UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Bioquímica)

João Vasconcellos de Almeida

Efeitos tóxicos de benzo(a)pireno sobre a macroalga vermelha *Gracilaria birdiae*

São Paulo
03/03/2010

João Vasconcellos de Almeida

Efeitos tóxicos de benzo(a)pireno sobre a macroalga vermelha *Gracilaria birdiae*

Dissertação apresentada ao Instituto de Química da Universidade de São Paulo para obtenção do Título de Mestre em

Ciências (Bioquímica)

Orientador: Prof. Dr. Pio Colepicolo Neto

São Paulo

2010

Nome do Pós-Graduando:

João Vasconcellos de Almeida

Título da Dissertação de Mestrado:

Efeitos tóxicos de benzo(a)pireno sobre a macroalga vermelha *Gracilaria birdiae*

Dissertação apresentada ao Instituto de Química da Universidade de São Paulo para obtenção do Título de Mestre em

Ciências (Bioquímica)

Aprovado em: _____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Este trabalho é dedicado especialmente aos meus admiráveis pais, Maria e Sergio, que sempre acreditaram em mim e sempre me deram a liberdade de escolher os caminhos de acordo com a minha felicidade.

Agradecimentos

Aos meus pais e parentes, cujas amizades e companhias, inclusive dos que moram longe, sempre me fizeram sentir tranquilo e no lugar certo;

À Joana, sempre ao meu lado, brincalhona e sorridente, soube me ajudar nas mais diferentes situações durante todo o período de mestrado;

A todos os amigos (destaque ao Império XXXI), responsáveis por tornar minha vida sempre mais feliz;

Ao amigo e orientador Dr. Pio Colepicolo Neto, cujo bom humor, apoio e bate-papos sempre foram estimulantes ao meu desenvolvimento profissional;

Aos companheiros de laboratório Aline, Ângela, Daniel, Diogo, Fabiane, Felipe, Érika S., Luiza, Moacir, Patrícia, Paula, Renato, Stéphanie e Vanessa pela amizade e momentos de descontração, mas também pelas discussões científicas;

À Érica P., pela amizade, ajuda e paciência com a minha primeira experiência como orientador científico;

Aos técnicos Ednaílson Carvalho e Sandra Souza, pelo suporte e amizade durante todos estes anos;

Aos colegas de pós-graduação Diogo, Ivan, Aline, José, Olívia, Moacir, Anna e Adriano pela amizade, colaborações e conversas científicas enriquecedoras; ao colega Júlio Avanzo pelas fotos de *G. birdiae* cordialmente concedidas;

Aos docentes Dra. Estela Plastino (IB-USP), Dra. Mariana Oliveira (IB-USP), Dra. Eliane Soriano (UFRN), Dra. Nadja Cristhina Pinto (IQ-USP), Dr. Orlando Necchi Jr. (UNESP – Rio Preto) pela colaboração científica;

À Universidade de São Paulo, ao Instituto de Química e ao Departamento de Bioquímica pelas excelentes condições de trabalho;

À FAPESP e ao CNPq, pelo apoio financeiro fundamental ao desenvolvimento deste trabalho e também ao meu amadurecimento acadêmico-científico.

"Quando a maré vai e vem
Assim é o nosso amor..."

Antônio Caetano

RESUMO

Almeida, J.V. **Efeitos Tóxicos de Benzo(a)pireno sobre a Macroalga Vermelha *Gracilaria birdiae***. 2010. 141p. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Bioquímica. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Os organismos chamados de algas apresentam uma grande diversidade de espécies e ocupam uma grande variedade de nichos ecológicos. Fundamentais para a manutenção das condições que permitem a vida no planeta, inclusive porque constituem a base de cadeias tróficas de ecossistemas aquáticos, as algas vêm sofrendo com o descarte contínuo de resíduos resultantes das mais variadas atividades humanas. Por outro lado, as algas, ao serem expostas aos poluentes, podem indicar a presença dos mesmos em seus habitats por meio de seus biomarcadores.

Neste sentido, este trabalho preocupou-se em caracterizar as bases moleculares da toxicidade do hidrocarboneto policíclico aromático (HPA) benzo(a)pireno (BaP), presente no petróleo cru e derivado da combustão parcial de matéria orgânica, sobre a macroalga vermelha *Gracilaria birdiae*, uma Rhodophyta marinha nativa. Para avaliar a agressividade do poluente, a alga foi exposta a diferentes concentrações do HPA em água do mar, tanto em situações de exposição aguda (24 e 96h) quanto crônica (7 e 15 dias). Após estes períodos de exposição, alguns biomarcadores bioquímicos e fisiológicos da alga tiveram seus comportamentos analisados. Foram eles: taxas de crescimento (TC); duas defesas antioxidantes: os níveis do tripeptídeo de baixo peso molecular glutationa (GSH) e a atividade da enzima superóxido dismutase (SOD); os níveis do dímero de glutationa GSSG; a fotossíntese da macroalga; e seu aspecto de pigmentação geral.

Foi possível observar que BaP é tóxico para a macroalga *G. birdiae*. Aumentos da concentração do HPA nos meios de cultura das algas provocaram menores TC. A partir destes dados de TC foi possível determinar uma curva de inibição do crescimento da alga e a

respectiva IC_{50} de BaP para um período de exposição de 15 dias, com valor de 69 ng do HPA para cada mL de água do mar. Após diferentes exposições a BaP, incluindo em IC_{50}, algas expostas a BaP apresentaram níveis reduzidos do antioxidante GSH, o mesmo efeito que fora observado para GSSG (com exceção da exposição de 96h). O desempenho fotossintético, a atividade de SOD e a pigmentação de *G. birdiae* mostraram ser sistemas menos sensíveis à presença de BaP, e foram prejudicados em concentrações mais elevadas do poluente, em torno de 10 a 20 µg/mL. Nestas situações, a despigmentação severa da macroalga foi acompanhada de decaimentos expressivos de alguns parâmetros fotossintéticos (*i.e.*, rETR, RQE, I_k, β) da alga.

Numa outra abordagem, alguns experimentos foram feitos com o intuito de descobrir se a alga era capaz de eliminar e biorremediar BaP presente na água do mar. Aparentemente, a alga não apresenta tal capacidade; porém, uma cinética mais detalhada se faz necessária para a confirmação desta observação.

Concluindo, os resultados do trabalho corroboram outros dados da literatura a respeito da toxicidade de BaP sobre sistemas vivos. Ainda, apesar de a sensibilidade de *G. birdiae* a BaP não ter sido alta, foi possível apontar alguns sistemas bioquímicos da alga capazes de desempenhar papel como biomarcadores de exposição ao poluente estudado, o que pode auxiliar na tomada de medidas para o manejo e a conservação de áreas impactadas.

Palavras-chave: algas, poluição, mar, ecotoxicologia, biomarcador, benzo(a)pireno.

ABSTRACT

Almeida, J.V. 2010. 141p. **Toxic Effects of Benzo(a)pyrene on the Red Macroalga *Gracilaria birdiae***. Masters Thesis - Graduate Program in Biochemistry. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Algae show a great biodiversity and occupy many different ecological niches. Besides being essential for the maintenance that allow life on Earth, algae are on the basis of aquatic food chains and they suffer with continuous residue discharge that comes from different human activities. However, once algae are exposed to pollutants, biomarkers can indicate its presence on the environment.

The aim of this work was on the characterization of benzo(a)pyrene (BaP; a polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) derived from crude oil and from incomplete combustion of organic matter) toxicity against the red macroalga *Gracilaria birdiae*, a marine brazillian Rhodophyta. BaP toxicity in marine water was investigated under different exposure concentrations after acute (24 and 96h) and chronic (7 and 15 days) conditions. At the end of the exposures time, some of the algae`s biochemical and physiological biomarkers were analyzed: growth rate (GR); two antioxidant defenses: the low molecular weight peptide glutathione (GSH) and superoxide dismutase (SOD) enzyme activity; glutathione disulfide (GSSG) levels; the macroalga photosynthetic capacity; and the general colour aspect.

Increased BaP concentrations led to a decrease of GR values. From GR data it was possible to obtain an inhibition growth curve and the respective BaP IC_{50} for a 15-day exposure time period with value of 69 ng/mL. After different BaP exposure conditions, including IC_{50}, exposed algae presented decreased GSH levels, the same effects observed for GSSG (except for 96h exposure). The photosynthetic yield, SOD activity and colour aspect of *G. birdiae* appeared to be more resistant systems against BaP, and were affected only in higher BaP concentrations (10 to 20 µg/mL). In such situations, *G. birdiae* lost its red colour,

which was accompanied by considerable photosynthetic parameters (*i.e.*, rETR, RQE, I_k, β) decay.

In a different approach, some experiments were done in order to discover any BaP clean-up and bioremediation played by *G. birdiae*. Preliminary results suggests that the alga has low remediation efficiency, although more investigations need to be done to confirm this.

In summary, the results presented here show similar tendencies with literature data in respect of BaP toxicity against living organisms. Even though *G. birdiae* presented reasonable resistance to BaP, it was possible to identify some of the alga`s biochemical systems as BaP exposure biomarkers. This situation can be useful for impacted areas assessment and management.

Keywords: algae, pollution, sea, ecotoxicology, biomarker, benzo(a)pyrene.

