão por peridinina. A tabela 4 contém os valores das constantes determinados para os carotenóides testados e alguns valores encontrados na literatura.

Figura 17. Exemplo de como a peridinina suprime $O_2 (^1\Delta_g)$ em $CDCl_3$.

A figura 18 mostra os gráficos Stern-Volmer encontrados para alguns carotenóides testados.

Figura 18. Gráfico Stern-Volmer para a supressão de O_2 ($^1\Delta_g$) por licopeno, β -caroteno, bixina e peridinina.

Tabela 4. Constantes de "quenching" dos Carotenóides.

Carotenóides	Solventes	$k_Q (\times 10^9 M^{-1} s^{-1})$	$k_Q (\times 10^9 M^{-1} s^{-1})$
		deste trabalho	literatura
Licopeno	$CHCl_3$	11 ^a	9 ^c , 19 ^d
β -Caroteno	$CHCl_3$	5.2 ^a	5.0 ^c , 6.5 ^e , 11 ^d
Peridinina	$CHCl_3$	0.95 ^a	--
Peridinina	$D_2O/Ac-d_6$ (1:1)	5.0 ^b	--
Fucoxantina	CCl_4	--	0.70 ^f

(a) sensibilizador: perinaftenona; (b) sensibilizador: azul de metileno; (c) ref [Devasagayam *et al* 1992]; (d) ref [Conn *et al* 1991]; (e) ref [Salokhiddinov *et al* 1981]; (f) ref [Krasnovsky & Paramonova 1983].

4.3.2 Avaliação da inibição da peroxidação lipídica em lipossomos preparados com astaxantina, peridinina e licopeno.

A figura 19 mostra a concentração de ferro nos vários sistemas testados.

Figura 19. Concentração de Fe²⁺ em FCL, na presença ou ausência de licopeno (Ferro-FCL/LIC), astaxantina (Ferro-FCL/AST) ou peridinina (Ferro-FCL/PER), durante o processo de diálise. Unidades em nmoles Fe²⁺/μmol FC. Os dados mostrados são a média ± desvio padrão de três experimentos (*p<0,05).

Para verificar se a concentração interna de ferro era suficiente para gerar a peroxidação lipídica, foi testado o sistema Fe-FCL (sem nenhum carotenóide incorporado) com os iniciadores H₂O₂ 1 mM, *t*-ButOOH 1 mM e ascorbato 1 mM. Os resultados podem ser vistos na figura 20.

Figura 20. Efeitos de BHT e Trolox na lipoperoxidação de FCL na ausência de carotenóides induzidos pela mistura de promotores da lipoperoxidação - H₂O₂, t-ButOOH, ou ascorbato – com íons de Fe²⁺ quelados com EDTA. (Média de 4 experimentos com os respectivos desvios padrão). *p < 0,05.

Para avaliar o efeito do ferro na processo de lipoperoxidação, as medidas de TBARS foram também determinadas após a adição de 0,1 mM de Fe²⁺:EDTA em 5 mM da suspensão de lipossomos livre de metais, com ou sem 25 μM de carotenóides. Como controle extra, lipossomos contendo 25 μM de α-tocoferol foram preparados. Como pode ser observado na figura 21, astaxantina, peridinina e o controle α-tocoferol foram capazes de inibir lipoperoxidação quando o complexo de ferro foi adicionado.

Figura 21. Níveis de TBARS promovidos pela adição de Fe²⁺:EDTA em FCL contendo α -tocoferol (FCL/TOC), licopeno (FCL/LIC), peridinina (FCL/PER) e astaxantina (FCL/AST). (Média de 4 experimentos com os respectivos desvios padrão). *p<0,05.

A figura 22 mostra as medidas de MDA obtidas após o tratamento com os promotores descritos anteriormente e com a adição de Fe²⁺ quelado.

Figura 22. Níveis de TBARS induzidos por H₂O₂, t-ButOOH ou ascorbato e Fe²⁺:EDTA em FCL associados com carotenóides. (Média de 4 experimentos com os respectivos desvios padrão). *p < 0,05.

Para verificar o efeito de permeabilidade na membrana multilamelar aos promotores, foram realizados ensaios com lipossomos sem carotenóides incorporados. A figura 23 resume os resultados encontrados quando os lipossomos incorporados com Fe^{2+} :EDTA (Fe-FCL) foram expostos aos promotores da lipoperoxidação.

Figura 23. Efeitos de 5 μM de BHT e 25 μM , 50 μM , 0,25 mM e 0,5 mM de Trolox na lipoperoxidação de Fe-FCL (na ausência de carotenóides) induzidos pela adição de 1 mM de promotores de ERO - H_2O_2 , *t*-ButOOH, e ascorbato. (nmols MDA/ μmol FC). (Média de 4 experimentos com os respectivos desvios padrão). * $p < 0,05$.

O efeito de rigidez de membrana conferido pelos carotenóides também foi verificado. Fe-FCL contendo carotenóides incorporados foram desafiados com os promotores adicionados pelo lado de fora da membrana. Os resultados podem ser vistos na figura 24.

Figura 24. Níveis de TBARS induzidos pela adição de H_2O_2 , $t\text{-}ButOOH$ ou ascorbato a Fe-FCL na presença de licopeno (Fe-FCL/LIC), peridinina (Fe-FCL/PER) ou astaxantina (Fe-FCL/AST). (Média de 4 experimentos com os respectivos desvios padrão). * $p < 0,05$

4.4. Biossíntese de carotenóides durante a curva de crescimento de *Lingulodinium polyedrum*, *Tetraselmis gracilis* e *Minutocellus polymorphus*.

A curva de crescimento de *L. polyedrum*, *M. polymorphus* e *T. gracilis* pode ser vista na figura 25 (A,B,C, respectivamente). Na cultura de *L. polyedrum*, a fase exponencial vai até o 7º dia. O taxa máxima de crescimento foi de $0,27 \pm 0,01$ divisões/dia, decrescendo do 10º dia em diante. Contudo, nas culturas de *M. polymorphus* e *T. gracilis*, a fase exponencial atingiu o auge no 3º dia ($1,49 \pm 0,05$ divisões/dia e $0,87 \pm 0,09$ divisões/dia, respectivamente), com quase nenhum crescimento após o 7º dia.

Figura 25. Curvas de crescimento para *L. polyedrum* (A), *M. polymorphus* (B) e *T. gracilis* (C). Cada barra de erro corresponde ao desvio padrão de três réplicas.

4.4.1. Atividade enzimática de SOD.

Em *M. polymorphus* (figura 26C) e *T. gracilis* (figura 26B), a atividade de SOD mostrou um pico no começo do experimento. Além disso, em *L. polyedrum* (figura 26A) e *M. polymorphus* (figura 26C), a atividade de SOD exibiu um segundo pico no 17º dia de crescimento, com valores três vezes mais altos daqueles obtidos no final de suas fase exponencial de crescimento (3º dia).

Figura 26. Mudanças na atividade de SOD ao longo da curva de crescimento de *L. polyedrum* (A), *T. gracilis* (B) e *M. polymorphus* (C). Cada barra de erro corresponde ao desvio padrão de três réplicas

4.4.2. Análise dos pigmentos por HPLC.

Nas culturas de *L. polyedrum*, a concentração de clorofila-a (figura 27A) e β -caroteno (figura 27B) não muda ao longo do tempo ($P < 0,05$), embora a concentração de peridinina mostre uma tendência de aumento do final da fase de crescimento exponencial (figura 27C). Os níveis de peridinina obtidos na fase estacionária (17º dia) foram 65% mais altos do que aqueles encontrados na fase exponencial de crescimento (7º dia).

Figura 27. Concentrações de pigmentos fotossintéticos (clorofila- a (A), β -caroteno (B), peridinina (C)), ao longo da curva de crescimento de *L. polyedrum*. Cada barra de erro corresponde ao desvio padrão de três réplicas.

A concentração de clorofila-*a* aumentou durante a fase exponencial para *T. gracilis* e *M. polymorphus*, decrescendo a partir do 3º ou 7º dia, respectivamente (figura 28A e 28B). Em *T. gracilis*, há uma estabilização nos níveis de clorofila-*a* a partir do 14º dia.

Em *M. polymorphus*, os níveis de β -caroteno apresentaram uma tendência de decréscimo ao longo da fase exponencial (figura 28B). Já em *T. gracilis*, a concentração de β -caroteno decresceu desde o início do seu crescimento até o 10º dia. Contudo, um aumento de 85% nos níveis de β -caroteno foi detectado no 14º dia, continuando com altos níveis até o final do experimento (figura 28A).

Figura 28. Concentrações de pigmentos fotossintéticos (A: *T. gracilis* e B: *M. polymorphus*), ao longo da curva de crescimento. Cada barra de erro corresponde ao desvio padrão de três réplicas.

4.5. Efeito de sombreamento sobre a biossíntese de carotenóides em culturas de *Amphidinium cartareae* e *Nitzschia microcephala*.

Nas culturas de *Amphidinium* com alta concentração a densidade final das células nos frascos foi nove vezes maior que o das culturas iniciais e para as culturas com concentração média e alta, 19 e 21 vezes, respectivamente (figura 29A). No caso das culturas de *Nitzschia* o aumento foi de 70 vezes na cultura de alta concentração, 240 vezes para a de média concentração e 8830 vezes para a de mais baixa concentração (figura 29B). Somente a diatomácea alcançou estado estacionário de cerca de 1,15 milhões de células por mL.

Os níveis de SOD aumentaram e a concentração de grupos tióis de proteínas diminuíram durante a curva de crescimento de *Amphidinium* e *Nitzschia* (figura 29 C,D e E,F, respectivamente). Nas culturas de *Nitzschia*, antes de se atingir a fase estacionária, a atividade de SOD apresentou um pico máximo, porém, decresceu novamente quando a fase estacionária foi alcançada.

Os cromatogramas obtidos empregando-se o método descrito no item 3.6.2 para dosar tiamina e seus ésteres fosfatos podem ser vistos na figura 30. Os níveis de TL no meio de cultura foram quantificados apenas para o dia 0 (0,27 nM). Nos demais dias, para as duas espécies, não foi possível detectar TMF. Para *Amphidinium* as concentrações de TMF e TDF nas culturas não apresentaram variação significativa ao longo do experimento (figura 31C e E; ANOVA, $p>0,05$). Já para TL (figura 31A), houve uma tendência de queda durante os 8 dias de experimento para as densidades média e alta. Apenas as culturas com densidade baixa de *Amphidinium* apresentaram aumento na concentração de TL (a partir do dia 02 até o dia 06).

Por outro lado, as concentrações de TL, TMF e TDF cresceram ao longo do experimento para as culturas de *Nitzschia* (figura 31B, D e F, ANOVA, $p<0,05$).

Nas culturas de *Nitzschia*, os níveis de Clor-*a*, Clor-*c* por célula foram similares àqueles em *Amphidinium*, exceto que as concentrações decresceram mais após os máximos encontrados para os dias 2 e 4 (figura 32 a-d). Os

carotenóides peridina (Peri - *Amphidinium*), fucoxantina (Fuco - *Nitzschia*), β -caroteno (Beta - ambas espécies) e diadinoxantina (Diadino - *Amphidinium*) (figura 33 a-e) mostraram o mesmo perfil que as clorofilas *a* e *c*. No entanto, diadino (*Nitzschia*) e diatoxantina (diato - ambas espécies), pigmentos envolvidos no ciclo das xantofilas, apresentaram tendências diferentes (figura 33 f-h). Para as três densidades das culturas de *Nitzschia*, diadinoxantina decresceu cerca de 55% entre o dia 0 e dia 2, e cerca de 70% entre os dias 0 e 8 (figura 33f). Nenhum efeito relacionado às três densidades foi detectado para diadinoxantina em culturas de *Nitzschia*. As concentrações de diatoxantina por célula foram extremamente baixas para as duas espécies (figura 33 g e h), mas especialmente maior para *Nitzschia*, e nenhuma tendência relacionada ao tempo ou tratamento foi notada (figura 33h). Para *Amphidinium* os níveis de diatoxantina decresceram enquanto diadinoxantina mostrou decréscimo apenas no tratamento com baixa densidade entre os dias 4 e 8 (figura 33 e e g, respectivamente).