Índice de Abreviaturas e Siglas

8-oxodG – 8-oxo-2'-deoxiguanosina
α – eficiência fotossintética
β – fotoinibição
ε – coeficiente de absortividade molar
λ_{em} – comprimento de onda de emissão
λ_{ex} – comprimento de onda de excitação
ACN – acetonitrila
ACT – actina
APx – ascorbato peroxidase
BaP – benzo(a)pireno
BaPDE – diol-epóxido de benzo(a)pireno
BSA – albumina sérica bovina
CAT – catalase
CETESB – Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental do Estado de São Paulo
CONAMA – Conselho Nacional do Meio Ambiente
CYP450 – citocromo P450
Cyt *c* – citocromo *c*
DAD – detector por arranjo de diodos
DFAM – desferroxamina
DCM – diclorometano
DDM – dose diária máxima, que é igual à **RfD**
dG – 2'-deoxiguanosina
DTE – ditioeritritol
DMSO – dimetilsulfóxido
ECD – detecção eletroquímica
EDTA – ácido etilenodiamino tetra-acético
ERO – espécies reativas de oxigênio
ESI – fonte de ionização de spray de elétrons
EtOH – etanol
FL – detecção por fluorescência
F_m' – fluorescência máxima apresentada pelas clorofilas de uma alga em condição de iluminação
F_{max} – fotossíntese máxima
F_t – fluorescência transitória
FW – "forward", para frente
GC – cromatografia gasosa
GC/MS – sistema de cromatografia gasosa acoplado a espectrometria de massas
GPx – glutationa peroxidase
GSH – γ-glutamil-cisteinil-glicina ou glutationa
GSSG – dímero de glutationa
GST – glutationa S-transferase
HPA – hidrocarboneto policíclico aromático
HPLC – cromatografia líquida de alta performance
IC_{50} – concentração que inibe o crescimento de um organismo em 50 %
I_k – intensidade de luz saturante
IPTG – isopropil β-D-1-tiogalactopiranosídeo

IR – índice redox
LLE – extração líquido-líquido
$\boldsymbol{K_{ow}}$ – coeficiente de partição octanol-água
LOD – limite de detecção
LOQ – limite de quantificação
MCL – "maximum concentration level" – concentração máxima permitida
MeOH – metanol
MRM – monitoramento de reação múltipla
MS – espectrometria de massas
MS/MS – análise de moléculas por fragmentação
NEM – *N*-etilmaleimida
NFL – naftaleno
NOEL – "no observable effects limiar" – limiar até o qual efeitos nocivos não são observados
PAM – pulso de luz de amplitude modulada
PAR – radiação fotossinteticamente ativa
PCR – reação em cadeia da DNA polimerase
PI – fotossíntese-irradiância
$\mathbf{P_{max}}$ – fotossíntese relativa máxima, igual à $rETR_{max}$
PMSF – fluoreto de fenilmetilsulfonila
PS – fotossistema
PVP – polivinilpirrolidina
rETR – taxa de transporte de elétrons relativa ou fotossíntese relativa
$\mathbf{rETR_{max}}$ – taxa de transporte de elétrons relativa máxima ou fotossíntese relativa máxima
RfD – dose referencial de toxicidade, que é igual à **DDM**
RQE – rendimento quântico efetivo do fotossistema II
RT-PCR – PCR em tempo real
RV – "reverse", para trás
SDS – dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE – eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes
SOD – superóxido dismutase
SPE – extração em fase sólida
TC – taxa de crescimento
THF – tetrahidrofurano
US-EPA – Agência Norte-Americana de Proteção Ambiental
UV – radiação ultravioleta
VS – meio nutritivo Von Stosch
Xgal – bromo-cloro-indolil-galactopiranosídeo

SUMÁRIO

1. Introdução.....14
1.1 As algas 14
1.1.1 Algas Vermelhas – Filo Rhodophyta.....16
1.2 A Atividade Humana e a Integridade Oceânica 19
1.3 Ecotoxicologia e Biomarcadores 20
1.4 Os hidrocarbonetos policíclico aromáticos como poluentes 22
1.5 Benzo(a)pireno 23
1.6 Compreendendo a toxicidade de BaP 26
1.7 Defesas antioxidantes.....28
1.8 A bioquímica da fotossíntese e seu potencial biomarcador.....30
1.9 Citocromo P450 e BaP 31
1.10 Análise química de BaP 33
2. Objetivos.....35
3. Materiais e Métodos.....37
3.1 Material biológico 37
3.2 Preparação das soluções de trabalho de BaP 38
3.3 Determinação da IC_{50} de BaP sobre *G. birdiae*.....39
3.4 Defesas Antioxidantes 40
3.4.1 SOD.....40
3.4.1.1 Preparação dos extratos.....40
3.4.1.2 Ensaio enzimático.....41
3.4.2 Níveis de GSH e do dímero de glutationa GSSG.....42
3.4.2.1 Preparação dos extratos.....42
3.4.2.2 Determinação da concentração de GSH e GSSG 42
3.5 Quantificação de proteína 44
3.6 Análise da fotossíntese de *G. birdiae* 45
3.7 Método analítico para detecção e quantificação de BaP nos meios de cultura da alga 46
3.8 Enriquecimento de BaP.....47
3.8.1 Extração em fase sólida 47
3.8.2 Extração líquido-líquido.....47
3.9 Extração e digestão do DNA total de *G. birdiae* 48
3.9.1 Extração de DNA 48
3.9.2 Digestão de DNA 49
3.10 Método analítico para separação, detecção e quantificação de 8-oxodG.....50
3.11 Biologia molecular de *G. birdiae* 51
3.11.1 Reação em cadeia da DNA polimerase.....53
3.11.2 Eletrofore de DNA em gel de agarose 54
3.11.3 Ligação dos fragmentos de DNA a plasmídeos vetores.....54
3.11.4 Transformação de bactérias por choque térmico e seleção dos clones transformantes.....55
3.11.5 Preparação de plasmídeos a partir de cultura de bactérias 55
3.11.6 PCR a partir de material obtido de colônias de bactérias 56
3.11.7 Reação de sequenciamento de DNA.....56
3.11.8 Análise das seqüências obtidas 57
3.12 Obtenção da membrana microssomal 57
3.13 Detecção e quantificação de CYP450 58

3.14 Eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes.....59
3.15 Refinamento estatístico 60
4. Resultados.....61
4.1 Obtenção de biomassa algal e cultivo em laboratório 61
4.2 Toxicidade de BaP sobre o crescimento de *G. birdiae* e a determinação da IC_{50}.....62
4.3 Defesas Antioxidantes 66
4.3.1 Glutationa 66
4.3.2 SOD.....72
4.4 Toxicidade de BaP sobre a fotossíntese de *G. birdiae* 74
4.5 Quantificação de BaP nos meios de cultura de *G. birdiae* 86
4.6 Biologia molecular de *G. birdiae* 89
4.6.1 Teste dos iniciadores.....89
4.6.2 Análise dos danos provocados por BaP ao DNA da alga.....93
4.7 Citocromo P450 97
5. Discussão.....99
5.1 Toxicidade de BaP sobre o crescimento de *G. birdiae* 99
5.2 Comportamento das Defesas Antioxidantes.....103
5.2.1 Glutationa 103
5.2.2 SOD 109
5.3 Toxicidade de BaP sobre a fotossíntese de *G. birdiae* 112
5.4 Análise de BaP nos meios de cultura da alga.....116
5.5 Biologia molecular de *G. birdiae* 120
5.5.1 Confirmação do par de iniciadores para actina.....120
5.5.2 Método analítico de quantificação de 8-oxodG 122
6. Conclusões 124
7. Referências Bibliográficas.....126
8. Súmula Curricular 139

1. Introdução

1.1 As algas

De forma simplificada e com inúmeras exceções pode-se dizer que algas são organismos aquáticos fotossintetizantes autotróficos, tipicamente menores e menos complexos estruturalmente se comparados com as plantas terrícolas (GRAHAM e WILCOX, 2000a). Desde espécies representadas por células únicas de um micrômetro de diâmetro até organismos gigantes de cinqüenta metros de comprimento, as algas são abundantes e antigas e podem ser encontradas em qualquer ecossistema da biosfera (GRAHAM e WILCOX, 2000b).

São muitos os papéis ecológicos desempenhados pelas algas. Talvez aquele que seja o de maior importância, e que é desempenhado especialmente pelo plâncton, é o fato de algas comporem a base das cadeias tróficas marinha e de água doce, condição imprescindível para a manutenção do equilíbrio ecológico (GRAHAM e WILCOX, 2000c).

As algas também estão envolvidas numa enormidade de associações bióticas, algumas delas obrigatórias, como é o caso daquela existente entre os recifes de corais e as algas zooxantelas. O fato dessa relação ser obrigatória explica o porque da distribuição dos recifes de corais estar limitada a águas rasas e bem iluminadas (GRAHAM e WILCOX, 2000b).

Com relação ao processo evolutivo, o surgimento das algas parece ter sido um evento determinante. Coletivamente, microalgas marinhas vêm modificando a atmosfera do planeta por mais de 2,7 bilhões de anos (BUICK, 1992). Um subgrupo das algas, as cianobactérias, constitui o primeiro grupo de organismos fotossintetizadores oxigênicos, e atribui-se a elas o processo de formação de uma atmosfera rica em O_2 e ozônio. Sem uma atmosfera com esta configuração não se faria possível a origem da vida eucariótica na Terra, uma vez que a ocupação de águas rasas e do ambiente terrestre pelas algas e outros organismos não teria sido possível (GRAHAM e WILCOX, 2000d).

As algas exercem forte influência, em escala global, na ciclagem química e biogeoquímica de carbono, enxofre, nitrogênio, fósforo e oxigênio. Nesse sentido, sua participação vem ganhando maior significância conforme o crescimento populacional humano tem provocado alterações massivas na ciclagem dos elementos citados (GRAHAM e WILCOX, 2000d). RIEBESELL *et al*. (1993) sugere que as algas possuem a capacidade de reduzir os níveis de CO_2 atmosférico por meio de fotossíntese seguida da sedimentação do carbono orgânico produzido para as profundidades dos oceanos.

A existência de depósitos de óleo e calcário também são atribuídos, em grande parte, às algas, uma vez que sua sedimentação, que persiste a milhares de milhões de anos, contribuiu e contribui bastante para esta formação (GRAHAM e WILCOX, 2000b).

Por milênios as civilizações ao redor do mundo vêm coletando algas para alimentação direta, forragem (biomassa vegetal como ração) e como fertilizantes. Atualmente, são bastante utilizadas na alimentação de vários tipos de culturas, como aquiculturas de camarão e de mariscos. Junto à biotecnologia, apresentam-se como ferramentas bastante úteis: configuram-se como fonte de biomoléculas de uso industrial, como ágar e carragenanas, além de fazer parte de bio-reatores (GRAHAM e WILCOX, 2000b). Essas características atribuem a elas expressivo valor econômico.

Mais recentemente, tem sido utilizadas na absorção de nutrientes em excesso em efluentes, reduzindo a poluição de corpos d'água (DERRAIK, 2002; MARINHO-SORIANO, 2005). Nesse sentido, muitas macroalgas marinhas vêm apresentando a capacidade de absorção de compostos orgânicos presentes na água com posterior acúmulo em seus tecidos durante o crescimento. Essa capacidade fez com que se pensasse em usá-las como biofiltros para a limpeza de ambientes aquáticos com elevada concentração desses compostos (JONES *et al*., 2002; YANG *et al*., 2005; MARINHO-SORIANO, 2005; MSUYA *et al*., 2006; HERNANDEZ *et al*., 2002; 2005; 2006).

Podendo ser considerada uma etapa posterior à biofiltração, a capacidade de metabolizar diferentes poluentes, como fenóis, herbicidas, hidrocarbonetos policíclico aromáticos (HPA), dentre outros, já foi descrita para alguns organismos como bactérias, fungos, plantas e microalgas (WARSHAWSKY *et al*., 1995; SEMPLE *et al*., 1999; JUHASZ e NAIDU, 2000; MORANT *et al*., 2003; ROCHA *et al*., 2007).

Como essas algas não geram resíduos (ou geram resíduos menos tóxicos) e produzem ágar, carragenanas e colóides, e podem ser utilizadas como adubo e como ração animais, elas representam uma proposta duplamente "ecoamigável" ao sistema, melhorando a qualidade da água e gerando renda às famílias, já que sua biomassa pode ser comercializada (MARINHO-SORIANO, 2005).

1.1.1 Algas Vermelhas – Filo Rhodophyta

Como as plantas, as algas realizam fotossíntese para converter energia solar em energia química. Porém, o verde de suas clorofilas é muitas vezes incoberto por grandes quantidades de pigmentos acessórios e fotoprotetores. Esses pigmentos ajudam na captação da luz não absorvida diretamente pelas clorofilas, posteriormente canalizando-a para a clorofila *a*. É a composição e a quantidade desses pigmentos que garantem às algas uma variedade de cores, e para alguns grupos de algas, seus nomes comuns, como algas marrons, algas vermelhas e algas verdes (GRAHAM e WILCOX, 2000b).

Para algas vermelhas já foram descritas aproximadamente 6 mil espécies, porém acredita-se que existam mais (GRAHAM e WILCOX, 2000d). Dentre as Rhodophyta, pode-se destacar o gênero *Gracilaria* (ordem Gracilariales, família Gracilariaceae), do qual a maioria das espécies apresenta distribuição tropical, acompanhando as águas quentes características (20 °C ou mais). Ainda, *Gracilaria*, que possui mais de 100 espécies descritas, 18 no Brasil (OLIVEIRA e PLASTINO, 1994), pode sobreviver a diluições, altas

concentrações de nutrientes, baixa movimentação da água, combinadas a altas temperaturas e/ou soterramento de parte do talo.

As espécies de *Gracilaria* se destacam pela utilização na alimentação humana e na agricultura (como fertilizantes e corretivos de solo). O ficocolóide ágar, produzido também por esse gênero, atribui-lhe grande valor econômico na medida em que apresenta inúmeras aplicações nas mais diversas áreas industriais (MARINHO-SORIANO, 2005). Porém, as populações selvagens de espécies de *Gracilaria*, que no Brasil estão distribuídas desde o Maranhão até o Rio Grande do Sul, vêm sofrendo muito com a alta exploração dos bancos naturais, fenômeno decorrente da alta demanda por esses organismos. Nesse sentido, os cultivos têm adquirido importância ecológica e têm-se constituído como a única alternativa para as empresas que atuam no setor (DONATO, 2005). A **Figura 1 c** ilustra esse tipo de cultura.

Figura 1. As populações naturais de *Gracilaria birdiae* podem ter como substrato os recifes de arenito encontrados na costa do RN (**a**), normalmente habitando o infralitoral e a região entre-marés. Mais recentemente, ela também vem sendo cultivada no ambiente marinho amarrada a cordas conectadas a sistemas flutuantes (**c**). As fotos **b** e **d** permitem visualizar a atual relação existente entre as comunidades de nativos da Praia de Rio do Fogo (RN) e este organismo. As algas, ao serem compradas pela indústria, desempenham um papel sócio-econômico local. Todas as fotos (1º semestre/2008) foram cordialmente concedidas por Júlio Avanzo.

Dentre as *Gracilaria*, a espécie *Gracilaria birdiae* inclui indivíduos de talo cilíndrico que podem atingir até 46 cm de comprimento e 2,3 mm de diâmetro (**Fig. 1 c**). É uma espécie nativa, cujos representantes são encontrados na região entre-marés e no infralitoral, com distribuição que vai desde a costa do Ceará (3º S) até a costa do estado do Espírito Santo (20º S) (PLASTINO e OLIVEIRA, 2002).

Esta Rhodophyta está entre as principais agarófitas do gênero, o que atrela a ela valor econômico e interesse mercadológico (COSTA, 2000; URSI, 2000). Desse modo, sua exploração é significativa, sendo realizada inclusive por famílias de pescadores (OLIVEIRA e

MIRANDA, 1998). As **Figuras 1 b** e **1 d** facilitam entender como se dá a relação entre os nativos e as algas.

Em laboratório, *G. birdiae* apresenta grande resistência e crescimento satisfatório (URSI, 2000), que associados ao atual baixo entendimento ecotoxicológico que se tem da espécie, caracteriza-a como um interessante modelo de estudo.

1.2 A Atividade Humana e a Integridade Oceânica

O ambiente aquático é altamente complexo, e por essa razão escultura-se com os mais distintos e variados ecossistemas, abrangendo tanto os biomas de água doce como os grandes ecossistemas marinhos (GOLDBERG, 1995; RAND *et al*., 1995; WARD, 1995).

Não é nova a evidência da ação poluidora do homem, fato esse que remonta ao início das atividades da civilização humana (HIS *et al*., 1999). Entretanto, nenhuma atenção havia sido dada há até aproximadamente dois séculos atrás, durante os quais os efeitos da industrialização, da agricultura intensiva e da exploração dos estuários decorrente das ocupações urbana e turística atingiram limiares com graves reflexos e conseqüências para todos os ecossistemas (ISLAM e TANAKA, 2004). Segundo LOVEJOY (1997), a atividade humana foi e continua sendo responsável pelo maior declínio da diversidade biológica; a continuar nesse ritmo, as taxas de extinções naturais do planeta poderiam ser aceleradas em uma ordem de 1000 a 10000 vezes (DERRAIK, 2002).

Nesse contexto, os oceanos, tidos em tempos remotos como sistemas diluidores de proporções intangíveis, estão contaminados por excesso de compostos orgânicos e inorgânicos. Esse tipo de situação pode provocar queda acentuada da biodiversidade global, de maneira direta, caso as doses letais sejam alcançadas, ou indiretamente, por meio da eutrofização associada à reduções drásticas da concentração de O_2.

1.3 Ecotoxicologia e Biomarcadores

O termo ecotoxicologia foi introduzido por Truhaut em 1969 e é derivado das palavras ecologia e toxicologia. Refletiu a preocupação crescente com os possíveis efeitos que compostos químicos lançados no ambiente poderiam exercer sobre outras espécies que não apenas o homem. É a área do conhecimento incumbida de investigar os potenciais efeitos danosos de substâncias químicas (toxicologia) sobre ecossistemas, ou seja, no contexto ecológico. É um ramo da grande área denominada toxicologia ambiental (WALKER *et al*., 1996a).

Estabelecer a significância biológica da toxicidade dos resíduos tóxicos, isto é, progredir a partir dos resultados analíticos até a obtenção dos reais efeitos sobre indivíduos, populações ou comunidades, é uma realidade da ecotoxicologia (WALKER *et al*., 1996b).

Biomarcador é, em um sentido amplo, qualquer medida refletindo uma interação entre um sistema biológico e um risco em potencial, que pode ser químico, físico ou biológico (IPCS, 1993). Biomarcadores representam medidas do efeito, que podem estar relacionadas a quantidades particulares dos poluentes, e nesse sentido permitem avaliar os poluentes de forma quantitativa em termos biológicos (WALKER *et al*., 1996c). Essas respostas são avaliadas a partir dos organismos (bioindicadores) em diferentes níveis de organização sub-individual: molecular, celular e fisiológico (VAN DER OOST *et al*., 2003).

Os biomarcadores podem ser pouco ou muito específicos e estão divididos em biomarcadores de exposição, que indicam a exposição do organismo a um composto químico sem passar informação sobre o grau do efeito adverso provocado por essa mudança; e biomarcadores de efeito, capazes de demonstrar as alterações sofridas pelo organismo (WALKER *et al*., 1996d). Segundo BUCHELI e FONT (1995), os biomarcadores são sinalizadores de aviso antecipado, ou seja, refletem de maneira precoce as respostas biológicas adversas decorrentes de toxinas antropogênicas lançadas no ambiente. Sendo assim, efeitos observados sobre níveis hierárquicos muito altos, como comunidades e/ou

ecossistemas, estão relacionados a mudanças mais anteriores ocorridas sobre as funções biológicas. Nesse contexto, os biomarcadores podem apresentar um caráter preventivo, evitando que efeitos negativos atinjam hierarquias ecológicas mais derivadas e complexas (BAYNE *et al*., 1995).

Dados ecotoxicológicos relacionados à nocividade de uma substância para um organismo são coletados mais facilmente determinando sua toxicidade aguda, que é o início rápido de sintomas. Embora este tipo de toxicidade seja interessante quando somos expostos acidentalmente a produtos químicos puros, na ecotoxicologia estamos normalmente mais preocupados com as exposições crônicas a doses individuais relativamente baixas de um composto tóxico. Mesmo assim, é importante salientar que um mesmo xenobiótico pode provocar tanto efeitos agudos como crônicos no mesmo organismo, embora, normalmente, mediante mecanismos fisiológicos diferentes (BAIRD, 2002).

Como espécies distintas diferem significativamente quanto à sua suceptibilidade a um dado produto químico, os cientistas criaram as relações dose-resposta para substâncias tóxicas. Essas relações podem ser expressas na forma de curvas que relacionam o efeito percentual medido no organismo (por exemplo, inibição de crescimento, morte, dentre outros) a doses crescentes do agente tóxico; importante considerar que os resultados obtidos estarão sempre vinculados a um tempo total de exposição fixo, o mesmo ao qual o organismo foi exposto. Como a faixa de doses em tais gráficos excede com frequência uma ordem de grandeza, e como os efeitos no extremo inferior da escala de concentrações são muitas vezes importantes na tomada de decisões ambientais (e não podem ser claramente observados pelo uso de escalas lineares), o gráfico dose-resposta é frequentemente representado com escala logarítmica para os valores de dose. Normalmente, resulta dessa transformação uma curva em forma de “S” ou “sigmóide” (BAIRD, 2002).

A partir destas curvas determina-se a IC_{50}, concentração do agente tóxico que provoca 50 % do efeito medido no organismo testado. Quanto menor o valor de IC_{50}, mais tóxico é o produto químico, já que é requerida uma menor quantidade da substância para afetar o organismo testado (BAIRD, 2002). Uma vez determinada a IC_{50}, pode-se assumir o valor como referencial de condição de exposição com o intuito de caracterizar biomarcadores no organismo investigado.

Nas curvas dose-resposta existe uma dose abaixo da qual nenhuma das réplicas experimentais é afetada; ela é chamada de limiar ou NOEL. Após a obtenção do NOEL a partir de estudos com organismos cobaia que não seres humanos, é comum dividí-lo por um fator de segurança de 100 a fim de determinar-se a dose diária máxima (DDM) ou dose referencial de toxicidade (RfD) para humanos.

1.4 Os hidrocarbonetos policíclico aromáticos como poluentes

Segundo WALKER *et al*. (1996d), as principais classes de poluentes são 1) poluentes orgânicos, 2) íons inorgânicos, 3) compostos organometálicos, 4) isótopos radioativos e 5) poluentes gasosos. Nesta introdução, iremos nos ater à categoria dos orgânicos.

Poluentes orgânicos são aqueles que possuem carbono em sua estrutura química. Dentre eles, pode-se destacar, por exemplo, os detergentes e os hidrocarbonetos. Dióxido e monóxido de carbono, apesar de apresentarem átomos de carbono, são da categoria dos poluentes gasosos (WALKER *et al*., 1996d).