Figura 29. Quantificações da biomassa e medidas de indicadores do estresse oxidativo para *Amphidinium carterae* e *Nitzschia microcephala* durante o experimento. (a,b) Densidade celular; (c,d) Atividade de SOD; (e,f) Concentração de – grupos SH. Desvio padrão corresponde à barra de erros.

Figura 30. Cromatogramas obtidos para os padrões de tiamina 100 nM (A), amostras de *Amphidinium carterae* (B), *Nitzschia microcephala* (C) e *Artemia salina* (D), onde 1 é TL ($t_r = 3,3$), 2 é TMF ($t_r = 7,0$), e 3 é TDF ($t_r = 19,6$).

Figura 31. Níveis das três formas de tiamina em culturas de *Amphidinium carterae* e *Nitzschia microcephala* durante o experimento: (a,b) Tiamina livre, TL; (c,d) Tiamina monofosfato, TMF; (e,f) Tiamina difosfato, TDF. As barras de erros são os desvios padrão de três réplicas.

Figura 32. Concentração dos pigmentos encontrados em *Amphidinium carterae* e *Nitzschia microcephala* durante o experimento. As barras de erros são os desvios padrão de três réplicas.

Figura 33. Pigmentos nas células de *Amphidinium carterae* e *Nitzschia microcephala* durante o experimento: (a) Peridinin, Peri, (b) Fucoxantina, Fuco; (c,d) β -caroteno, Beta; (e,f) Diadinoxantina, Diadino; (g,h) Diatoxantina, Diato. As barras de erros são os desvios padrão de três réplicas.

4.6. *Biossíntese de carotenóides em culturas de Lincolodinium polyedrum expostas a Hg^{2+} , Pb^{2+} , Cd^{2+} e Cu^{2+} .*

Dependendo do estresse aplicado, foram obtidas respostas diferentes para os níveis dos principais carotenóides de *L. polyedrum* (peridinina e β -caroteno). As células expostas a condições crônicas de tratamento mostraram praticamente os mesmos níveis de β -caroteno/clorofila-a mas uma diminuição nos níveis de peridinina/clorofila-a foi também observada (figura 34). Por outro lado, sob condições agudas de exposição, os níveis de β -caroteno/clorofila-a dobraram e os níveis de peridinina/clorofila-a não apresentaram mudanças significativas.

Figura 34. Níveis de pigmentos em cloroplastos de células mantidas ou sob tratamento crônico ou agudo com metais pesados. β -Caroteno (A) e peridinina (B) estão expressos como carotenóide/Clorofila-a. Os dados apresentados são médias com os desvios padrão. (n=6 de três experimentos). *Significativamente diferente para o grupo controle ($p < 0,05$). Controle sem metais.

4.7. Efeitos Cd^{2+} e Cu^{2+} sobre o sistema antioxidante de *Gracilaria tenuistipitata*.

A figura 35 mostra o efeito dos metais pesados no crescimento de *G. tenuistipitata* enquanto os níveis protéicos e de clorofila-a são apresentados na figura 36.

Figura 35. Efeitos na taxa de crescimento com adições de Cd^{2+} ou Cu^{2+} em *G. tenuistipitata*. Um aumento no peso fresco foi medido 4 dias após a adição de metais. A intensidade luminosa 40 (barras pretas) ou 250 (barras brancas) $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. A alga foi cultivada com uma densidade inicial de 1 g.PF^{-1} em 20 ppt de água do mar a 20°C . Os resultados estão apresentados com médias e desvios padrão (n=3).

Figura 36. Níveis de proteína (A) e clorofila-a (B) de *G. tenuistipitata* após crescimento com adição de 1 ppm de Cd^{2+} ou 0,2 ppm de Cu^{2+} com intensidade luminosa de $250 \mu\text{mol.fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, por 96 hs. Os resultados estão apresentados com médias e desvios padrão (n=10 para A e n=5 para B).

4.7.1. Monitoração da biossíntese de carotenóides por HPLC.

A figura 37 mostra os resultados obtidos para os carotenóides quando as culturas de *G. tenuistipitata* foram mantidas na presença de metais pesados.

Figure 37. Níveis de luteína e β-caroteno em *G. tenuistipitata* após 4 dias de cultivo com adição de 1 ppm de Cd²⁺ ou 0,2 ppm de Cu²⁺. A intensidade luminosa foi de 250 µmol.fótons.m⁻².s⁻¹. Resultados apresentados com as médias e desvios padrão, n=5.

4.7.2. Medida dos níveis de MDA

Os níveis de MDA obtidos em culturas de *G. tenuistipitata* expostas a metais pesados podem ser vistos na figura 38.

Figure 38. Peroxidação lipídica em *G. tenuistipitata*, como formação de TBARS, após 4 dias de cultivo com adição de Cu²⁺ ou Cd²⁺ a 250 µmol.m⁻².s⁻¹. ND, não determinado. Resultados apresentados com as médias e desvios padrão, n=3.

4.7.3. Medidas dos níveis de carbonilas de proteínas

Os níveis de oxidação protéica medidos como carbonilas podem ser vistos na figura 39.

Figure 39. Efeitos da adição de 1 ppm de Cd^{2+} ou 0,2 ppm de Cu^{2+} nos níveis de carbonilas em proteínas de *G. tenuistipitata*. A intensidade luminosa foi de $250 \mu\text{mol.fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Resultados apresentados com as médias e desvios padrão, $n=5$.

4.7.4. Atividade enzimática de SOD, CAT e Apx.

As atividades enzimáticas para CAT, Apx e SOD mostraram diferentes tendências conforme o tratamento e intensidade de luz aplicados. A figura 40 resume os resultados encontrados.

Figura 40. Efeitos da adição de metais pesados na atividade de SOD (A - U.mg proteína⁻¹), CAT (B - μmoles.mg de proteína⁻¹.min⁻¹) e Apx (C - μmoles.mg de proteína⁻¹.min⁻¹). *Gracilaria tenuistipitata* foi cultivada na presença de 0,2 ppm de Cu²⁺ ou 1 de ppm Cd²⁺ (barras brancas) ou 0,02 ppm Cu²⁺ ou 0,1 ppm Cd²⁺ (barras pretas). A intensidade luminosa foi de 250 μmol.fótons.m⁻².s⁻¹ por 96 hs. Resultados apresentados com as médias e desvios padrão, n=5.

4.7.5. Medidas dos níveis de ácidos graxos.

Os níveis médios para a maioria dos ácidos graxos presentes em *G. tenuistipitata* não apresentaram oscilação significativa nos tratamentos com metais (figura 41). Porém, os níveis do ácido eicosatetraenóico (C 20:4 (n-6)) aumentaram no tratamento com Cd^{2+} e decaíram no tratamento com Cu^{2+} . O ácido octadecatrienóico foi detectado no tratamento com Cu^{2+} .

Figura 41. Efeitos da adição de 1 ppm de Cd^{2+} ou 0,2 ppm de Cu^{2+} nos níveis de ácidos graxos em *G. tenuistipitata*. A intensidade luminosa foi de 250 $\mu\text{mol.fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. (n=5, *significativamente diferente para o grupo controle, $p < 0,05$). Controle sem metais. nd - não detectável.

4.8. Níveis de ácidos graxos e pigmentos em culturas de *Lingulodinium polyedrum* durante o ciclo claro-escuro.

Os resultados dos experimentos da variação circadiana dos ácidos graxos, pigmentos e MDA em *L. polyedrum* foram corrigidos por clorofila-a para se normalizar os valores obtidos por um fator biológico interno. Os níveis de clorofila permaneceram constantes ao longo do experimento. Nenhuma variação foi encontrada para peridininina e os níveis de β -caroteno apresentaram um pico no meio do dia (Figura 42). Esses resultados foram similares aos encontrados por Knoetzel & Rensing (1990) e Di Mascio *et al.* (1995), respectivamente.

Figura 42. Típico cromatograma do extrato metanólico de *L. polyedrum* as 12hs e 24hs; peridininina (1) clorofila-a (2) e β -caroteno (3).

A figura 43 mostra um eletroferograma às 6 horas e outro às 18 horas de uma amostra de extrato saponificado de *L. polyedrum*. Os níveis de C22:6c (figura 45B) em *L. polyedrum* não variaram ao longo do experimento, embora mostrando uma tendência de aumento na fase clara e uma tendência de declínio na fase

escura. Contudo, os níveis de C18:3c oscilaram durante o dia (figura 45C), apresentando um pico no meio do dia e depois decrescendo até as 18 horas, permanecendo praticamente constante durante a fase escura.

A adaptação do procedimento previamente descrito por Esterbauer *et al* (1984) para microssomos de mitocôndrias rendeu uma boa separação e quantificação dos níveis de MDA em *L. polyedrum* (figura 44). A concentração de MDA no extrato feito em diferentes tempos do dia exibiu um dramático ritmo diurno (figura 45A). Os níveis de MDA são cerca de duas vezes maiores durante a fase clara do que a fase escura. Pela primeira vez a lipoperoxidação (níveis de MDA) é explorada em experimentos de variação circadiana.

Figura 43. Eletroferograma de uma amostra de *L. polyedrum* após saponificação. Identificação de ácido eicosahexênico (1, C22:6c) e ácido linoléico (2, C18:3c).

Figura 44. Cromatograma do extrato em acetonitrila de *L. polyedrum* para detectar MDA (1).

Figura 45. Variação diária da lipoperoxidação e ácidos graxos na alga *L. polyedrum*. As células foram cultivadas sob regime claro:escuro e coletadas a cada três horas (n=3) e os níveis de MDA (A), dos ácidos graxos C22:6c (B) e C18:3c (C) foram medidos (p=0.0185, p=0.776 e p=0.0231, respectivamente).

Os dados obtidos nesse experimento foram expressos com médias e desvio padrão. Os resultados obtidos foram testados para significância ($P < 0,05$), por comparação das médias em cada experimento controle por um fator de análise de variância.

5. DISCUSSÃO.

5.1. Isolamento e identificação dos carotenóides presentes em *Lingulodinium polyedrum*.

Os pigmentos carotenóides são sensíveis à exposição da luz, à alta temperatura e ao ar (Schiedt & Liaasen-Jensen 1995). Em nossos procedimentos, as extrações foram realizadas na ausência de luz, sob baixa temperatura e em atmosfera de N₂. Essas precauções e a alta salinidade do meio de cultura contribuíram para a dificuldade inicial da extração desses compostos.

Johansen *et al* (1974) demonstraram que várias espécies da classe Dinophyceae apresentam carotenóides polares (peridinina, diadinoxantina, e neoxantina, figura 10.2). Em CCD (condição: hexano/acetona 7:3) obtivemos boa separação do extrato, e quando a concentração de acetona foi aumentada para 70% ainda se notou pigmentos retidos na origem da placa.

Haugan *et al* (1989) mostraram que a extração de pigmentos da alga *Fucus serratus* com acetona/MeOH (7:3) garante ótima extração. Neste trabalho, o principal pigmento encontrado em *Fucus*, fucoxantina (figura 10.2), estava presente em alta concentração na fase hidroalcoólica quando o extrato foi particionado em MeOH:H₂O/Hexano. Em experimentos monitorados por HPLC, a fucoxantina ficou praticamente na fase polar mesmo em MeOH 90%. Por isso, decidimos extrair os pigmentos com MeOH.

O aparelho Chromatotron foi muito útil para a separação dos carotenóides, pois o contato com a sílica é sensivelmente diminuído e a análise é muito mais rápida do que em placa. Além disso, a atmosfera fica sob N₂, previne uma possível oxidação dos mesmos.

O espectrômetro de massa de impacto de elétrons não foi útil para as análises dos pigmentos, pois a alta energia usada para ionizar as moléculas (70 ou 20 eV) destruíram os pigmentos antes mesmo de serem detectados. Como alternativa utilizamos o espectrômetro de massa por Electrospray, gentilmente oferecido pelo Prof. Dr. Massuo Jorge Kato, professor do Departamento de

Química Fundamental do Instituto de Química da USP. O Electrospray usa ionização branda e alta voltagem e permite a análise de moléculas com alto peso molecular como os carotenóides (figura 15).

5.2. Análise quantitativa do extrato metanólico bruto de *Lingulodinium polyedrum*.

O gradiente mostrado na tabela 4 foi a melhor condição de análise. Os sistemas binários tentados não foram capazes de separar todos os pigmentos. A condição ternária foi eficiente e reprodutível, garantindo a separação de praticamente todos os pigmentos (figura 16). Esse resultado foi usado em todas as análises posteriores, inclusive com a macroalga *Gracilaria tenuistipitata*.

5.3. Atividade antioxidante de alguns carotenóides de algas marinhas.

5.3.1. Determinação das constantes de supressão de $O_2 (^1\Delta_g)$.

Determinamos constante de supressão da peridinina utilizando, para comparação, licopeno, β -caroteno e bixina. O licopeno não está presente no extrato metanólico de *L. polyedrum*, mas é o mais eficiente supressor de $O_2 (^1\Delta_g)$ conhecido na natureza (Di Mascio *et al* 1989). O β -caroteno, por sua vez, porque está presente na alga. Já a bixina por ser uma xantofila assim como a peridinina. A constante de supressão (K_q) da peridinina até então não havia sido publicada.

Foote *et al* (1970) mostraram que a eficiência de supressão depende do número de duplas conjugadas que a molécula apresenta, quanto mais duplas conjugadas tiver um carotenóide, maior será sua eficiência de supressão. Um grande número de determinações de constantes de supressão foram encontradas na literatura para o licopeno e β -caroteno. Nós conseguimos reproduzir estes resultados. O β -caroteno possui uma alta constante de supressão mas está muito menos abundante do que a peridinina na alga *L. polyedrum*. Os resultados que encontramos em dois sistemas de solvente sugerem que peridinina possui uma importante função protetora contra os efeitos deletérios do $O_2 (^1\Delta_g)$. Na mistura

D₂O/CD₃COCD₃ 1:1, o valor encontrado foi 5 vezes maior do que em CHCl₃. Isso mostra que a eficiência de supressão da peridinina é melhor num meio hidrofílico.

A fucoxantina, um carotenóide com estrutura similar a peridinina (ver figura 10.2), é dez vezes menos efetiva do que o β -caroteno (ver tabela 12), talvez pela ausência do anel lactônico. O anel lactônico presente na peridinina está em conjugação com as duplas ligações da molécula. Este fato, além de garantir maior solubilidade da peridinina do que a do β -caroteno no meio fisiológico, mostra que essa xantofila é um eficiente supressor de O₂ (¹Δ_g) e diminui os efeitos deletérios desta espécie gerada no processo de fotossíntese.

5.3.2. Ação protetora da peridinina e astaxantina contra lipoperoxidação em membranas multilamelares.

5.3.2.1. Lipossomos não preenchidos (FCL)

As concentrações de TBARS após a preparação dos FCL foram 0,169 ± 0,043 e 0,209 ± 0,031 nmol MDA/μmol FC, respectivamente para FCL e Fe-FCL. Como esperado, a encapsulação de complexos Fe²⁺:EDTA em FCL resultou em maiores níveis de oxidação lipídica (~25%). A coordenação de Fe²⁺ com EDTA não o previne de reagir com ERO e, hipoteticamente, seria mais fácil eliminar (por diálise) um complexo Fe²⁺:EDTA do que o Fe²⁺ quelado com fosfatidilcolina (Gutteridge 1987 e Fridovich 1998).

Provavelmente, a pressão osmótica deve ter levado à reorganização das membranas de FCL e unido as vesículas de lipídios durante a diálise realizada com água destilada (Minotti & Aust 1992). Mesmo com propriedades polares distintas, licopeno e astaxantina induziram eliminação de Fe²⁺:EDTA dos lipossomos em níveis praticamente iguais (~30%). Quando a peridinina estava associada, o efeito foi menos intenso (23%). Por outro lado, uma alta perda de Fe²⁺ quelado foi medida para lipossomos livres de carotenóides (53%) (figura 19).

O ácido ascórbico pode se comportar como um pró-oxidante, pois ele pode reduzir Fe³⁺ para Fe²⁺ e por isso é um forte promotor da lipoperoxidação (Minotti &

Aust 1992). Contudo, em concentrações da ordem de milimolar, a habilidade do ascorbato de reagir com HO• torna-se mais significativa. O ascorbato é também capaz de reduzir radicais tocoferil, gerados pela abstração de hidrogênio do α -tocoferol, voltando para sua forma antioxidante ativa. Trolox, que possui um mecanismo de reação igual ao do α -tocoferol, também é constantemente regenerado pelo ascorbato de suas formas radicalares em solução aquosa. O ascorbato permanece carregado a pH 7,4 ($pK_{a1} = 4,17$ e $pK_{a2} = 11,57$, respectivamente) e por isso possui baixa permeabilidade através das membranas.

O BHT foi muito eficiente em proteger FCL de radicais livres gerados por todos os agentes promotores da lipoperoxidação mesmo em concentrações da ordem de micromolar (figura 20). Esse efeito foi provavelmente em razão da sua alta difusão nas membranas (Lambert *et al* 1996) que permite a esse antioxidante reagir com oxiradicais em vários locais através da bicamada lipídica. O Trolox, em sua maioria presente na solução aquosa, requer concentrações da ordem de milimolar para inibir a oxidação de lipídios na mesma extensão que BHT no sistema H_2O_2/Fe^{2+} . Os níveis de TBARS foram 1,9 vezes maiores com a adição de Fe^{2+} e *t*-ButOOH em FCL quando comparados aos 94% obtidos com H_2O_2 . Quando o processo de peroxidação lipídica é iniciado por *t*-ButOOH o principal radical livre detectável na bicamada lipídica é o radical peroxil (ROO•) (Tang *et al* 2000). Uma proporção significativa de radicais alcooxil (RO•) e $O_2(^1\Delta_g)$ também pode ser considerada (Burton & Ingold 1984, Ohyashiki & Nunomura 2000, Tang *et al* 2000, Junghans *et al* 2000, Di Mascio *et al* 1989 e 1992). O Trolox não foi capaz de proteger eficientemente as membranas FCL quando a peroxidação foi iniciada por *t*-ButOOH. Normalmente, Trolox é mais reativo com ERO do que BHT, especialmente quando diz respeito a radicais peroxil (Kaneko *et al* 1994), mas a alta permeabilidade de compostos fenólicos pode ter sido compensada pela sua baixa reatividade.

Para avaliar o simples efeito da adição de Fe^{2+} à FCL (com ou sem carotenóides), os níveis de TBARS foram determinados na ausência dos agentes promotores da peroxidação. Como um controle extra, FCL foram também

preparados contendo 25 μ M de α -tocoferol como descrito por Palozza & Krinsky (1992). Como pode ser observado na figura 21, astaxantina e peridinina foram capazes de inibir a lipoperoxidação antes da adição dos complexos de Fe^{2+} . A adição de Fe^{2+} :EDTA aos FCL, na ausência de carotenóides, não mudaram a produção de TBARS embora um aumento de 25% nos níveis de MDA foi previamente observado após o preparo de Fe-FCL. A oxidação lipídica em lipossomos incorporados com astaxantina (FCL/AST) e peridinina (FCL/PER) foi 25% menor do que em FCL. Contudo, apenas FCL/AST foi insensível à adição de Fe^{2+} . O licopeno foi o único carotenóide que reduziu os níveis de lipoperoxidação (25%) após a adição de Fe^{2+} :EDTA (figura 21).

Os lipossomos com carotenóides incorporados foram desafiados por ERO produzidos externamente, quando os iniciadores e complexos de Fe^{2+} foram adicionados simultaneamente. Esses resultados estão apresentados na figura 22. A adição simultânea de sais de ferro e ascorbato resultaram em um aumento mais moderado na concentração de TBARS (21%) do que aquelas observadas para os sistemas H_2O_2 e *t*-ButOOH talvez em razão da ação dupla do ascorbato contra radicais livres. Ainda, o ácido ascórbico normalmente apresenta contaminação de íons ferro (cerca de 0,02%) o que poderia permitir a iniciação da peroxidação lipídica mesmo sem a adição da solução de Fe^{2+} (Gutteridge 1987).

Assim como demonstrado por outros autores (Bell *et al* 2000, Woodall *et al* 1997), a astaxantina foi o melhor antioxidante em todos os experimentos testados com iniciadores e Fe^{2+} quelado adicionados externamente a FCL. Esse cetocarotenóide foi o único composto testado que evitou os altos níveis de destruição lipídica causados pela adição concomitante de íons Fe^{2+} e H_2O_2 , *t*-ButOOH ou ascorbato: 45, 45 e 33%, respectivamente, menores do que FCL com Fe^{2+} (II). Como observado para os experimentos sem os agentes promotores da peroxidação (figura 21), a astaxantina também induziu a mais baixa produção de MDA com a adição de Fe^{2+} .

Nenhuma atividade antioxidante foi encontrada para a peridinina incorporada em FCL e desafiada por radicais livres pelo lado externo. A peridinina

levou a um intenso aumento nos níveis de peroxidação lipídica após a adição de Fe^{2+} a lipossomos tratados com H_2O_2 e *t*-ButOOH: 2,9 e 3,5 mais altos que o controle, respectivamente. Os níveis de TBARS obtidos após a incubação de FCL/PER com ascorbato 1 mM na ausência de Fe^{2+} ($0,65 \pm 0,14$ nmol MDA/ μmol FC) foi um dos mais altos para todos os experimentos analisados.

O licopeno, sob as condições de reação aqui descritas, não inibiu o processo de peroxidação em FCL. O efeito da inclusão de Fe^{2+} a FCL/LIC tratados com ascorbato foi menor que outros agentes promotores da lipoperoxidação apesar de ser o mais alto valor medido ($0,73 \pm 0,03$ nmoles MDA/ μmol FC). Os carotenóides apolares, β -caroteno e licopeno, por exemplo, são descritos como desorganizadores das cadeias apolares das membranas e, com isso, aumentam a permeabilidade da bicamada (Castelli *et al* 1999 e Britton 1995). Em algumas circunstâncias, a eficiência *in vivo* de antioxidantes como o β -caroteno e licopeno pode também ser, ou parcialmente oferecer, um efeito pró-oxidativo, mascarando a atividade antioxidante.

5.3.2.2. Lipossomos preenchidos com Fe^{2+} (Fe-FCL).

Após a diálise, uma concentração significante de Fe^{2+} :EDTA estava presente do lado externo de FCL. Como mostrado na figura 23, nenhuma variação significativa foi observada no sistema com H_2O_2 quando Trolox 25 μM , 50 μM , 0,25 mM, ou 0,5 mM foram adicionados. Esse aspecto sugere que esses oxiradicais foram gerados na solução aquosa interna, iniciado pela permeação da molécula de H_2O_2 , a qual se difunde facilmente pela bicamada lipídica. Quando Fe^{2+} e H_2O_2 foram adicionados externamente, Trolox 0,5 mM e BHT 5 μM inibiram a lipoperoxidação cerca de 40 e 55%, respectivamente (figura 20).

Na concentração 0,5 mM, Trolox suprimiu significativamente a lipoperoxidação (23,6%, figura 23). Mesmo sendo uma molécula pequena e sem carga, era esperado que *t*-ButOOH permeasse menos a membrana que H_2O_2 . Paradoxalmente, os maiores níveis de oxidação lipídica medidos foram após a

incubação de Fe-FCL com *t*-ButOOH do que com H₂O₂. BHT não foi capaz de prevenir a oxidação lipídica nesse sistema. Porém, quando peroxil e alcooxil foram gerados pelo lado externo dos lipossomos, o BHT diminuiu os níveis de MDA formados em 55%.

O ascorbato em pH 7,4 é uma molécula negativamente carregada e não é esperado que ela penetre em bicamadas lipídicas. Entretanto, a adição de ascorbato a Fe-FCL também resultou em um aumento da peroxidação lipídica. Novamente, uma possível explicação é que o ácido ascórbico comercial apresenta cerca de 0,02% de contaminação com ferro (Gutteridge 1987). O efeito do Trolox na lipoperoxidação é outra indicação que o processo de oxidação foi iniciado pelo lado externo das membranas. De fato, a adição de concentrações crescentes de Trolox levou a um gradual aumento da proteção das membranas contra os danos oxidativos. Outra indicação da ação externa de radicais livres é a inibição de cerca de 53% da lipoperoxidação em Fe-FCL por BHT 5 μ M.