Os hidrocarbonetos são moléculas que apresentam baixa polaridade e baixa solubilidade em solventes orgânicos polares. São encontrados principalmente em depósitos de petróleo e de gás natural localizados no estrato superior da crosta terrestre. As principais fontes de poluição por hidrocarbonetos são os derramamentos de petróleo e a combustão incompleta de combustíveis fósseis, madeira e demais materiais orgânicos (WALKER *et al*.,

1996d). Os derramamentos de petróleo ocorrem principalmente por acidentes em navios-tanque, refinarias e locais de perfuração de petróleo (BAIRD, 2002).

Hidrocarbonetos podem ser divididos em duas categorias: 1) dos alcanos, alcenos e alcinos, e 2) dos hidrocarbonetos aromáticos, distintos por possuir um (monocíclico) ou mais (policíclico) anéis de benzeno na sua estrutura. As constantes de reatividade dos HPA são maiores do que a dos alcanos, o que os torna mais suscetíveis a transformações químicas e bioquímicas (WALKER *et al*., 1996d).

Levantamentos e relatórios elaborados por agências reguladoras ambientais facilitam entender a dimensão da poluição provocada pelos HPA à água, ar e solo. No estado de São Paulo, a Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental (CETESB), empresa pública integrante da Secretaria do Meio Ambiente (SMA), é a responsável por tais serviços. Em seus relatórios (disponíveis em www.cetesb.sp.gov.br) os HPA sempre figuram como uma categoria de poluentes que é encontrada com alta frequência no ambiente natural, algumas vezes em níveis acima daqueles estipulados como adequados à vida, caracterizando estas áreas como contaminadas.

Do total de HPAs, dezesseis estão indicados pela Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (US-EPA; www.epa.gov) como poluentes prioritários, os quais vêm sendo cuidadosamente estudados devido à sua toxicidade, persistência e predominância no meio ambiente. Dentre os HPA, pode-se destacar o benzo(a)pireno (BaP), que será tratado no tópico que segue.

1.5 Benzo(a)pireno

BaP apresenta estrutura química com cinco anéis benzênicos condensados e sua molécula é tida como um derivado do pireno: em tese, se um anel benzênico é adicionado à ligação “a” do pireno, é obtida uma molécula de BaP (BAIRD, 2002). A **Figura 2** mostra a molécula deste HPA.

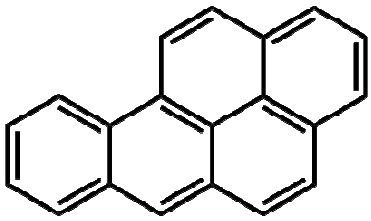


Figura 2. Estrutura química de BaP.

BaP é um dos poluentes prioritários que compõem a lista da US-EPA. Nesse sentido, para água potável, a US-EPA determina uma concentração máxima do contaminante (MCL) para BaP em 0,2 ng/mL. No Brasil o poluente também é motivo de preocupação, e dessa forma, a legislação que regulamenta as concentrações de BaP no ambiente também são rígidas. Tanto a CETESB quanto o Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) têm suas próprias determinações relacionadas ao HPA: a CETESB estipula para águas subterrâneas no Estado de São Paulo uma concentração máxima de 0,7 ng/mL de BaP, a partir da qual a área é considerada contaminada, indicando necessidade de ação remediadora por lei (CETESB, 2005); a Resolução CONAMA Nº 357, de 17 de março de 2005, estipula concentrações de BaP para corpos d'água compreendidas no intervalo de 0,018 a 0,7 ng/mL dependendo do tipo de uso destinado à água.

Nas últimas duas décadas a CETESB tem realizado o monitoramento de BaP por meio de amostragens de água (e dos sedimentos dos assoalhos submersos), ar e solo no Estado de São Paulo. Em 1999, houve um levantamento detalhado da região estuarina de Santos e São Vicente (CETESB, 2001). A **Figura 3**, gerada com os dados obtidos nessa época, mostra que em determinados setores do estuário as concentrações de BaP em organismos e nos sedimentos estavam acima daquelas toleradas para o consumo humano.

Figura 3. Mapa da contaminação por BaP no sistema estuarino de Santos e São Vicente, em 1999. Os locais 5, 6 e 7 (região estuarina de Santos) estavam, na época, sob forte influência dos efluentes das indústrias COSIPA, Ultrafértil e Dow Química, além da região portuária. Todos os símbolos preenchidos em vermelho representam amostragens nas quais os níveis de BaP apresentavam alta toxicidade. Os símbolos de organismos em vermelho representam amostras impróprias para consumo humano. Círculos rosa enumerados representam os locais amostrados. Dados: CETESB, Sec. do Meio Ambiente do Estado de São Paulo.

A CETESB, em 2008 (2008a), amostrou as três unidades principais da costa paulista: Litoral Norte, Baixada Santista e Litoral Sul. BaP pode ser detectado em amostras de sedimentos das três regiões, apesar de em todos os casos sua concentração estar abaixo da limiar (ou NOEL).

1.6 Compreendendo a toxicidade de BaP

Uma das características mais problemáticas dos HPA, e consequentemente de BaP, é sua capacidade carcinogênica. BaP é um dos carcinógenos mais conhecidos. Monitoramentos feitos de 200 anos até os dias atuais mostram que exposições ocupacionais em níveis elevados a alcatrão de hulha (carvão mineral), que tem BaP como principal componente tóxico, tenha induzido câncer em seres humanos. Em 1775, limpadores de chaminés já apresentavam maior incidência de câncer. Atualmente, observa-se que indivíduos que trabalham em fornos de coque e em indústrias de produção de gás têm risco maior de adquirir câncer de pulmão e rins. Na população em geral, um problema que chama a atenção da saúde pública é o hábito de fumar. Acredita-se que parte da toxicidade da fumaça de cigarros esteja relacionada à presença de alguns HPA (BAIRD, 2002).

A molécula de BaP em si não é um agente carcinogênico. Para se tornar tóxica, necessita ser transformada nos organismos mediante algumas reações metabólicas (BAIRD, 2002).

A primeira transformação química sofrida por BaP nos organismos é uma oxidação caracterizada pela formação de um anel epóxido a partir de uma ligação dupla C=C em um dos anéis benzênicos. Posteriormente, a mesma molécula de BaP pode sofrer adição de uma molécula de água junto ao epóxido, formando dois grupos –OH em carbonos adjacentes (*i.e.* BaP 7,8-diol). Ainda considerando-se o mesmo anel benzênico da molécula de BaP, a ligação dupla remanescente pode sofrer uma 2ª epoxidação, e o composto resultante, um diol-epóxido de BaP (BaPDE) é um eletrófilo ativo, isto é, uma molécula com grande afinidade por estruturas químicas com alta densidade de elétrons, como purinas e pirimidinas (BAIRD, 2002). Assim, a molécula de BaPDE tem a capacidade de formar um aduto com guanina (BaPDE-DNA), podendo ocasionar mutações por transversão do tipo G → T, o que pode levar ao câncer. Estas mutações também podem ativar proto-oncogenes, inativar genes

supressores de tumor, ou causar instabilidade genética (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007b).

Porém, não é apenas a formação do aduto BaPDE-DNA que atribui a BaP seu potencial carcinogênico. A atividade biotransformadora realizada por citocromo P450 (CYP450; detalhada em 1.9) e por peroxidases e ainda a ação oxidante de outras moléculas, como lipídeos e sulfitos, pode provocar a formação da espécie reativa de oxigênio (ERO) ânion radical superóxido ($^{\bullet-}O_2$) ao transformarem BaP em 6-hidroxibenzo(a)pireno. Em outro mecanismo, BaP 7,8-diol pode ser reduzido a catecol (ao invés de sofrer uma 2ª epoxidação, como descrito no parágrafo acima), cuja oxidação pode provocar a formação de outras ERO, quinonas e semiquinonas, todos capazes de gerar lesões ao DNA (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007b).

O atual balanço de evidências sustenta a noção de que ERO estão envolvidas com carcinogênese: elas podem ter ação proliferativa, induzir senescência, aumentar a atividade de p53, causar apoptose, facilitar a apoptose provocada por outros agentes, causar danos em DNA, recrutar fagócitos e ativar fatores da forquilha de transcrição da classe O. Dentre as lesões causadas por ERO sobre DNA pode-se destacar a formação de 8-oxo-2´-deoxiguanosina (8-oxodG) (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007a).

Tantos os adutos formados por BaPDE e DNA quanto 8-oxodG podem ser detectados e quantificados em amostras biológicas por diferentes métodos analíticos, os quais envolvem primeiramente uma etapa de separação dos constituintes da amostra por cromatografia líquida (LC) ou gasosa (GC), seguida de detecção do aduto em módulos detectores baseados em diferentes princípios, os quais podem ser utilizados isoladamente ou em associação: absorbância (UV e DAD), fluorescência (FL), e espectrometria de massas (MS) (LEE *et al*., 2003; MENSING *et al*., 2005; BELAND *et al*., 2005; SINGH *et al*., 2006; FENG *et al*., 2008; CHIANG e MEANS, 2008).

1.7 Defesas antioxidantes

Os sistemas biológicos possuem estratégias e mecanismos para protegerem-se das situações de desbalanço da homeostase redox proporcionadas pelos HPA. Dentre estas defesas estão os antioxidantes, que podem ser definidos como qualquer substância que quando presente em baixas concentrações se comparadas à concentração de um substrato oxidável, atrasa significativamente ou previne a oxidação deste substrato. Outras definições do termo também consideram que substâncias que removem danos oxidativos de moléculas alvo também podem ser consideradas como antioxidantes (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007a).

Superóxido dismutases (SOD) são metalo-enzimas antioxidantes altamente eficientes na remoção catalítica de ânion radical superóxido. A reação catalisada pela enzima é uma reação de dismutação: $^{\bullet-}O_2 + {}^{\bullet-}O_2 + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$. São três os tipos principais de SOD: 1) CuZnSOD, presente em todas as células pró e eucarióticas, principalmente no citoplasma; 2) MnSOD, presente em bactéria, fungos, plantas e animais; em fungos e animais estão principalmente em mitocôndrias; e 3) FeSOD, presente em pró e eucariotos com exceção dos animais; comum em cloroplastos (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007c).

O fato de $^{\bullet-}O_2$ ser a 1ª possibilidade de ERO a ser formada a partir de oxigênio molecular torna o papel biológico de SOD especial. Se um elétron é adicionado à molécula de O_2, $^{\bullet-}O_2$ é formado (**Fig. 4**). Assim, SOD é a enzima antioxidante que pode combater e interromper mais ao início a cascata de reações que pode formar outras ERO mais reativas do que $^{\bullet-}O_2$, a partir de $^{\bullet-}O_2$. A especificidade de SOD por $^{\bullet-}O_2$ é sempre utilizada para detectar o envolvimento de $^{\bullet-}O_2$ em processos biológicos; se SOD inibe o processo, então assume-se que $^{\bullet-}O_2$ está envolvido (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007c).