Como mostrado na figura 24, a lipoperoxidação em Fe-FCL foi intensamente estimulada pela adição de promotores de peroxidação. H₂O₂, *t*-ButOOH e ascorbato, provocaram aumento de 2,4, 4 e 3,8 vezes, respectivamente, nos níveis de MDA do que sem os promotores (linha pontilhada; 0,12 $\pm$ 0,02 nmol de MDA/ μ mol LC). As concentrações de MDA encontradas na adição de H₂O₂ e *t*-ButOOH a Fe-FCL foram significativamente menores do que aquelas determinadas na adição simultânea de Fe²⁺ e promotores à vesículas (figura 20). Quando ascorbato/Fe²⁺:EDTA foi usado como sistema iniciador da lipoperoxidação, o valor encontrado para os níveis de MDA foram iguais para os dois tipos de vesículas, 0,45 $\pm$ 0,06 e 0,45 $\pm$ 0,07 nmol MDA/ μ mol LC para Fe-FCL e FCL, respectivamente.

Astaxantina foi o mais eficiente antioxidante, pois suprimiu 26% no sistema H₂O₂ em Fe-FCL (figura 24). Peridinina mostrou menor inibição no processo de oxidação lipídica (17,7%) sugerindo que, em razão de sua incorporação na bicamada, poderia ter limitado a permeação do agente da peroxidação H₂O₂ nesses experimentos. Por outro lado, o licopeno mostrou evidências de aumento

na permeabilidade de membrana a H_2O_2 e t -ButOOH, pois um aumento de cerca de 21% na concentração de MDA foi observado para os dois agentes. Quando ascorbato 1 mM foi adicionado a Fe-FCL, a peridinina limitou a lipoperoxidação em valores comparados ao da astaxantina (33,5 e 46,4%, respectivamente). O licopeno foi o único capaz de proteger as membranas dos lipossomos quando o ascorbato foi usado como promotor da peroxidação (17,4% menor que o controle).

5.4. O efeito do crescimento das culturas de *Linquodinium polyedrum*, *Minutocellus polymorphus* e *Tetraselmis gracilis* na concentração dos pigmentos e atividade de SOD.

Como foi descrito nos resultados e mostrado na figura 25 A, B e C, *M. polymorphus* exibiu a maior taxa de divisão celular. O primeiro pico de atividade de SOD registrado para as três espécies estudadas (figura 26 A, B e C) pode estar associado com estresse localizado no cloroplasto como consequência de uma intensa atividade fotossintética característica da fase exponencial em culturas unicelulares, enquanto o segundo pico, obtido apenas para *L. polyedrum* e *M. polymorphus*, pode estar relacionado a condições dominantes fotorespiratórias como nutrientes, tornando-se limitante no meio de cultura. Sob essas circunstâncias, a fixação de CO_2 é também limitada e pode resultar em acumulação de ERO com mais elétrons indo para o oxigênio (Dat *et al* 2000). Para *L. polyedrum*, é provável que a indução de SOD seja resultado de uma aclimação aos elevados níveis de ERO (especialmente $O_2^{\cdot-}$) como consequência do envelhecimento da cultura.

Em Dinophyceae, a peridinina está associada ao complexo solúvel em água chamado “peridinin-chlorophyll protein” (PCP), o qual passa energia luminosa com 90% de eficiência, demonstrando sua grande habilidade em transferir energia para moléculas de clor-*a* (Larkum 1996). Além disso, considerando a constante tendência de decréscimo da clor-*a* e do β -caroteno ao longo das curvas de crescimento, os níveis de peridinina aumentam na fase estacionária (figura 27), demonstrando ser uma estratégia antioxidante frente ao possível desbalanço

oxidativo. Uma hipótese para o aumento da peridinina pode ser causado mais em razão ao envelhecimento e dos níveis elevados de toxinas secretadas do que da fotoaclimação provocada pelos níveis baixos de intensidade de luz quando as culturas apresentam alta densidade celular.

A redução dos níveis de clor-*a* logo no término da fase exponencial em *T. gracilis* e *M. polymorphus* (figura 28 **A** e **B**) pode estar associada com a depleção de nutrientes e reduzida atividade fotossintética (Geider *et al* 1993), enquanto que o subsequente aumento na concentração de clor-*a* durante a fase estacionária de *T. gracilis* poderia ser relacionada a fotoaclimação em condições de sombreamento devido ao aumento na densidade da cultura.

As três espécies apresentaram diferentes estratégias para enfrentar o estresse oxidativo em face do envelhecimento da cultura. As respostas exibidas por cada espécie pareceram ser função de fatores que estão influenciando mais seu balanço oxidativo, como a luz ou limitação de nutrientes.

5.5. O efeito do sombreamento nas culturas de *Amphidinium carterae* e *Nitzschia microcephala* sob a concentração dos pigmentos, tiamina, grupos tióis de proteínas e atividade de SOD.

As figuras 29 **A** e **B** mostram a curva de crescimento para as duas espécies. Em concentrações celulares baixas, as culturas crescem vagarosamente para ambas espécies. Na cultura mais concentrada de *N. microcephala* (10^5 células/ml), o máximo da fase exponencial é alcançada após o 6º dia, enquanto as outras duas culturas menos densas atingem o máximo no 8º dia. Contudo, nenhuma das culturas de *A. carterae* atingiram o auge da fase exponencial.

No geral, em ambas espécies percebe-se que o estresse oxidativo cresce com o tempo, pois a atividade de SOD aumenta (figura 29 **c** e **d**). A atividade de SOD foi mais baixa nas culturas mais densas (alta concentração) talvez em razão do efeito de sombreamento, o qual faz as culturas diminuírem a atividade

fotossintética (Barros *et al* 2003). Nas culturas de baixa e média concentração a atividade foi maior, pois não há o efeito de sombreamento.

Os níveis de grupos -SH de proteínas diminuem (figura 29 e e f). Contudo, na cultura mais densa, nota-se que os níveis de -SH voltam subir a partir do 4º dia.

Como pode ser visto na figura 30, o método proposto para análise de tiamina e seus ésteres fosfatos nas algas estudadas foi eficiente. Em *A. carterae*, os níveis de TL corrigidos pelos níveis protéicos decrescem em função do tempo para as densidades média e alta (figura 31a). Contudo, para a densidade baixa, há um declínio de TL no início do experimento e, após o dia 2, os níveis de TL praticamente alcançam o valor inicial. Para TMF e TDF não foram obtidos resultados que indicassem nenhuma tendência (figura 31c e e). Os resultados podem indicar que *A. carterae* não é capaz de interconverter tiamina livre nas suas formas ésteres fosfatos e que a TL necessária para o seu crescimento é obtida apenas por captação do meio f/2. Contrariamente, os níveis de TL, TMF e TDF aumentaram em *N. microcephala*, sugerindo que essa diatomácea é provavelmente capaz de sintetizar TL e interconvertê-la nas suas diferentes formas fosfatadas (figura 31b, d e f). De fato, *Nitzschia sp.* e outras diatomáceas são usadas para alimentar fases larvais de crustáceos, pois apresentam grande variedade de ácidos graxos e vitaminas, incluindo tiamina (Brown *et al* 1999 e Wen & Chen 2002).

A alta taxa de divisão celular nas culturas de *Nitzschia* poderia indicar estímulo da biossíntese de pigmentos para melhorar o desempenho da captação de luz, pois o sombreamento provocado pela alta densidade celular prejudicaria a fotossíntese. Contudo, houve decréscimo nos níveis da maioria dos pigmentos (figuras 32 e 33). Uma hipótese para isso é que a diminuição de Clor-*a*, Clor-*c* e fucoxantina foi o resultado da falta de nutrientes e aumento da concentração de substâncias tóxicas excretadas pelas células, e não da aclimação à intensidade luminosa.

A peridininina e fucoxantina (figura 33a e b) seguiram a mesma tendência que a Clor-*a* (figura 32a e b) porque estão presentes nos pigmentos antenas chamados PCP (exclusivamente encontrados em dinoflagelados, Hofmann *et al* 1996) ou “fucoxanthin-Chl *a/c* protein” (FCP, Lang & Kroth 2001), respectivamente. Os níveis de β -caroteno para as duas espécies, seguindo a mesma hipótese, também mostraram a mesma tendência que as clorofilas *a* e *c*. Este carotenóide em conjunto com as duas clorofilas, fazem parte dos chamados “light-harvesting complex” (LHCs) presentes no fotosistemas I e II (Farber & Jahns 1998). Uma fraca tendência de queda dos níveis dos pigmentos Clor-*a* e peridininina em relação ao número de células foi observada para as culturas de *Amphidinium*. Essa fraca tendência talvez seja consequência da menor taxa de divisão celular e menor consumo de nutrientes quando comparada com *Nitzschia*. As diferenças entre as duas espécies podem provavelmente ser atribuídas ao crescimento mais acelerado de *Nitzschia*, pois esta espécie atinge a fase estacionária e *Amphidinium* não.

Plantas e algas possuem o ciclo das xantofilas para se proteger do excesso de intensidade luminosa. Nessa situação de estresse, zeaxantina é convertida a violaxantina em plantas e a diatoxantina a diadinoxantina em algas (Lohr & Wilhelm 1999). Para *Amphidinium*, os níveis de diadinoxantina cresceram cerca de 6 vezes do dia 0 ao dia 04 para a cultura com baixa densidade, seguida de queda até o final do experimento (figura 33e). Apesar de um aumento no começo, para as outras densidades não houve mudanças após o dia 2. Os níveis de diatoxantina não apresentaram relação com os encontrados para diadinoxantina. Isso sugere que o ciclo das xantofilas pode não ter sido empregado diante dessa situação de desbalanço.

Foi sugerido que diadinoxantina é precursora de fucoxantina (Lohr & Wilhelm 1999). Nossos resultados indicam que os baixos níveis de diadinoxantina e a constante queda ao longo do experimento seja um desvio da biossíntese para a produção de fucoxantina, necessária para captação de luz nos LPCs. Outro resultado que corrobora com isso foram os níveis de diatoxantina, precursora de

diadinoxantina (Olaizola & Yamamoto 1994), muito mais baixos em *Nitzschia* do que em *Amphidinium*, sendo indetectáveis no dia 0 para as três densidades, e no dia 2 para a densidade baixa.

5.6. Tratamento das culturas de *Lingulodinium polyedrum* com metais poluentes.

Os dinoflagelados atuam como produtores primários ou consumidores na cadeia trófica, além de participarem de eventos de marés vermelhas. Apesar da grande importância ecológica e econômica dos dinoflagelados, poucos estudos de ecotoxicologia têm sido realizados com espécies dessa divisão. Nosso trabalho representa um dos primeiros estudos comparativos dos efeitos tóxicos dos metais pesados no balanço redox do dinoflagelado *L. polyedrum*.

Com base nos resultados mostrados na figura 34 sugerimos que o distúrbio oxidativo causado pelos metais poluentes é, de certa forma, controlada pela atividade antioxidante que os carotenóides desempenham. Além disso, verificamos um aumento na atividade de algumas enzimas envolvidas nas defesas antioxidantes da célula, como SOD, CAT e Apx (resultados apresentados na tese de doutorado do Dr. Oswaldo Keith Okamoto 2000).

Quando as células foram expostas a uma condição aguda aos metais mencionados no item 5.3., notou-se que a concentração de β -caroteno praticamente dobra (figura 34A). Isto pode implicar em um aumento da biossíntese, visto que o tempo em que as células são expostas é relativamente pequeno. Já no tratamento crônico, não há aumento significativo da concentração de β -caroteno. Contudo, no tratamento crônico, nota-se que a concentração de peridinina cai significativamente (figura 34B), mostrando que este pigmento pode possuir papel importante na defesa celular.

Estes resultados corroboram com a hipótese de que a peridinina possui importantes funções antioxidantes na célula, seja suprimindo $O_2 (^1\Delta_g)$ ou atuando como antioxidante de ERO geradas em células tratadas com metais.

5.7. Efeito dos cátions Cd^{2+} e Cu^{2+} na macroalga *Gracilaria tenuistipitata*.

Para investigar as respostas do sistema redox de *G. tenuistipitata* após a exposição a Cu^{2+} e Cd^{2+} , os níveis dos carotenóides β -caroteno e luteína, e a atividade de SOD, Apx e CAT foram medidos. O crescimento das culturas e os níveis de β -caroteno e luteína após a adição de Cu^{2+} e Cd^{2+} aumentaram (figura 35 e 37, respectivamente). A luteína foi o mais abundante carotenóide em *G. tenuistipitata*.

A luteína é formada a partir do β -caroteno e por isso a regulação dos níveis de carotenóides ocorre provavelmente antes do β -caroteno. Além da sua função como pigmento que auxilia a coleta de luz na fotossíntese, os carotenóides atuam como antioxidantes e estabilizadores de membrana (Havaux 1998). A adição de Cu^{2+} aumentou a atividade de Apx, SOD and CAT (figura 40 A, B e C). Em contrapartida, a adição de Cd^{2+} causou apenas um aumento na atividade de CAT e uma tendência de aumento, não significativa, para a SOD (figura 40 A).

Surpreendentemente, o crescimento da cultura algal com a adição de Cu^{2+} e Cd^{2+} aumentaram os níveis celulares de clor-*a* (figura 36B). Um decréscimo de clor-*a* era esperado, pelo menos após a adição de Cu^{2+} , porque essa diminuição causaria uma redução no fluxo de elétrons na fotossíntese e então reduziria potencialmente a reação de Mehler (Asada 1999). Uma possível explicação poderia ser que a clor-*a*, pelo menos em parte, é usada como estoque de nitrogênio e os baixos níveis do controle são causados pela alta taxa de crescimento.

A alta atividade das enzimas CAT, SOD e APx e os altos níveis celulares de carotenóides após a adição de Cd^{2+} e Cu^{2+} sugere que os danos aos lipídeos e proteínas (figuras 38 e 39, respectivamente) não foram provocados por avarias no sistema responsável pela redução dos níveis de ERO. Ao contrário, os danos oxidativos foram provavelmente provocados pelo estresse oxidativo em razão do aumento da produção de ERO apesar do controle exercido pelas enzimas antioxidantes e pelo alto nível de carotenóides. Uma hipótese para explicar esses resultados seria que a alta atividade das SOD, CAT e APx e o elevado nível de

carotenóides melhoram a tolerância intracelular a Cu^{2+} e Cd^{2+} . Nas algas vermelhas *Mastocarpus stellatus* e *Chondrus crispus* uma correlação entre um metabolismo eficiente para as ERO e tolerância ao estresse oxidativo foi recentemente descrita (Collén & Davison 1999). As diferentes respostas das enzimas supressoras das ERO para Cu^{2+} e Cd^{2+} podem ser em razão dos diferentes mecanismos de ação desses metais. Foi sugerido que o Cu^{2+} (além do Zn^{2+} e Pb^{2+}) interage diretamente com as membranas tilacóides, enquanto o Cd^{2+} (e Ni^{2+}) interfere com outros processos metabólicos em plantas (Szalontai *et al.* 1999). Como supostamente o Cu^{2+} induz o estresse oxidativo nos cloroplastos, um aumento na atividade de Apx, principalmente Apx cloroplástica, possibilitará uma maior eficiência no controle dos efeitos desse metal. Uma indução na atividade da SOD também enzimaticamente reduzirá a concentração de $\text{O}_2^{\cdot-}$ formado no cloroplasto, controlando dessa maneira os riscos da formação de $\cdot\text{OH}$ através do ciclo entre Cu^+ e Cu^{2+} . Por outro lado, o Cd^{2+} pode causar um estresse inespecífico por todo o citoplasma e por isso a atividade específica da CAT pode ser um mecanismo eficiente para reduzir os níveis de ERO.

Quanto aos ácidos graxos (figura 41), nota-se que os níveis do ácido eicosatetraenóico ($\text{C}_{20:4}$ (n-6)) aumentaram cerca de 30% no tratamento com Cd^{2+} provavelmente para preservar a integridade de membrana em resposta ao desbalanço redox provocado por esse metal. Em contrapartida, os níveis de $\text{C}_{20:4}$ (n-6) decaíram cerca de 15% no tratamento com Cu^{2+} , mostrando a especificidade desse metal em atingir os tilacóides. Uma hipótese para o aparecimento do ácido octadecatrienóico, o qual foi detectado apenas no tratamento com Cu^{2+} , é que provavelmente a biossíntese foi de alguma maneira desviada para a produção desse ácido na tentativa de manter a integridade da membrana frente a oxidação de $\text{C}_{20:4}$ (n-6).

5.8. Variação de ácidos graxos, pigmentos e MDA durante o ciclo luz:escuro em Lingulodinium polyedrum.

As reações primárias da fotossíntese em plantas superiores e algas envolvem a absorção da energia luminosa pelos pigmentos presentes nos sistemas antenas seguido de transferência de energia de excitação para os centros de reação dos fotossistemas I e II. Nesse processo, a luz gera estados tripletes da clorofila, os quais podem interagir com oxigênio molecular para produzir $O_2 (^1\Delta_g)$, que é uma espécie oxidante capaz de destruir a própria clorofila bem como lipídeos, ácidos nucleicos e proteínas (Cogdell, 1985). Mesmo com as precauções exercidas pela regulação da fotossíntese, a geração limitada de O_2^{*} como produto do transporte de elétrons é inevitável e uma consequência potencialmente útil da operação do sistema de transporte fotossintético em ambiente contendo oxigênio molecular (Foyer *et al.*, 1996).

A fluidez dos tilacóides é essencial para os processos fotossintéticos envolvendo difusão lateral, rotacional e transmembrana (Gournaris *et al.* 1983). Contudo, essa fluidez pode aumentar a vulnerabilidade das membranas a alta intensidade luminosa e a elevadas temperaturas. A sensibilidade dos lipídeos de membrana aos danos da peroxidação lipídica causadas por ERO, as quais podem ser produzidas em grandes quantidades no cloroplasto sob condições de estresse, é proporcional aos seus níveis de insaturação (Havaux, 1998). Nossos resultados envolvendo a concentração de ácidos graxos mostraram que *L. polyedrum* aumentou a biossíntese de C22:6 durante a fase clara e apresentou um pico de C18:3 no meio da fase clara, talvez para compensar a peroxidação e manter a integridade e homeostase celular (figura 45B e C). Não se sabe se essas mudanças são orquestradas por um relógio biológico endógeno ou se é uma resposta direta da luz oriunda do ambiente. Os níveis de β -Caroteno/Clor-*a* confirmaram a variação descrita pelo nosso grupo anteriormente (Di Mascio *et al.*, 1995), o qual exibiu um pico no meio do dia. Já os níveis de peridinina/clor-*a* não mudaram, resultado que corroborou com Knoetzel & Rensing (1990b). Mesmo

sendo a peridininina um supressor de $O_2 (^1\Delta_g)$ e o principal carotenóide presente em *L. polyedrum* (44% dos carotenóides totais), e o β -caroteno apresentando um pico durante o dia no mesmo organismo (Di Mascio *et al* 1995), as células ainda precisam se proteger contra as ERO, ora aumentando a biossíntese de ácidos graxos ora inibindo a sua taxa de degradação.

O $O_2^{\bullet-}$ e o $O_2 (^1\Delta_g)$ são mais produzidos durante o dia como resultado da luz gerando clorofila triplete e na cadeia de transporte de elétrons no cloroplasto, causando mais peroxidação lipídica nos ácidos graxos presentes na membrana (Foyer *et al* 1996). A respeito da formação de MDA, nossos resultados se encaixam nessa hipótese (figura 45A), pois os seus níveis apresentam um pico durante a fase de luz. Quando a luz está ausente, os níveis de MDA caem nitidamente, permanecendo constante durante toda a fase de escuro. A rápida redução de MDA imediatamente após o início da fase escura indica uma rápida degradação de lipoperóxidos. Foi observado que os níveis medidos de MDA no extrato de *L. polyedrum* são maiores na fase clara. Nossos resultados são as primeiras evidências que cloroplastos e as membranas celulares são mais intensamente atacados por ERO durante o dia. Em razão dos danos provocados pela luz durante a fase clara, fontes adicionais de estresse oxidativo podem mais facilmente causar destruição letal das membranas.

6. CONCLUSÕES

As informações contidas nesta tese permitem concluir que a peridinina, e não só o β -caroteno, possui grande importância nos mecanismos protetores contra ERO e $O_2 (^1\Delta_g)$ na microalga *L. polyedrum*. Por ser um pigmento solúvel em meio aquoso e apresentar estrutura molecular com 11 ligações duplas conjugadas, este carotenóide pode tanto suprimir espécies no estado singlete ou servir como supressor (“scavenger”) de ERO. Deve-se considerar que o fato de ser solúvel em meio fisiológico facilita a sua disponibilidade e com isso o seu poder antioxidante no interior dos tilacóides. Contudo, quando inserido nas membranas de lipossomos de fosfatidilcolina, a peridinina, assim como a astaxantina, aumentou a rigidez dessas membranas, impedindo que iniciadores da peroxidação lipídica penetrassem e iniciassem as reações que geram ERO.

Esta tese apresenta duas metodologias adequadas para a extração e análise de carotenóides e tiamina e seus ésteres fosfatos por HPLC. Estes métodos estão sendo utilizados com sucesso para diferentes espécies de micro e macroalgas para o estudo da interconversão de tiamina e da biossíntese de carotenóides.

Os resultados encontrados a respeito da biossíntese de carotenóides abrem novas perspectivas para a compreensão dos mecanismos bioquímicos e fisiológicos adotados por algas marinhas cultivadas em determinadas condições que simulam o estresse ambiental onde vivem. Quando as micro e macroalgas foram estudadas frente a algumas situações de desbalanço redox, diferentes respostas foram encontradas para a biossíntese de carotenóides e para o sistema de defesa enzimático, mostrando que as estratégias de defesa contra ERO podem variar nas diferentes espécies e conforme o estímulo empregado.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abrahams, L.V. & Townsend, L.D. (1993). Bioluminescence of dinoflagellates: a test of the burglar alarm hypothesis. *Ecology* 74: 258-260.

Aebi, H. (1984). Catalase in vitro. *Methods Enzymol.*, 105:121-126.

Anderson, D.M., Kulis, D.M., and Binder, B.J. (1984). Sexuality and cyst formation in the dinoflagellate *Gonyaulax tamarensis*: Cyst yield in batch cultures. *J. Phycol.*, 20: 418-425.

Armstrong, G. & Hearst, J. E. (1996). Genetics and molecular biology of carotenoid pigment biosynthesis. *FASEB J.* 10, 228-237.

Armstrong, G. A., Hundle, B. S. & Hearst, J. E. (1993). Evolutionary conservation and structural similarities of carotenoid biosynthesis gene product from photosynthetic and nonphotosynthetic organisms. *Methods Enzymol.* 214, 297-311.

Asada *et al.* (1980). In: Bannister, J.V. & Hill, H.A.O. [Eds]. Chemical and biochemical aspects of superoxide and superoxide dismutase. Elsevier/North Holland, NY.

Asada, K., and Takahashi, M. (1987) Production and scavenging of active oxygen in photosynthesis. In: Kyle, D.J., Osmond, C., Arntzen, C.J. (eds) *Photoinhibition*. Elsevier, New York, p. 227.

Asada K. (1999). The water-water cycle in chloroplasts: Scavenging of active oxygens and dissipation of excess photons. *Annu Rev Plant Phys* 50: 601-639.

Babish & Stotzky (1985). Heavy metal toxicity to microbe-mediated ecologic processes: a review and potential application to regulatory policies. *Environ. Res.* 36: 111.

Baggiolini & Thelen (1991). In: *Oxidative stress: oxidants and antioxidants*. Sies H [Ed]. Academic Press. London. pp. 399.

Barros MP, Pedersen M, Colepicolo P, Snoeijs P. (2003). Self-shading protects phytoplankton communities against H₂O₂-induced oxidative damage. *Aquatic Microbial Ecology* 30 : 275-282.

Bell, J. G., McEvoy, J., Tocher, D. R. & Sargent, J. R. (2000). Depletion of alpha-tocopherol and astaxanthin in Atlantic salmon (*Salmo salar*) affects autoxidative defense and fatty acid metabolism. *J. Nutr.* 130, 1800–1808.

Bird, C. J., Rice E. L., Murphy C. A., Liu Q. Y. & Ragan M. A. (1990). Nucleotide sequences of 18S ribosomal RNA genes from the red algae *Gracilaria tikvahiae* McLachlan, *Gracilaria verrucosa* (Hudson) Papenfuss and *Gracilariopsis* sp. *Nucleic Acids Res.* 11;18:4023.