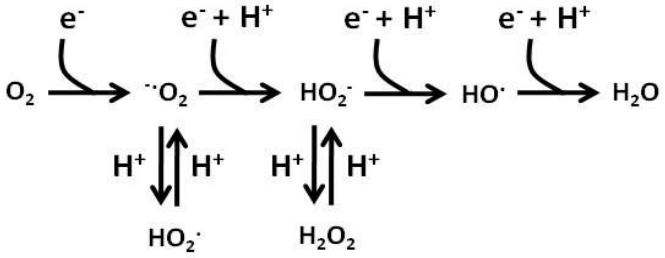


Figura 4. Principais vias de redução univalente do O_2 e formação de EROs. O_2: oxigênio molecular; $^{-\cdot}O_2$: ânion superóxido; HO_2^-: ânion hidroperoxil; $HO^\cdot$: radical hidroxila; $HO_2^\cdot$: radical hidroperoxil; H_2O_2: peróxido de hidrogênio.

Desempenhando papel antioxidante junto com SOD e também com outros sistemas envolvidos na remoção direta e indireta de ERO, tais como catalase (CAT), glutationa peroxidase (GPx), e ascorbato peroxidase (Apx), pode-se destacar o tripeptídeo de baixo peso molecular glutationa (GSH). São muitas as funções metabólicas desempenhadas por GSH, porém aqui vamos nos ater ao seu papel enquanto antioxidante (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007c).

In vitro, GSH pode reagir com várias ERO e com radicais centrados em carbono e em nitrogênio. Como GSH está presente nas células em altas concentrações (mM), essa remoção de ERO também se faz possível *in vivo*. Além de atuar como antioxidante na forma livre, GSH atua como cofator da família de enzimas antioxidantes das GPx, no metabolismo do ascorbato, e prevenindo a oxidação de grupos –SH de proteínas, impedindo seu cross-linking. Ao sofrer oxidação, GSH forma o dímero de glutationa GSSG ($2GSH \rightarrow GSSG + 2H^+$). Em células saudáveis, a razão GSH/GSSG é alta, variando de 5/1 até maior que 100/1. A reconversão de GSSG a GSH é feita pela enzima glutationa redutase (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007b).

Algumas publicações relatam alterações da atividade enzimática de SOD, do nível de transcrição dos seus genes (via RT-PCR) e também do conteúdo de GSH e GSSG em organismos expostos a BaP. O estresse oxidativo gerado por BaP e por outras moléculas quimicamente muito semelhantes pode ser observado em animais (MONARI *et al.*, 2007; LIN

e YANG, 2007; AN *et al*., 2008; FARINA *et al*., 2008; BEBIANNO e BARREIRA, 2009), algas (DUMMERMUTH *et al*., 2003; LEI *et al*., 2006), e em outros modelos experimentais.

1.8 A bioquímica da fotossíntese e seu potencial biomarcador

Quase toda a energia utilizada pelos organismos é proveniente direta ou indiretamente da energia solar, que pode ser capturada por algas, plantas e bactérias por meio da fotossíntese. A fotossíntese ocorre em 3 estágios: 1) absorção da energia solar; 2) utilização da energia solar para produzir ATP e poder redutor na forma de NADPH; e 3) uso da energia estocada na forma de ATP e de NADPH para a realização da fixação de carbono a partir de CO_2 (RAVEN e JOHNSON, 2001).

O processo fotossintético ocorre em organelas especializadas, chamadas de cloroplastos. Essas organelas possuem membrana dupla, à semelhança do que é observado em mitocôndrias. As membranas internas dos cloroplastos estão organizadas em sacos chamados tilacóides, os quais abrigam os pigmentos fotossintéticos, responsáveis por capturar a energia luminosa, e abrigam também o maquinário produtor de ATP. Desse modo, é o local de ocorrência da chamada etapa de reações luminosas da fotossíntese. A membrana tilacóide fica imersa em um sistema semi-líquido denominado estroma. É no estroma que estão localizadas as enzimas necessárias para a síntese de glicose, processo chamado de etapa das reações de carboxilação da fotossíntese (TAIZ e ZEIGER, 2004).

Os pigmentos fotossintéticos estão organizados em fotossistemas (PS), os quais são constituídos por 200 a 400 moléculas de pigmentos associadas a proteínas de membrana. Os PS são compostos por dois componentes intimamente ligados: o complexo do centro de reação e o complexo antena. Os pigmentos acessórios como as clorofilas *a*, *b*, *c* e *d*, mais os carotenóides e as ficobiliproteínas (exclusivas de cianobactérias e algas) fazem parte do complexo antena, que tem como função principal absorver os fótons e transferir a energia capturada para o complexo do centro de reação. O centro de reação é composto por moléculas

de clorofila *a*, que ao sofrerem excitação podem ceder seus elétrons para a cadeia de transporte de elétrons da fotossíntese (TAIZ e ZEIGER, 2004).

Esse fluxo de elétrons, que segue um gradiente crescente de valores de potenciais padrão de óxido-redução, ocorre a partir da oxidação sofrida pela água (fonte dos elétrons da fotossíntese) junto ao fotossistema II (PSII) oxidado. Resumidamente, após reduzirem o PSII, os elétrons são transferidos ao PSI, e deste para o $NADP^+$. A produção de ATP que ocorre associada a esse processo é denominada fotofosforilação (TAIZ e ZEIGER, 2004).

Dada a importância fisiológica do processo fotossintético e a compreensão atual que existe a respeito da sua bioquímica, este parece preencher os requisitos necessários para figurar como um bom biomarcador. Neste sentido, os trabalhos publicados por HUANG *et al*. (1996), CORDI *et al*. (1997), MARWOOD *et al*. (2003), MACFARLANE (2003), ALTENBURGER *et al*. (2004), DEWEZ *et al*. (2005), KUMMEROVÁ *et al*. (2006a, b), HIDEG e SCHREIBER (2007), HIDEG *et al*. (2007) relacionam alteração do rendimento fotossintético de organismos expostos a diferentes condições ambientais: exposição a herbicidas, a fungicidas, a metais pesados, a misturas complexas, a radiação UV-B, e a HPA.

Ainda, BOPP e LETTLERI (2007), utilizando RT-PCR, relatam a subexpressão do RNA_m dos genes envolvidos com fotossíntese *3Hfcp* A e B em microalgas expostas a HPA, sugerindo diminuição da taxa fotossintética destes organismos.

1.9 Citocromo P450 e BaP

O O_2 obtido pelos eucariotos aeróbios e que não é utilizado nas mitocôndrias é consumido em grande parte por enzimas oxigenases. O retículo endoplasmático de muitos organismos contêm isoformas da superfamília de oxigenases conhecida como citocromo P450. Nos procariotos, essas enzimas são solúveis. As oxigenases CYP450 estão envolvidas no metabolismo de substâncias endógenas nocivas e de xenobióticos. Os últimos também são denominados de “compostos estranhos”, já que não desempenham papel na bioquímica

normal dos organismos vivos (WALKER *et al*., 1996b). Essa metabolização transforma compostos lipofílicos em hidrofílicos, que são mais facilmente excretados do organismo (BUCHELI e FONT, 1995). Dessa forma, CYP450 recebe a caracterização de sistema de biotransformação.

HPA, caracterizados como xenobióticos tóxicos, são metabolizados por enzimas da fase I dos sistemas de biotransformação, das quais fazem parte as oxigenases CYP450. Essa 1ª etapa, também denominada transformação, gera produtos mais hidrofílicos, como fenóis, dihidrodióis, quinonas e epóxidos (LECH e VODICNIK, 1985). Posteriormente, os produtos da fase I podem ser conjugados por enzimas da fase II (*i.e.* papel desempenhado pela enzima GST) e em seguida compartimentalizados ou excretados por enzimas da fase III (VERMEULEN *et al*., 1992).

A catálise realizada por oxigenases CYP450 ocorre auxiliada pela ação da enzima CYP450 NADPH redutase. A metabolização dos xenobióticos se dá por meio de reações redox que incorporam um dos átomos de oxigênio de uma molécula de oxigênio molecular no substrato, que pode ser uma molécula do poluente, e convertem o outro átomo de oxigênio em água (*i.e.* atividade mono-oxigenásica) (KOOLMAN e ROEHM, 2005) (**Fig. 5**).

As enzimas de biotransformção são, normalmente, biomarcadores bioquímicos de efeito sensíveis quando organismos são expostos a xenobióticos, podendo ter suas atividades induzidas ou inibidas, como demonstraram PFLUGMACHER e SANDERMANN (1998). Assim, sendo o sistema mono-oxigenásico sensível a certos tipos de poluentes ambientais, sua atividade pode servir como monitor biológico (biomarcador) diante da exposição a certos tipos de compostos tóxicos.

Os sistemas biotransformadores estavam associados apenas a animais. Em 1992, SANDERMANN comentou sobre a caracterização de algas e macrófitas como “fígados verdes”, enquanto outros autores relataram sobre a participação destes organismos enquanto

importantes reservatórios de contaminantes ambientais (BOLWELL *et al*., 1994; PFLUGMACHER *et al*., 1999). Em 1998, CYP450 foi identificado em macroalgas (PFLUGMACHER e SANDERMANN, 1998), enquanto sua capacidade biotransformadora fora determinada em 1999 (PFLUGMACHER *et al*., 1999).

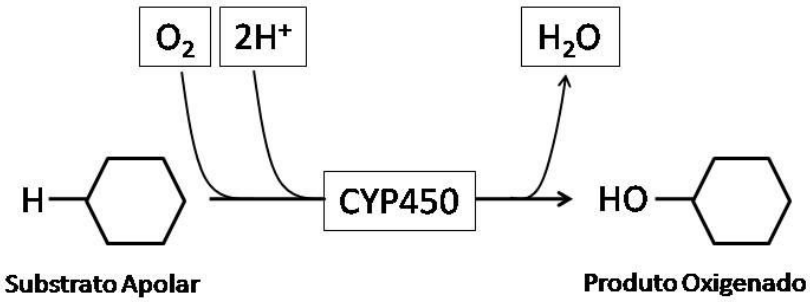


Figura 5. Esquema da reação catalisada por mono-oxigenases CYP450. Adaptado de KOOLMAN e ROEHM (2005)**.**

1.10 Análise química de BaP

Desde os anos 70, cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) é utilizado na separação de HPA (TITATO e LANÇAS, 2005). Atualmente, os métodos utilizados para a determinação de HPA em água são aqueles propostos pela US-EPA ou Standard Methods (www.standardmethods.org). Ambas recomendam análises cromatográficas, seja por GC ou por HPLC (CAVALCANTE *et al*., 2007).