Bondia-Martinez E., Lopez-Sabater M.C., Castellote-Bargallo A.I., et al. (1998). Fatty acid composition of plasma and erythrocytes in term infants fed human milk and formulae with and without docosahexaenoic and arachidonic acids from egg yolk lecithin. *Early Hum Dev* 53: S109-S119.

Bowler, C., Van Montagu, M. & Inzé, D. (1992). Superoxide dismutase and stress tolerance. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 43: 83-116.

Bradford, M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-54.

Bralet J., Schreiber, L. & Bouvier, C. (1992). Effect of acidosis and anoxia on iron delocalization from brain homogenates. *Biochem. Pharmacol.* 43, 979-983.

Britton, G. (1995). Structure and properties of carotenoids in relation to function. *FASEB J.* 9, 1551–1558.

Britton, G., Liaaen-Jensen, S., & Pfander, H. (1995). in *Carotenoids: Isolation and Analysis* (Britton, G., Liaaen-Jensen, S., and Pfander, H., Eds.), pp. 13–17. Birkhäuser, Basel.

Brown, M. R., Mular, M., Miller, I., Farmer, C., & Trenerry, C. (1999). The vitamin content of microalgae used in aquaculture. *J. Appl. Phycol.* 11, 247–255.

Burdon, R.H. (1996). Control of cell proliferation by reactive oxygen species. *Biochem. Soc. Trans.* 24: 1028-1032.

Burton, G. W., & Ingold, K. U. (1984). Beta-carotene - An unusual type of lipid antioxidant. *Science* 224, 569–573.

Castelli, F., Caruso, S., and Giuffrida, N. (1999). Different effects of two structurally similar carotenoids, lutein and beta-carotene, on the thermotropic behaviour of phosphatidylcholine liposomes. Calorimetric evidence of their hindered transport through biomembranes. *Thermochim. Acta* 327, 125–131.

Chiang, Y. M. & Lin, J. L. (1989). Nitrate uptake by nitrogen-starved plants of the red alga *Gracilaria tenuistipitata* var. *liui*. Jpn. J. Phycol. 37: 187-93.

Cogdell R.J. (1985). Carotenoids in photosynthesis. Pure Appl Chem 57 : 723-728.

Collen J. & Davison I.R. (1999). Stress tolerance and reactive oxygen metabolism in the intertidal red seaweeds *Mastocarpus stellatus* and *Chondrus crispus*. Plant Cell Environ 22 : 1143-1151.

Conn, P. F., Schaich, W., & Truscott, T. G. (1991). The singlet oxygen and carotenoid interaction. J. Photochem. Photobiol. B Biol. 11, 41-47.

Courgeon, A., Maisonnhaute, C. & Best-Belpomme, M. (1984). Heat shock proteins are induced by cadmium in *Drosophila* cells. Exp. Cell. Res., 153: 515-521.

Crichtley (1993). In: Ohno, M & Crichtley, M [Eds]. Seaweed cultivation and marine ranching. Jica, Yokosuka, Japan, pp 89.

Dat, J., Vandenabeele, S., Vranova, E., et al. (2000). Dual action of the active oxygen species during plant stress responses. Cell Mol Life Sci 57 : 779-795.

Davies, A.G. (1978). Pollution studies with marine plankton part II. Heavy metals. Adv. Mar. Biol. 15: 381-508.

Davison, I. R. & G. A. Pearson (1996). Stress tolerance in intertidal seaweeds: a review and preview. J. Phycol. 32: 197-211.

Dawson, R. M. C., Elliott, D. C., Elliott, W. H. and Jones, K. M. (1986). Data for Biochemical Research, 3rd. edition, Clarendon Press, Oxford.

DeJesus, M. D., Tabatabai, F. & Chapman, D. J. (1989). Taxonomic distribution of CuZn-superoxide dismutase in green algae and its phylogenetic importance. J. Phycol. 25: 767-772.

Devasagayam, T. P. A., Werner, T., Ippendorf, H., Martin, H. D., and Sies, H. (1992) Photochem. Photobiol. 55, 511-514.

Devi, S.R., Prasad, M.N.V. (1998) Copper toxicity in *Ceratophyllum demersum* L. (Coontail), a free floating macrophyte: response of antioxidant enzymes and antioxidants. Plant Science. 138: 157-165.

Di Mascio, P., Catalani, L. H., and Bechara, E. J. H. (1992). Are dioxetanes chemiluminescent intermediates in lipoperoxidation. Free Radic. Biol. Med. 12, 471-478.

- Di Mascio, P., Hollnagel, H.C., Sperança, M., Colepicolo, P. (1995) Diurnal rhythm of β -carotene in the photosynthetic alga *Gonyaulax polyedra*. Biol. Chem. Hoppe-Seyler, 376: 287-301
- DiMascio, P., Kaiser, S., and Sies, H. (1989). Lycopene as the most efficient biological carotenoid singlet oxygen quencher. Arch. Biochem. Biophys. 274, 532–538.
- Dogbo, O. Lafarrière, A., D'Harlingue, A. & Camara, B. (1988). Carotenoids biosynthesis: Isolation and characterization of a bifunctional enzyme catalyzing the synthesis of phytoene. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 85, 7054-7058.
- Esterbauer H, Lang J, Zdravcevic S, Slater TV (1984): Detection of malonaldehyde by high performance liquid chromatography. Methods Enzymol. 105, 319-329.
- Farber, J.L., Kyle, M.E. & Coleman, J.B. (1990). Biology of disease. Mechanisms of cell injury by activated oxygen species. Lab. Invest. 62, 670-678.
- Farber A. & Jahns P. (1998). The xanthophyll cycle of higher plants: influence of antenna size and membrane organization. Biochim. Biophys. Acta. 1363, 47–58.
- Foot C.S., Chang Y.C., Denny R.W. (1970). Chemistry of singlet oxygen. 10. Carotenoid quenching parallels biological protection. J Am Chem Soc 92 : 5216-&.
- Foyer, C.H. (1996) Free radical processes in plants. Biochem. Soc. Trans. 24: 427-433.
- Freeman, B.A. & Crapo, J.D. (1982). Biology of disease: free radicals and tissue injury. Lab. Invest. 47: 412-426.
- Fridovich, I. (1974). Superoxide dismutases. Adv. Enzymol. 41: 35-97.
- Fridovich, I. (1982). Superoxide dismutases in biology and medicine. In: Pathology of oxygen. Academic Press, N.Y.
- Fridovich, I. (1986). Superoxide dismutases. Adv. Enzymol. 58: 61-97.
- Fridovich, I. (1997) Superoxide anion radical ($O_2^{\bullet -}$), superoxide dismutases, and related matters. J. Biol. Chem. 250: 18515-18517.
- Fridovich, I. (1998): Oxygen toxicity: A radical explanation. J. Exp. Biol. 201, 1203–1209.

Geider, R.J., Greene, R.M., Kolber, Z., et al. (1993). Fluorescence assessment of the maximum quantum efficiency of photosynthesis in the western north-atlantic. Deep-sea Res pt I 40 : 1205-1224.

Gibbs, S. (1981). The chloroplasts of some algal groups may have evolved from endosymbiotic eukaryotic algae. Ann. NY Acad. Sci. 361: 193-208.

Gibson, J. A. E, Garrick, R. C., Burton, H. R. & McTaggart, A. R. (1990). Dimethyl sulfide and the alga *Phaeocystis pouchettii* in antarctic coastal waters. Mar. Biol., 104, 339-346.

Goes, J. I., Handa, N., Taguchi S. & Hama T. (1994). Effect of UV-B radiation on the fatty acid composition of the marine phytoplankton *Tetraselmis* sp.: relationship to cellular pigments. Mar. Ecol. Prog. Ser. 114, 259–274.

Goes, J. I., Handa N., Taguchi S., Hama T. & Saito H. (1996). Metabolism of neutral monosaccharide constituents of storage and structural carbohydrates in natural assemblages of marine phytoplankton exposed to ultraviolet radiation. Limnol. Oceanogr. 41, 1478-1489.

Goodwin, T. W. (1988). Plant pigments, Academic Press Inc., Londres.

Gounaris, K. & Barber, J. (1983). Monogalactosyldiacylglycerol: the most abundant polar lipid in Nature. Trends Biochem. Sci. 8: 378-381.

Grill, E. & Winnacker, E.L. (1985). Phytochelatins: the principal heavy-metal complexing peptides of higher plants. Science 230: 674-676.

Guillard R. R. L. (1975). Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates. In: Smith WL, Chanley MH (eds) Culture of marine invertebrate animals. Plenum Pub. Corp., New York. pp. 29-60.

Guillard, R. R. L. & Ryther, J. (1962). Studies on marine planktonic diatoms. I. *Cyclotella nana* Hustedt and *Detonula confervacea* (Cleveland). Can. J. Microbiol. 8: 229-39.

Guo Q. & Packer L. (2000). Ascorbate-dependent recycling of the vitamin E homologue trolox by dihydrolipoate and glutathione in murine skin homogenates. Free Radical Bio Med 29 : 368-374.

Gutteridge, J. M. C. (1987). Ferrous-salt-promoted damage to deoxyribose and benzoate - The increased effectiveness of hydroxyl-radical scavengers in the presence of EDTA. Biochem. J. 243, 709–713.

Häder, D. P. (1996). Effects of enhanced solar UV-B radiation on phytoplankton. *Sci. Mar.* 60 Suppl. 1, 59-63.

Haglund K. & Pedersén M. (1993) Outdoor pond cultivation of the subtropical marine red alga *Gracilaria tenuistipitata* in brackish water in Sweden. Growth, nutrient uptake, co-cultivation with rainbow trout and epiphyte control. *Journal of Applied Phycology* 5, 271-284.

Haglund K., Björklund M., Gunnare S., Sandberg A., Olander U. & Pedersén M. (1996) New method for toxicity assessment in marine and brackish environments using the macroalga *Gracilaria tenuistipitata* (Gracilariales, Rhodophyta). *Hydrobiologia* 326/327, 317-325.

Halling-Sorensen, B.; Nyholm, N.; Kusk, K.O. & Jacobsson, E. (2000) Influence of nitrogen status on the bioconcentration of hydrophobic organic compounds to *Selenastrum capricornutum*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 45, 33-42.

Halliwell, B. (1987) Oxidants and human disease: some new concepts. *FASEB J.* 1, 358-364.

Halliwell B. & Gutteridge, J. M. C. (1999) *Free radicals in Biology and Medicine*, 3rd ed., Oxford University Press, Oxford, 936 pp.

Han, T.M. & Runnegar, B. (1992) Megascopic eukaryotic algae from the 2.1 billion-year-old Negaunee Iron-Formation. *Science*. 257: 232-235.

Hassan, H. M. (1988). Biosynthesis and regulation of superoxide dismutases. *Free Rad. Biol. Med.* 5: 377-385.

Hastings, J. W., Astrachan, L. & Sweeney, B. M. (1961). A persistent daily rhythm in photosynthesis. *J. Gen. Physiol.* 45: 69-76.

Haugan, J. A. & Liaaen-Jensen, S. (1989). Improved isolation procedure for fucoxanthin. *Phytochemistry*, 28, 2797-2798.

Havaux M. (1998). Carotenoids as membrane stabilizers in chloroplasts. *Trends in Plant Science* 3, 147-151.

Helbling, E. W., Villafane, V., Ferrario, M. & Holm-Hansen O. (1992). Impact of natural ultraviolet radiation on rates of photosynthesis and on specific marine phytoplankton species. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 80, 89-100.

Helbling, E. W., Eilertsen H.C., Villafane V. & Holm-Hansen O. (1996). Effects of UV radiation on post-bloom phytoplankton populations in Kvalsund, North Norway. *J. Photochem. Photobiol.* 33, 255-259.

- Herrmann H., Häder D. P., Köfferlein M., Seidlitz H. K. & Ghetti F. (1996). Effects of UV radiation on photosynthesis of phytoplankton exposed to solar simulator light. *J. Photochem. Photobiol. B.* 34, 21-28
- Herzog, M. & Maroteaux, L. (1986). Dinoflagellate 17S rRNA sequence inferred from the gene sequence: evolutionary implications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83: 8644-8648.
- Hessen D. O., DeLange H. J. & Van Donk, E. (1997). UV-induced changes in phytoplankton cells and its effects on grazers. *Freshwater Biol.* 38: 513-524.
- Hofmann E., Wrench P.M., Sharples F.P., Hiller R.G., Welte W. & Diederichs K., (1996). Structural basis of light harvesting by carotenoids: peridinin-chlorophyll-protein from *Amphidinium carterae*. *Science*, 272 :1788-1791.
- Hollnagel H.C., Di Mascio P., Asano C.S., Okamoto O.K., Stringer C.G., Oliveira M.C. & Colepicolo P. (1996). The effect of light on the biosynthesis of beta-carotene and superoxide dismutase activity in the photosynthetic alga *Lingulodinium polyedra*. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 29:105-10.
- Holm-Hansen, O. (1969). Algae: amounts of DNA and carbon in single cells. *Science* 163: 87-88.
- Homma, K. & Hastings, J.W. (1989). Cell growth kinetics, division asymmetry, and volume control at division in the marine dinoflagellate *Lingulodinium polyedra*: a model of circadian clock control of the cell cycle. *J. Cell Sci.* 92: 303-318.
- Hoshino, T., Fujii, R. & Nakahara, T. (1993). Molecular cloning and sequence analysis of the *crtB* gene of *Thermus thermophilus* HB27, an extreme thermophile producing carotenoid pigment. *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 3150-3153.
- Jamal, I.S. & Sprowls, J.J. (1987). Effects of cadmium and dietary selenium on cytoplasmic and mitochondrial antioxidant defense systems in the heart of rats fed with high dietary copper. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 87: 102-110.
- Jeffrey, S.W., Mantoura, R.F.C. & Wright, S.W., (1997). Phytoplankton pigments in oceanography: guidelines to modern methods. Unesco, Paris.
- Johansen, J. E., Svec, W. A. & Liaaen-Jensen (1974). Carotenoids of the Dinophyceae. *Phytochemistry*, 13, 2261-2271.
- Junghans, A., Sies, H., and Stahl, W. (2000). Carotenoid containing unilamellar liposomes loaded with glutathione: a model to study hydrophobic-hydrophilic antioxidant interaction. *Free Rad. Res.* 33, 801–808.

Kaneko, T., Kaji, K., and Matsuo, M. (1994). Protection of linoleic-acid hydroperoxide-induced cytotoxicity by phenolic antioxidants. *Free Radic. Biol. Med.* 16, 405–409.

Khan, A.U. & Wilson, T. (1995). Reactive oxygen species as cellular messengers. *Chemistry & Biology* 2: 437-445.

Kim, E.J., Chung, H.J., Suh, B., Hah, Y.C. & Roe, J.H. (1998). Expression and regulation of the *sodF* gene encoding iron and zinc-containing superoxide dismutase in *Streptomyces coelicolor* Muller. *J. Bacteriol.* 180: 2014-2020.

Knoetzel, J. & Rensing, L. (1990a). Characterization of the photosynthetic apparatus from the marine dinoflagellate *Gonyaulax polyedra* .1. pigment and polypeptide composition of the pigment-protein complexes. *J Plant Physiol* 136 : 271-279.

Knoetzel J. & Rensing L. (1990b). Characterization of the photosynthetic apparatus from the marine dinoflagellate *Gonyaulax polyedra* .2. circadian rhythmicity of photosynthesis and the supramolecular organization of pigment-protein complexes. *J Plant Physiol* 136 : 280-288.

Kodavanti, P.R.; Derr-Yellin, E.C.; Mundy, W.R.; Shafer, T.J.; Herr, D.W.; Barone, S.; Choksi, N.Y.; MacPhail, R.C. & Tilson, H.A. (1998). Repeated exposure of adult rats to Aroclor 1254 causes brain region-specific changes in intracellular Ca^{2+} buffering and protein Kinase C activity in the absence of changes in tyrosine hydroxylase. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 153 (2), 186-198.

Kostic, M.M., Ognjanovic, B., Dimitrijevic, S., Zikic, R.V., Stajn, A., Rosic, G.D. & Zivkovic, R.V. (1993). Cadmium-induced changes of antioxidant and metabolic status in red blood cells of rats: in vivo effects. *Eur. J. Haematol.* 51: 86 - 92.

Krane, J., Aakermann, T. and Liaaen-Jensen, S. (1992). Algal Carotenoids 47-NMR Study of all-*trans*-peridinin, Including Complete ^1H and ^{13}C NMR assignments. *Magnetic Resonance in Chemistry*, 30, 1169-1177.

Krasnovsky A. A. & Paramonova L. I. (1983). Interaction of singlet oxygen with carotenoids - rate constants of physical and chemical quenching. *Biofizika.* 28: 725-729.

Kwiatowski, J. (1987). Comparison of chloroplast and cytosolic Cu, Zn superoxide dismutase isozymes from tomato in relation to superoxide dismutase evolution. *Curr. Top. Biol. Med. Res.* 15: 121-139.

Lambert, C. R., Black, H. S., and Truscott, T. G. (1996) Reactivity of butylated hydroxytoluene. *Free Radic. Biol. Med.* 21, 395–400.

Lang, M. & Kroth, P.G. (2001). Diatom fucoxanthin chlorophyll a/c-binding protein (FCP) and land plant light-harvesting proteins use a similar pathway for thylakoid membrane insertion. *J BIOL CHEM* 276 : 7985-7991.

Larkum, T. (1996). How dinoflagellates make light work with peridinin. *Trends Plant SCI* 1 : 247-248.

Laube, V.M.; McKenzie, C.N. & Kushner, D.J. 1980. Strategies of response to copper, cadmium, and lead by a blue-green and a green alga. *Can. j. microbiol.*, 26: 1300-1311.

Levin, R. E. (1992). Paralytic shellfish toxins - their origin, characteristics and methods of detection - a review. *J. Food Biochem.* 15: 405-417.

Lesser M. P. (1996)a. Acclimation of phytoplankton to UV-B radiation: oxidative stress and photoinhibition of photosynthesis are not prevented by UV-absorbing compounds in the dinoflagellate *Prorocentrum micans*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 132:287-297.

Lesser, M. P. (1996)b. Elevated Temperatures and Ultraviolet Radiation Cause Oxidative Stress and Inhibit photosynthesis in Symbiotic Dinoflagellates. *Limnol Oceanogr.* 41:271-283.

Liu K. S. (1994). Preparation of fatty-acid methyl esters for gas-chromatographic analysis of lipids in biological-materials. *Journal of the American Oil Chemists Society* 71:1179-1187.

Lohr M. & Wilhelm C. (1999). Algae displaying the diadinoxanthin cycle also possess the violaxanthin cycle *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 8784–8789.

Lopes, P. F. (2001). Caracterização bioquímica e regulação da nitrato redutase na macroalga marinha *Gracilaria tenuistipitata*. Tese de Doutorado.

Lowry, O.H., Roseborough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J., (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265-275.

Macchiavello (1994). Tolerância fisiológica e características do agar de cinco espécies de *Gracilaria* (Rhodophyta, Gracilariales). Tese de Doutorado IBUSP, pp. 96.

Malanga, G. & Puntarulo, S. (1995). Oxidative stress and antioxidant content in *Chlorella vulgaris* after exposure to ultraviolet-B radiation. *Physiol. Plant.* 94: 672-679.

McCord J.M., Fridovich .I (1968): The reduction of cytochrome c by milk xanthine oxidase. *J Biol Chem* 243:5753-5760.

Minotti, G. & Aust, S.D. (1992). Redox cycling of iron and lipid-peroxidation. *Lipids* 27 : 219-226.

Monteiro, H.P., Bechara, E.J.H. & Abdalla, D.S.P. (1991). Free radicals involvement in neurological porphyrias and lead poisoning. *Mol. Cell. Biochem.* 103: 73-83.

Murphy M.E. & Kehrer J.P. (1989). Oxidation-State of tissue thiol-groups and content of protein carbonyl groups in chickens with inherited muscular-dystrophy. *Biochem J* 260 : 359-364.

Murray, S.N. & Dixon, P.S. (1992). In: Barnes M, Ansell AD & Gilson RN [Eds]. c. UCL Press, pp. 1.

Murthy, S.D.S. & Mohanty, P. (1991). Mercury induces alteration of energy transfer in phycobilisome by selectively affecting the pigment protein, phycocyanin, in the cyanobacterium, *Spirulina platensis*. *Plant Cell Physiol.* 32: 231-237.

Nagalakshmi N., Prasad M. N. (1998). Copper-induced oxidative stress in *Scenedesmus bijugatus*: protective role of free radical scavengers. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 61(5):623-628.

Nakano, Y., Asada, K. (1981) Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant Cell Physiol.* 22: 867-880.

Ohyashiki, T., and Nunomura, M. (2000). A marked stimulation of Fe³⁺-dependent lipid peroxidation in phospholipid liposomes under acidic conditions. *Biochim. Biophys. Acta* 1484, 241–250. Relation to function. *FASEB J.* 9, 1551–1558.

Okamoto OK, Pinto E, Latorre LR, Bechara EJH, Colepicolo P (2001): Antioxidant modulation in response to metal-induced oxidative stress in algal chloroplasts. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 40: (1) 18-24.

Okamoto, O.K., Colepicolo, P. (1998) Response of superoxide dismutase to pollutant metal stress in the marine dinoflagellate *Gonyaulax polyedra*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 119C(1): 67-73.

Okamoto, O. K. (2000). Aspectos da adaptação bioquímica ao estresse metálico na alga unicelular *Gonyaulax polyedra*: modulação de antioxidantes cloroplásticos e expressão diferencial da enzima Fe-superóxido dismutase. Tese de Doutorado.

Olaizola M., Yamamoto H.Y. (1994). Short-term response of the diadinoxanthin cycle and fluorescence yield to high irradiance in *Chaetoceros muelleri* (Bacillariophyceae). *J Phycol* 30: 606-612.

Oliveira, E.C. & Alveal, K.V. (1990). In: Akatsuka I [Ed]. Introduction to Applied Phycology. SPB Acad Publ bv, The Hague, pp 553.

Oliveira MAL, Micke GA, Bruns RE, Tavares MFM (2001): Factorial design of electrolyte system for separation of fatty acids by capillary electrophoresis. *J. Chromatogr. A*. 924: 533-539.

Palozza, P., and Krinsky, N. (1992). Astaxanthin and canthaxanthin are potent antioxidants in a membrane model. *Arch. Biochem. Biophys.* 297, 291–295.

Perl-Treves, R. & Galun E. (1991). The tomato Cu-Zn superoxide dismutase genes are developmentally regulated and respond to light and stress. *Plant Mol. Biol.* 17: 745-760.

Phospholipids Handbook (1993), edited by Gregor Cevc, in appendix B: Thermodynamic parameters of phospholipids, table B5, pag 943, Marcel Dekker, Inc.

Provasoli L. (1968) Media and prospects for cultivation of marine algae. In: Cultures and Collections of Algae (eds A. Watanabe & A. Hattori), pp. 47-74. Japanese Society of Plant Physiology, Tokyo.

Puget K. & Michelson A. M. (1974). Isolation of a new copper-containing superoxide dismutase bacteriocuprein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 58: 830-838.

Pueschel, C.M. (1990). Cell structure In *Biology of the Red Algae*, edited by Cole K. M. & Sheath R.G. Cambridge University Press, Cambridge, pp 7-41.

Ramalho, C.B., Hastings, J.W. & Colepicolo, P. (1995). Circadian oscillation of nitrate reductase activity in *Gonyaulax polyedra* is due to changes in cellular protein levels. *Plant Physiol.*, 107: 225-231.

Rice-Evans, C.A., Diplock, A.T., Symons, M.C.R. (1991) Techniques in free radical research. In: Burdon, R.H., Van Knippenberg, P.H. (ed). Laboratory techniques in biochemistry and molecular biology. Elsevier, Amsterdam, The Netherlands, 291pp.

Rice-Evans, C.A., Miller, N.J. & Paganga, G. (1996). Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Rad. Biol. Med.* 20: 933-956.