O uso de HPLC acoplado a detecção por luz UV tem sido reportado por vários autores, porém devido às baixas concentrações de BaP encontradas nos diferentes corpos d`água, o enriquecimento do analito pode ser uma boa alternativa para que se consiga concentrações dos poluentes dentro dos intervalos de detecção das técnicas de análise recomendadas (LEE *et al*., 2003).

Neste sentido, US-EPA e Standard Methods recomendam como técnica de extração e enriquecimento de compostos orgânicos provenientes de matrizes aquosas a extração líquido-

líquido (LLE). Porém, a extração em fase sólida (SPE), por sua praticidade, diminuição de custos (utiliza volumes muito menores de solvente), e menor geração de resíduos, vem sendo utilizada de maneira crescente (CAVALCANTE *et al*., 2007). Para HPA em matriz aquosa recomenda-se SPE utilizando colunas com fase estacionária C18 (KISS *et al*., 1996).

A CETESB segue uma determinação da US-EPA de 1998 (Método 8310 – SW846) que sugere a detecção e quantificação de HPA a partir de HPLC/FL (CETESB, 2008b). As observações de LEE (2003) à respeito de BaP reforçam o método proposto pela US-EPA, uma vez que BaP é um composto que apresenta fluorescência relativamente intensa, o que permite o desenvolvimento de método analítico de detecção e quantificação mais seletivo e sensível quando comparado àqueles baseados apenas em absorção de luz UV.

2. Objetivos

Tendo em vista a grande diversidade de papéis ecológicos desempenhados pelas algas, a representatividade dos ecossistemas marinhos, e a necessidade atual de entendimento e contenção dos impactos gerados sobre esses ambientes e sobre as espécies que dele dependem direta e/ou indiretamente, o objetivo principal desse trabalho foi: elucidar a toxicidade de BaP sobre a macroalga vermelha *G. birdiae*.

Com esse intuito, os seguintes objetivos foram explorados:

i. Padronização das condições de cultura de *G. birdiae* em laboratório;

ii. Obtenção de uma curva dose-resposta relacionando inibição do crescimento da alga a concentrações crescentes de BaP para um período crônico de 15 dias; essa curva permitiu a determinação da IC_{50};

iii. Avaliação do estresse oxidativo sofrido pela alga em IC_{50} e em outras condições de exposição a BaP. Para tal, analisou-se os seguintes marcadores:

   a. A atividade da enzima antioxidante SOD;

   b. Os níveis do tripeptídeo antioxidante de baixo peso molecular GSH e do seu dímero GSSG.

iv. Avaliação do desempenho fotossintético da macroalga a partir da determinação de parâmetros fotossintéticos; a fotossíntese de *G. birdiae* foi utilizada como biomarcador de exposição a BaP em IC_{50} e em outras condições de exposição ao poluente;

v. Desenvolvimento de método analítico de separação, detecção e quantificação de BaP em HPLC/FL com o intuito de monitorar a concentração de BaP nos meios de cultura da alga; ferramenta útil para avaliar a capacidade biotransformadora da alga;

vi. Obtenção de iniciadores que venham a permitir no futuro a realização de experimentos de quantificação da transcrição de genes de enzimas envolvidas na defesa de *G. birdiae* frente a BaP;

vii. Desenvolvimento de método analítico para separação, detecção e quantificação da lesão oxidativa a DNA 8-oxodG, em HPLC/MS/MS;

viii. Tentativa de obtenção da fração microssomal e de utilização da técnica de determinação espectrofotométrica de CYP450.

3. Materiais e Métodos

3.1 Material biológico

As algas trazidas das Praias do Cotovelo e de Rio do Fogo (RN) foram tratadas de forma a se obter cultivos unialgais, isto é, cultivos contendo uma única espécie; no caso, *Gracilaria birdiae*. Para tal, no período pós-coleta, as algas foram mantidas em água do mar sem adição de nutrientes e com baixas condições de iluminação e aeração. Durante esse período, a maioria dos contaminantes biológicos como parasitas e outros organismos morreram. A alga, por ser autótrofa, não sofreu com o este tratamento.

Ainda no período pós-coleta, com o intuito de eliminar epífitas e outras espécies de algas e manter as culturas axênicas, limpou-se *G. birdiae* com material de manipulação como pinças e pincéis (sempre estéreis, mantidos constantemente em forno a 70 °C) e as algas também foram trocadas de meio semanalmente. Quando necessário, utilizou-se lupas e microscópios para a observação dos contaminantes biológicos que poderiam estar nos meios de cultura. Identificando-se o organismo, procedia-se, em último caso, com a administração do biocida correspondente.

Antes do início dos experimentos, *G. birdiae* foi aclimatada às mesmas condições de experimentação (fotoperíodo, intensidade luminosa, aeração, densidade de biomassa, concentração de nutrientes) por um período de 2 semanas. Durante a aclimatação, fez-se importante a troca periódica dos meios de cultura, o que também acontecia no início dos experimentos. Uma pré-seleção de ápices algais que respeitasse critérios como aproveitamento de ápices de um mesmo ramo algal (diminui variabilidade genética) e a semelhança estética apresentada ajudaram bastante na escolha das réplicas.

As algas que compunham o cultivo principal, o estoque de algas, eram mantidas nas condições gerais de cultivo que seguem: água do mar com salinidade 32 ‰, pH 7,9,

temperatura 25 °C, fotoperíodo de 14h de luz e 10h de escuro, aeração automática de 30 em 30 min., meio Von Stosch (VS) 0,1 % (v/v), irradiância de 90 – 100 µmol de fóton.$m^{-2}.s^{-1}$ (fornecidas por lâmpadas fluorescentes, brancas, frias, Philips TL-D 15 W/75-650). Irradiância monitorada utilizando-se o fotômetro PMA 2200 (Solar Light Company). A **Tabela 1** mostra os constituintes do meio nutritivo VS.

Tabela 1. Composição do meio Von Stosch. pH 7,8. Informações obtidas de Ursi e Plastino (2001).

Compostos	Von Stosch
$NaNO_3$	0,50 mM
$NaHPO_4.12H_2O$	30 µM
$MnSO_4.\ H_2O$	0,10 µM
$FeCl_3.6H_2O$	1,15 µM
Tiamina	0,59 µM
Biotina	4,10 nM
Cianocobalamina	0,74 nM
EDTA	12,70 µM

3.2 Preparação das soluções de trabalho de BaP

As soluções de BaP utilizadas para adicionar-se o poluente aos meios de cultura das algas eram preparadas da maneira como se descreve a seguir.

Uma solução estoque concentrada de BaP (mg/mL) era preparada em tetrahidrofurano (THF) : MeOH (1:1). Soluções de trabalho de BaP eram preparadas a partir de diluições realizadas da solução estoque, diluições essas feitas com MeOH 100 %. Como são diluições de algumas ordens de grandeza, as soluções de trabalho de BaP atingiam níveis ínfimos de THF. Preparava-se uma solução de trabalho do poluente para cada condição de exposição a BaP. A concentração de BaP nestas soluções de trabalho era sempre 100 vezes maior do que aquelas que pretendia-se obter nos meio de cultura das algas. Assim, para cada caso, 1 parte da solução de trabalho era misturada a 99 partes de água do mar, promovendo-se nesse

processo a diluição de 100 vezes de MeOH e também de BaP. Ao final, obtinha-se MeOH 1 % (v/v) e a concentração de BaP pretendida. Exemplo: para uma concentração final de BaP de 20 ng/mL nos meios de cultura das algas, preparava-se uma solução de trabalho de BaP 2000 ng/mL em MeOH 100 %. Desta, misturava-se 1 parte a 99 partes de água do mar.

3.3 Determinação da IC_{50} de BaP sobre *G. birdiae*

Determinou-se a IC_{50}, concentração de BaP na qual se observa inibição de 50 % do crescimento da alga, para um período de exposição de 15 dias. Cada amostra continha 8 talos uniapicais de aproximadamente 2 cm. Importante a padronização do número de ápices já que esta porção da alga é a que apresenta maior atividade meristemática. As concentrações de BaP utilizadas foram, em ng/mL: 0; 20; 50; 100; 200; 350; 500; 800; 2000.

As medições de biomassa de alga fresca foram realizadas de 3 em 3 dias, sempre no mesmo horário, obtidas após leve secagem em papel toalha.

O tratamento dos dados procedeu da seguinte maneira: valores brutos de biomassa (em mg) foram logaritmizados e cruzados contra o tempo (em dias). Esse cruzamento permitiu a obtenção de retas, cujos coeficientes angulares foram assumidos como taxas de crescimento (TC) (LAING *et al*., 1989). Em seguida, realizou-se a normalização destes valores de TC e a logaritmização dos valores das concentrações de BaP utilizadas no intervalo 0 – 2000 ng/mL; o cruzamento entre os dados de TC normalizadas com os valores logaritmizados de concentrações de BaP revelou uma natureza não linear em forma de "S" do tipo dose-dependente. A curva que melhor se ajustou a estes dados foi a sigmoidal com inclinação variável, a partir da qual fez-se possível a determinação da IC_{50}. Para análise dos dados obtidos, o programa GraphPad Prism (versão 4) foi utilizado.

As condições às quais as algas eram pré-aclimatadas por 2 semanas antes do início dos experimentos e as condições de cultivo das algas durante a condução dos experimentos eram as mesmas daquelas citadas em condições gerais de cultivo do último parágrafo do ítem 3.1,

considerando-se, além daquelas, a adição de MeOH 1 % (v/v) e uma densidade de 2 mg de alga por mL de meio de cultura. Essas condições valem para todos os experimentos apresentados nesta dissertação, e não apenas para o experimento de obtenção da IC_{50}. Ainda, para minimizar possíveis efeitos de iluminação diferencial dentro das incubadoras, realizou-se rodízio das amostras nas diferentes prateleiras.

3.4 Defesas Antioxidantes

Uma enormidade de artigos científicos relatam a ocorrência de geração de estresse oxidativo em decorrência da exposição a BaP. Neste sentido, três biomarcadores clássicos deste tipo de estresse foram investigados: a enzima antioxidante SOD, o antioxidante de baixo peso molecular GSH e o dímero GSSG.

3.4.1 SOD

3.4.1.1 Preparação dos extratos

A uma biomassa de alga fresca que variou entre 200 e 500 mg era adicionado N_2 líquido para o congelamento do organismo, manutenção da situação metabólica resultante do tratamento aplicado e também para facilitar a trituração do material biológico; procedeu-se com a diluição de 5 vezes desse material: para cada mg adicionava-se 5 µL de tampão fosfato 20 mM, pH 7,4, contendo Triton X-100 1 % (v/v), PMSF 1 mM, isopropanol 1 % (v/v), e NaCl 150 mM.