Rijstenbil, J.W., Haritonidis S., Malea P., Seferlis M. & Wijnholds J.A. (1998). Thiol pools and glutathione redox ratios as possible indicators of copper toxicity in the green macroalgae *Enteromorpha spp.* from the Scheldt Estuary (SW Netherlands, Belgium) and Thermaikos Gulf (Greece, N Aegean Sea). *Hydrobiologia* 385: 171-181

Rijstenbil, J.W., Derkesen, J.W.M., Gerringa, L.J.A., Poortvliet, T.C.W., Sandee, A., Van Der Berg, M., Van Drie, J. & Wijnholds, J.A. (1994). Oxidative stress induced by copper: defense and damage in the marine planktonic diatom *Ditylum brightwellii*, grown in continuous cultures with high and low zinc levels. *Mar. Biol.* 119: 583-590.

Rizzo, P.J. 1991. The enigma of the dinoflagellate chromosome. *J. Protozool.* 38:246-252.

Roenneberg, T. & Hastings, J.W. (1991). Are the effects of light on the phase and period of the *Lingulodinium* clock mediated by different pathways? *Photochem. Photobiol.* 53: 525-533.

Salama A.M. & Pearce R.S. (1993) Ageing of cucumber and onion seeds: phospholipase D, lipoxygenase activity and changes in phospholipid content. *Journal of Experimental Botany* 44, 1253-65.

Salin, M.L. (1987). Toxic oxygen species and protective system of the chloroplast. *Physiol. Plant.* 72: 681-689.

Salokhiddinov, K. I., Byteva, I. M., Dzhagarov, B. M., and Gurinovich, G. P. (1981). Study of the sensitized luminescence of singlet oxygen in solutions in the 1588 nm region. *J. Appl. Spectrosc.* 35, 888–891.

Salovsky, P., Shopova, V., Dancheva, V. & Marev, R. (1992). Changes in antioxidant lung protection after single intra-tracheal cadmium acetate instillation in rats. *Hum. Exp. Toxicol.* 11: 117 - 122.

Santelices B. & Doty M.S. (1989). A review of *Gracilaria* farming. *Aquaculture*, 78(2): 95-133.

Saunders, G.W., Hill, D.R.A., Sexton, J.P. & Andersen, R.A. (1997). Small-subunit ribosomal RNA sequence from selected dinoflagellates: testing classical evolutionary hypothesis with molecular systematic methods. *Pl. Syst. Evol.* 11: 237-259.

Schiedt K. & Liaaen-Jensen S. (1995). Isolation and Analysis. In *Carotenoids Vol 1A: Isolation and Analysis*; Britton, G., Liaaen-Jensen, S., Pfander, H., Eds; Birkhäuser: Basel; pp 81-84.

Schofield, O., Kroon B. M. A. & Prezelin B. B. (1995). Impact of ultraviolet-B radiation on photosystem II activity and its relationship to the inhibition of carbon fixation rates for antarctic ice algae communities. *J. Phycol.*, 31, 703-715.

Schopf, J.W. (1993). Microfossils of the early Archaean Apex chert; new evidence of the antiquity of life. *Science*. 260: 640-646.

Sies, H. (1993). Strategies of antioxidant defense. *Eur. J. Biochem.* 215: 213-219.

Skinner, B.J. & Turekian, K.K. (1973). *Man and the Ocean*, Englewood Cliffs, NJ, Prentice Hall, Inc. 472.

Stefels, J. & van Boekel, WHM. (1993). Production of DMS from dissolved DMSP in axenic cultures of the marine phytoplankton species *Phaeocystis* sp. *Mar. Ecol. Ser.*, 97: 11-18.

Steidinger, K.A. (1993). In: Falconer, I.R. [Ed.]. *Algal toxins in seafood and drinking water*, Acad. Press, London.

Steinman H. M. (1982). Copper-zinc superoxide dismutase from *Caulobacter crescentus* CB15. A novel bacteriocuprein form of the enzyme. *J. Biol. Chem.* 257: 10283-10293.

Steinman H. M. (1985). Bacteriocuprein superoxide dismutases in pseudomonads. *J Bacteriol.* 162(3):1255-1260.

Steinman, H. M. & Ely, B. (1990). Copper-zinc superoxide dismutase of *Caulobacter crescentus*: cloning, sequencing, and mapping of the gene and periplasmic location of the enzyme. *J. Bacteriol.* 172: 2901-2910.
Stohs, S.J., Bagchi, D. (1995) Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions. *Free Radic. Biol. Med.*, 18: 321-336.

Suzuki, Y.J, Forman, H.J. & Sevanian, A. (1997). Oxidants as stimulators of signal transduction. *Free Rad. Biol. Med.* 22: 269-285.

Szalontai B., Horvath L.I., Debreczeny M., et al. (1999). Molecular rearrangements of thylakoids after heavy metal poisoning, as seen by Fourier transform infrared (FTIR) and electron spin resonance (ESR) spectroscopy. *Photosynth Res* 61: 241-252.

Sze P. (1998). *A biology of the algae*, 3rd ed., WCB/McGraw Hill Publishers, 259pp.

Tabata, K., Ishida S., Nakahara, T. & Hoshino, T. (1994). A carotenogenic gene cluster exists on a large plasmid in *Thermus thermophilus*. *FEBS Lett.* 341, 251-255.

Tang, L. X., Zhang, Y., Qian, Z. M., and Shen, X. (2000): The mechanism of Fe^{2+} -initiated lipid peroxidation in liposomes: the dual function of ferrous ions, the roles of the pre-existing lipid peroxides and the lipid peroxy radical. *Biochem. J.* 352, 27-36.

Tilson, H.A. & Kodavanti, P.R. (1998) The neurotoxicity of polychlorinated biphenyls. *Neurotoxicology.* 19 (4-5), 517-525.

Trevors, T.J., Stratton, W.G. & Gadd, M.G. (1986). Cadmium transport, resistance and toxicity in bacteria, algae and fungi. *Can. J. Microbiol.* 32:447-464.

Truscott, T.G. (1990): The photophysics and photochemistry of the carotenoids. *J. Photochem. Photobiol. B* 6, 359-371.

Tschiersch, H. & Ohmann, E. (1993). Photoinhibition in *Euglena gracilis*: involvement of reactive oxygen species. *Planta (Berl.)* 191: 316-323.

Van Assche, F. & Clijsters, H. (1990). Effects of metals on enzyme activity in plants. *Plant Cell Environ.* 13: 195-206.

Van Bogelen, R.A.; Kelley, P.M. & Neidhardt, F.C. (1987). *J. Bacteriol.*, 169 (1): 26-32

Vangronsveld, J. & Clijsters, H. (1994). In: Farago, M.E. [Ed.]. *Plants and the chemical elements: biochemistry, uptake, tolerance and toxicity*. VCH, Weinheim, Germany.

Wen Z.Y. & Chen F. (2002). Continuous cultivation of the diatom *Nitzschia laevis* for eicosapentaenoic acid production: physiological study and process optimization. *Biotechnol Prog.* 18, 21-28.

White, A.W. & Lewis, C.M. (1982). Resting cysts of the toxic dinoflagellate *Lingulodinium excavata* in Bay of Fundy sediments. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 39: 1185-1194.

Woodall, A. A., Britton, G., and Jackson, M. J. (1997). Carotenoids and protection of phospholipids in solution or in liposomes against oxidation by peroxy radicals: Relationship between carotenoid structure and protective ability. *Biochim. Biophys. Acta* 1336, 575–586.

World Health Organization (WHO) (1993) Polychlorinated biphenyls and terphenyls, 2nd edition. Geneva.

Wright, S.W., Shearer, J.D., (1984). Rapid extraction and high performance liquid chromatography of chlorophylls and carotenoids from marine phytoplankton. *J. Chromatogr.* 294, 281-295.

Youn, H.D., Kim, E.J., Roe, J.H., Hah, Y.C. & Kang, S.O. (1996). A novel nickel-containing superoxide dismutase from *Streptomyces* spp. *Biochem. J.* 318: 889-896.

Zhong, Z., Troll, W., Koenig, K.L. & Frenkel, K. (1990). Carcinogenic sulfide salts of nickel and cadmium induce H₂O₂ formation by human polymorphonuclear leukocytes. *Cancer Res.* 50: 7564-7570.

8. CURRICULUM VITAE

Ernani Pinto Junior

27 anos, solteiro. Telefone celular: (011) 9114-3496.

Telefones: residencial: (11) 3081-6559 ou (12) 221 5557, comercial: (11)38182170

e-mail: ernanipjr@uol.com.br

Rua: Henrique Schaumann Nº 678/81 – Pinheiros. São Paulo/SP.

Formação Acadêmica:

Farmácia e Bioquímica. Modalidade Fármacos e Medicamentos (1993 a 1998). Fac. Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo - São Paulo.

Idiomas: Fluência na língua inglesa e conhecimentos da língua espanhola

Estágios no Exterior:

- Intercâmbio, Universidade de Estocolmo, Departamento de Botânica, Estocolmo – Suécia. Período: 08/2000 - 02/2001
- Intercâmbio, Universidade de Uppsala, Departamento de Ecologia, Uppsala – Suécia. Período: 04/2000 - 07/2000
- Intercâmbio, Universidade Católica do Porto, Departamento de Química, Porto – Portugal. Período: 03/2002 – 04/2002.

Trabalhos publicados:

- Pinto E, Pedersén M, Snoeijs P, Van Nieuwerburgh L, Colepicolo P (2002) Simultaneous detection of thiamine and its phosphate esters from microalgae by HPLC. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 291: 344-348.
- Sigaud-Kutner TCS, Pinto E, Okamoto OK, Latorre LR, Colepicolo P (2002): Changes in superoxide dismutase activity and photosynthetic pigment content during growth of marine phytoplankters in batch-cultures. *Physiologia Plantarum* 114: 566-571.
- Holnagell CH, Pinto E, Morse D, Colepicolo P (2002) The oscillation of photosynthetic capacity in *Lingulodinium polyedrum* is not related to differences in RuBisCo, peridinin or chlorophyll-a amounts. *Biological Rhythm Research* (no prelo)
- Barros MP, Pinto E, Colepicolo P, Pedersén M (2001): Astaxanthin and peridinin inhibit oxidative damage in Fe²⁺-loaded liposomes: scavenging oxyradicals or changing membrane permeability? *Biochemical and Biophysical Research Communications* 288: 225-232.

- Okamoto OK, **Pinto E**, Latorre LR, Bechara EJH, Colepicolo P (2001): Antioxidant modulation in response to metal-induced oxidative stress in algal chloroplasts. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 40: (1) 18-24.
- **Pinto E**, Catalani LH, Lopes NP, Di Mascio P, Colepicolo P (2000) Peridinin as the major biological carotenoid quencher of singlet oxygen in marine algae *Gonyaulax polyedra*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 268: (2) 496-500.
- Cardozo KHM, Marcone ALO, Tavares MFM, Colepicolo P, **Pinto E** (2001) Daily Oscillation of Fatty Acids and Malondialdehyde in *Lingulodinium polyedrum*. *Biological Rhythm Research* (no prelo).
- **Pinto E**, Van Nieuwerburgh L, Barros MP, Pedersén M, Colepicolo P, Snoeijs P Density-dependent patterns of superoxide dismutase, protein thiols, thiamine and pigments in two microalgal species. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* (submetido).
- Nuñez CV, **Pinto E**, Colepicolo P and Roque NF (2001): An improved high performance liquid chromatography method for lipophilic triterpenes separation followed by gas chromatography analysis in *Wunderlichia crulsiana*. *Phytochemical Analysis*. (em preparação).
- Collén J, **Pinto E**, Pedersén M, Colepicolo (2002): Effects of copper and cadmium ions on the reactive oxygen metabolism of *Gracilaria tenuistipitata* (Rhodophyta). *Plant Cell Environmental* (em preparação).

Capítulos de livro:

- **Pinto E**, Sigaud-Kutner TCS, Leitão MAS, Okamoto OK and Colepicolo P (2002) Toxicant induced-oxidative stress in algae. *in* Aquatic Toxicology, Tripathi PN. Academic Press – in press
- Lopes PF, Marques N, **Pinto E**, Colepicolo P (2002) Organização celular e molecular dos ritmos biológicos. *in* Cronobiologia: Princípios e Aplicações, Nelson Marques e Luiz Menna-Barreto (orgs.) Edusp. 4^o Edição – in press.