Em seguida, as amostras eram trituradas em triturador de tecido Tissue Tearor (Tekmar Ultra-Turrax, 20.000 rpm) por 20 segundos, sempre imersas em gelo. Esse triturado era então levado ao sonicador de ponteira (Sonifier 250, Branson) num processo composto de 10 ciclos: 5 ciclos de 15 segundos de aplicação de pulso (amplitude de 50 %) alternados com 5 ciclos de descanso, sem aplicação de energia. Seguia-se com a centrifugação a 4 °C, 16.000 g, por 15 min. O sobrenadante era a fração que continha SOD. O ensaio era realizado imediatamente.

3.4.1.2 Ensaio enzimático

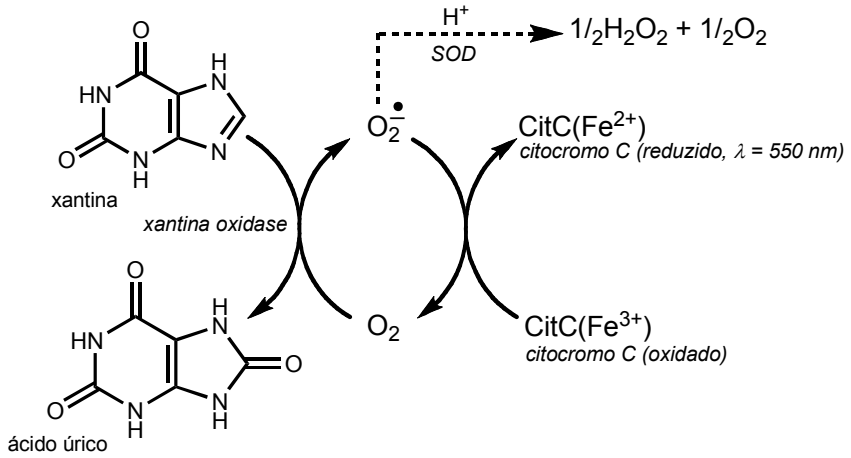


Figura 6. O esquema mostra o que ocorre dentro da cubeta durante o ensaio para se determinar a atividade de SOD. Ao oxidar xantina, xantina oxidase reduz oxigênio molecular a ânion superóxido ($^{\bullet-}O_2$), que, em seguida, reduz o Fe^{3+} do citocromo c (CitC) a Fe^{2+}; a formação de CitC(Fe^{2+}) pode ser monitorada em espectrofotômetro a 550 nm. Se o homogenato contiver SOD, esta dismutará $^{\bullet-}O_2$ a peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e oxigênio (O_2), impedindo, em parte, a redução de CitC(Fe^{3+}) a CitC(Fe^{2+}).

O meio de reação foi preparado com 25 mL de tampão fosfato 50 mM, pH 7,8, contendo EDTA 0,10 mM; aos 25 mL adicionava-se 10 mL de solução de NaOH 10 mM, 0,76 mg de xantina e 6,2 mg de ferricitocromo c (CitC da **Fig. 6**). Preparou-se, à parte, uma solução 0,50 U/mL de xantina oxidase (25 U/mL). Como esta enzima degrada facilmente, é necessário, primeiramente, verificar a sua atividade. Para tanto, adicionavam-se à uma cubeta de 1 mL volumes diferentes da solução de xantina oxidase descrita, 700 µL de meio de reação e volume de tampão (fosfato 50 mM, EDTA 0,1 mM, pH 7,8) suficiente para completar 1 mL; monitorou-se a variação da absorbância em espectrofotômetro em 550 nm, a 25 ºC, por 3 min. O volume de xantina oxidase utilizado no ensaio foi aquele que fornece uma reta de coeficiente angular em torno de 0,025 unidades de absorbância.min^{-1}.

O ensaio de SOD foi iniciado adicionando-se à uma cubeta de 1 mL 700 µL de meio de reação, 5 µL de homogenato, e o volume de xantina oxidase encontrado no teste anterior. O volume final foi sempre acertado para 1 mL com tampão fosfato 50 mM, EDTA 0,1 mM, pH 7,8. Monitorou-se a absorbância em 550 nm, a 25 ºC, por 3 min. A atividade de SOD foi

obtida por meio da determinação das inclinações das retas (k) com e sem homogenato. Calculou-se a inibição percentual através da relação ($1 - k_{\text{com homogenato}}/k_{\text{sem homogenato}}$) x 100 e, finalmente, determinou-se a atividade de SOD por meio do valor em 50 % de inibição, multiplicando-se, ainda, pelo fator de diluição do homogenato na cubeta. Uma unidade de SOD é definida como a quantidade necessária para inibir a redução do ferricitocromo c em 50 % (FLOHE e OTTING, 1984).

3.4.2 Níveis de GSH e do dímero de glutationa GSSG

3.4.2.1 Preparação dos extratos

Partiu-se de 300 mg de biomassa de alga fresca, à qual adicionou-se N_2 líquido para o congelamento do organismo, o que permitiu a manutenção da situação metabólica resultante do tratamento aplicado e uma pré-trituração do material biológico. O material sofreu diluição de 10 x (para cada mg de alga adicionou-se 10 µL de tampão) em tampão fosfato 100 mM, pH 7,0, NEM 10 mM. Em seguida, o material foi levado para trituração em mixer Tissue Tearor (Tekmar Ultra-Turrax, 20.000 rpm), por 20 segundos, amostra envolta em gelo. O extrato foi então submetido a ultra-som, em sonicador de ponteira (Sonifier 250, Branson), num processo composto de 16 ciclos: 8 ciclos de 15 segundos de aplicação de pulso (amplitude de 50 %) alternados com 8 ciclos de descanso, sem aplicação de energia. Procedeu-se uma centrifugação a 10.000 g por 20 min. e coletou-se o sobrenadante.

3.4.2.2 Determinação da concentração de GSH e GSSG

O sobrenadante resultante foi injetado em sistema HPLC (Agilent 1200®) acoplado a um espectrômetro de massas (QTRAP-3200 Applied Biosystems®/SCIEX com fonte turbo-V), composto de fonte ESI e analisador de massas do tipo triplo quadrupolo, utilizando-se um método analítico previamente desenvolvido por colegas de laboratório (dados em processo de publicação). O programa utilizado para operação remota foi o Analyst versão 1.4.2, Applied Biosystems/MDS SCIEX.

Esse método de separação, detecção e quantificação de GSH e GSSG desenvolvido consistiu na utilização de coluna C18 (5 µm, 250 x 4,6 mm, Luna, Phenomenex), com volume de injeção de amostra de 10 µL, fluxo de 0,9 mL/min, gradiente binário [A – 65 % de MeOH, ácido fórmico 0,1 %, 5 mM de acetato de amônio; B – ácido fórmico 0,1 %, 5 mM de acetato de amônio]: 0 – 0,5 min. 100 % de B; 0,51 - 2,0 min. 0 % de B; 2,01 – 5 min. 0 % de B; 5,01 – 5,05 min. 100 % de B; 12 min. 100 % de B. Os tempos de retenção de GSH e GSSG eram, respectivamente, 6,28 e 5,99 min. Para identificação e quantificação de glutationa nos seus diferentes estados redox, utilizou-se fragmentação (MS/MS) no modo monitoramento de reação múltipla (MRM). As curvas de calibração do método apresentaram-se linear no intervalo 50 – 5000 ng/mL ($r > 0,99$).

Durante a padronização deste método, percebia-se alteração da razão GSH/GSSG das amostras com o passar do tempo. O valor da razão apontada acima diminuía, ou seja, moléculas de GSH oxidavam-se, formando o dímero GSSG. Para evitar que houvesse interferência dessa reação química nos dados de quantificação obtidos, permitindo uma análise confiável do balanço das formas de glutationa, a estratégia adotada foi derivatizar (por 15 min., temperatura ambiente 25 °C) as moléculas de GSH com NEM, derivatizante químico com alta capacidade de reagir de forma estável com grupamentos tiol no intervalo de pH 6,5 – 7,5 (–SH da cadeia lateral da cisteína realiza ataque à dupla ligação do anel do NEM, estabilizando-se) (CAMERA e PICARDO, 2002). Dessa maneira, a massa rastreada no espectrômetro de massas, para GSH, era na verdade a resultante da soma da massa de GSH + NEM + 1 (433,1 Da) (**Fig. 7**), sendo o 1 referente à ionização positiva por adição de 1 próton. Para a detecção e quantificação de GSSG a massa rastreada era 613,1 Da, resultante da soma de GSSG + 1.

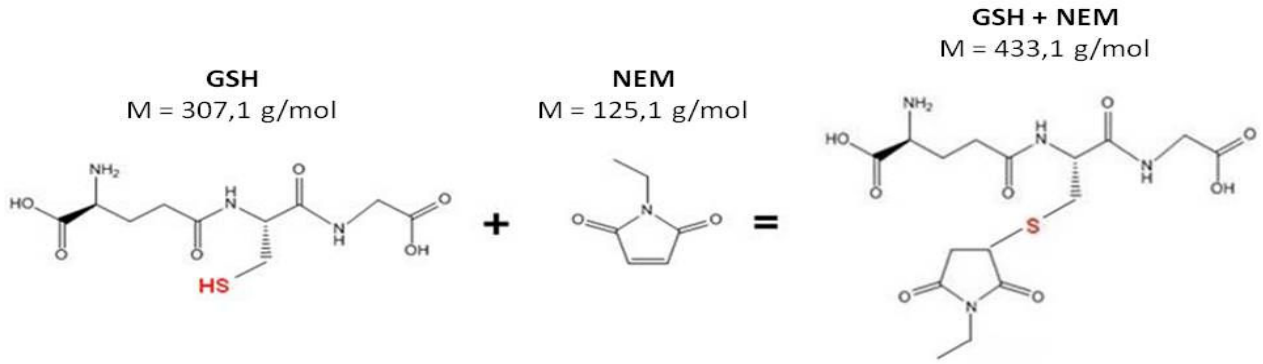


Figura 7. Esquema apresentando as moléculas e as respectivas massas moleculares (M, em g/mol) de glutationa (GSH) e *N*-etilmaleimida (NEM), assim como a molécula de glutationa derivatizada com NEM (GSH + NEM).

Após a realização das quantificações, determinou-se o Índice Redox (IR) das amostras. O IR informa qual percentual de moléculas de glutationa encontra-se na forma reduzida de GSH (antioxidante). Para o cálculo do IR, fez-se necessário transformar os valores de quantidade de GSSG encontrados nas amostras em valores de quantidade de GSH. O valor do IR pode ser obtido pela equação: {quantidade de GSH/ quantidade de GSSG (transformada para valores de quantidade de GSH) + quantidade de GSH} x 100 (o índice é uma porcentagem).

Para a transformação das quantidades de GSSG encontradas nas amostras em valores de quantidade de GSH, fez-se necessário levar em consideração a estequiometria 2 GSH → 1 GSSG + 2 H^+, e também que as massas moleculares de GSH e GSSG, são, respectivamente, 307,32 g/mol e 612,63 g/mol. Quanto maior o valor encontrado para o índice, maior a capacidade antioxidante do organismo, já que uma maior parcela do total de moléculas de glutationa encontra-se na forma reduzida.

3.5 Quantificação de proteína

O conteúdo protéico solúvel dos extratos algais utilizado para normalizar os resultados de atividade de SOD foi obtido pelo método de BRADFORD (1976). Para a confecção da

curva de calibração utilizou-se 5 alíquotas de BSA (20 a 100 µL de uma solução 0,1 mg/mL), 200 µL de reagente de Bradford (Coomassie®, cromóforo Brilliant Blue G 250, apresenta absortividade máxima em 595 nm) e água para completar 1 mL. A proteína das amostras foi determinada em 5 µL de homogenato adicionado a 795 µL de água e 200 µL do reagente de Bradford. Leituras das amostras realizadas em 595 nm, em espectrofotômetro Hitachi U-2000.

3.6 Análise da fotossíntese de *G. birdiae*

O desempenho fotossintético da alga foi determinado por meio de leituras de fluorescência da clorofila *a* do fotossistema II dos cloroplastos de *G. birdiae* (NECCHI, 2004; NECCHI e ALVES, 2005). Para tal, utilizou-se o fluorímetro Underwater Fluorometer Diving-PAM (Walz, Alemanha), um analisador submersível de desempenho fotossintético que apresenta funcionamento baseado em pulso de luz de amplitude modulada (PAM) associado a pulsos de luz saturante. O método é pouco invasivo, o que permite obter dados de uma mesma amostra em momentos distintos de um mesmo experimento.

Padronizou-se a quantidade de clorofilas que foram lidas por amostra por meio dos valores de F_t, que estiveram entre 0,2 e 0,4 unidades de fluorescência antes do início das leituras. Os ápices dos talos (sempre uniapicais) foram as regiões algais a partir das quais os dados fotossintéticos foram obtidos. Em cada leitura, 6 talos da alga eram posicionados dentro do adaptador (apresentado em 4.4), todos eles com suas extremidades apicais voltadas para o cabo de fibra ótica do equipamento.

Foram obtidas de cada réplica experimental curvas PI. Estas curvas relacionam rETR (variável dependente) com níveis crescentes de PAR (variável independente) aplicados sobre a alga pelo fluorímetro.

Após a obtenção das curvas PI, pode-se obter os valores dos parâmetros fotossintéticos que permitiram avaliar de fato a fotossíntese da alga em cada uma das situações apresentadas. A melhor curva que passa pelos pontos dos gráficos PI e os valores de 3 variáveis

fotossintéticas foram obtidos a partir da aplicação da equação de PLATT *et al*. (1980). As 3 variáveis foram: eficiência fotossintética (α), intensidade de luz saturante (I_k) e fotoinibição (β).

Além disso, para cada amostra, mais dois parâmetros fotossintéticos foram determinados: o RQE = $\Delta F/F_{m'}$, do qual $\Delta F = F_{m'} - F_t$; e a $rETR_{max} = \Delta F/F_{m'}$ x PAR x 0,5; 0,5 corresponde ao percentual de luz incidente sobre a alga que é absorvido pelo fotossistema II (50 % da luz total para cada fotossistema).

3.7 Método analítico para detecção e quantificação de BaP nos meios de cultura da alga

Este tópico irá descrever o método analítico desenvolvido em sistema HPLC/RF para quantificar BaP nos meios de cultura de *G. birdiae*. Com o uso dele foi possível investigar um pouco sobre a biotransformação de BaP pela alga, sobre a solubilidade do poluente em água do mar e sobre o rendimento dos processos de extração realizados.

Utilizando uma coluna C18 (5 µm, 250 x 4,6 mm, Luna, Phenomenex), o método consiste na injeção de 20 µL de amostra, fluxo de 1 mL/min, gradiente binário de separação: 0 – 5 min., 80 % de ACN; 5 – 7 min., 95 % de ACN; 7 – 15 min., 95 % de ACN; 15 – 17 min., 80 % de ACN; 17 – 24 min., 80 % de ACN. De 0 – 8 min., λ_{ex} 270 nm e λ_{em} 330 nm, que são as características de fluorescência do NFL, com tempo de eluição em 5,4 min. A partir de 8,01 min. até 24 min., as características de excitação e de emissão utilizadas passam a ser as do BaP: λ_{ex} 250 nm e λ_{em} 420 nm. BaP é detectado em 12,8 min. A curva de calibração do método apresentou-se linear no intervalo 0,25 – 50 ng/mL ($r > 0,98$). Amostras de BaP injetadas a partir de fase orgânica metanólica.

O sistema cromatográfico utilizado era composto de módulos Shimadzu: duas bombas isocráticas LC-6AD, auto-injetor SIL-10AF, detector de fluorescência RF-10Axl, módulo de

controle SCL-10Avp e degaseificador de hélio DGU-2A. Operação remota executada pelo programa de computador Class-VP versão 6.14, Shimadzu.

3.8 Enriquecimento de BaP

Uma vez que a água do mar apresentou-se como uma matriz complexa para ser injetada no sistema analítico descrito acima, procedeu-se com a extração de BaP dos meios de cultura da alga de maneira a poder ressuspendê-lo e injetá-lo a partir de fase orgânica metanólica. Ainda, isso permitiria investigar concentrações de BaP dos meios de cultura das algas que estivessem abaixo do LOD e LOQ do método analítico desenvolvido.

3.8.1 Extração em fase sólida

A extração de BaP dos meios de cultura das algas pelo método SPE baseou-se no seguinte procedimento: condicionamento/ativação dos cartuchos C18 com 12 mL de ACN; lavagem, para remoção do ativador, com 15 mL de água MilliQ; 100 mL de amostra; nova lavagem, desta vez para remoção de eventuais traços da amostra que tenham ficado retidos na coluna, com 15 mL de água MilliQ; eluição do poluente com 12 mL de ACN. As etapas descritas respeitaram um fluxo aproximado de 2 mL/min. Secagem do eluato em fluxo de N_2 e re-suspensão de BaP em 100 µL de MeOH:THF (1:1), com posterior diluição para 500 µL em MeOH. Ao final, procedeu-se com a injeção em sistema analítico HPLC/RF.

As colunas C18 (Cartuchos Sep-Pak C18 Classic, Waters) foram utilizadas acopladas a um sistema de vácuo Vacuum Manifold Visiprep DL (Supelco) e bomba de vácuo.

3.8.2 Extração líquido-líquido

As experiências de extração de BaP dos meios de cultura das algas pelo método LLE consistiram na utilização, em separado, de 3 solventes orgânicos: DCM; hexano; e éter:hexano (1:1). Para cada um dos solventes, 5 mL de água do mar contendo 10 ng/mL de BaP foram misturados com 3 volumes de fase orgânica de 30 % de 5 mL (volume da amostra inicial). Essa mistura foi feita em vórtex, por 2 min., por volume. Ao Final, os 3 volumes

foram reunidos e a fase orgânica foi totalmente evaporada em fluxo de N_2. BaP foi ressuspenso em 100 µL de MeOH:THF (1:1), com posterior diluição para 500 µL em MeOH. Ao final, procedeu-se com a injeção em sistema analítico HPLC/RF.

3.9 Extração e digestão do DNA total de *G. birdiae*

As extrações de DNA total de *G. birdiae* foram realizadas com o intuito de permitir a realização dos experimentos de biologia molecular e de análise de possíveis danos gerados ao DNA da alga pela exposição a BaP. Com relação à última, o DNA extraído ainda sofreu digestão a nucleosídeos antes de ser injetado em sistema HPLC/MS/MS.

3.9.1 Extração de DNA

A extração de DNA de Rhodophyta foi realizada de acordo com o que está descrito em FAUGERON *et al*. (2001), com adaptações.

A 50 mg de biomassa de alga fresca pré-macerada (em almofariz e pistilo com N_2 líquido; amostra não pode descongelar) foram adicionados 800 µL de tampão de lise (Tris 0,1 M, pH 8,0; EDTA 0,05 M; NaCl 0,2 M; KAc 2,5 M), 100 µL de Tween 20 (10 %, v/v) e 16 µL de proteinase k (solução a 10 mg/mL, em MilliQ). A essa mistura, adicionou-se 5 µL de RNAse (10 mg/mL) e deixou-se incubando por 1h em temperatura ambiente. Passada 1h, realizou-s centrifugação a 15.000 g por 15 min., a 4 °C. O sobrenadante foi recuperado (cortar pontas das ponteiras para evitar fragmentação do DNA).

Ao sobrenadante foi adicionado: 700 µL de fenol equilibrado com Tris-HCl pH 8,0; mais 700 µL de solução clorofórmio:álcool isoamílico (24:1); e misturou-se delicadamente, por inversão, por 3 min. Em seguida, centrifugou-se a 22.000 g por 20 min., a 4 °C. O sobrenadante (fase aquosa) foi coletado e transferido para um novo tubo. À fase aquosa adicionou-se 500 µL de solução clorofórmio:álcool isoamílico (24:1) e misturou-se delicadamente por inversão. Centrifugou-se a 22.000 g por 5 min., a 4 °C. O sobrenadante

(fase aquosa) foi coletado e transferido para um novo tubo. O DNA foi precipitado adicionando-se 2,5 volumes de EtOH 96 % gelado; precipitação overnight, a -20 °C.

As amostras foram centrifugadas a 15.000 g por 15 min., a 4 °C. Descartou-se o EtOH dos tubos. O DNA ficou grudado no fundo do frasco. Adicionou-se 500 µL de EtOH 70 % gelado e misturou-se delicadamente. As amostras foram centrifugadas a 15.000 g por 5 min., a 4 °C. Descartou-se o EtOH e o DNA foi seco em Speed Vac (SC 110, Savant) por 30 min. Ressuspendeu-se o DNA em 50 µL de água MilliQ e misturou-se delicadamente, por inversão do tubo. O DNA foi mantido em freezer a -20 °C.

Para quantificar e conferir a qualidade do DNA das amostras, utilizou-se um espectrofotômetro (NanoDrop 1000, Thermo). A razão de absorção 260/280 nm, que deve ser ≥ 1,8, e um espectro de absorção no intervalo 230 - 320 nm foram obtidos. É importante que apareça um pico de absorção proeminente em 260 nm (absorção por DNA).

3.9.2 Digestão de DNA

Após a obtenção de um DNA de alta qualidade, as amostras foram secas mais uma vez antes do início da preparação dos nucleosídeos.

Ressuspendeu-se 100 µg de DNA seco em 175 µL de: desferroxamina (DFAM) 0,1 mM (adicionada fresca, no dia) e acetato de Na 20 mM, pH 5,0. Hidrolisou-se o DNA a nucleotídeos com 2,5 µL de DNAse I (Qiagen) e 10 µL de tampão da enzima (tampão RDD), por 10 min., a 25 °C. Em seguida, o pH foi ajustado para 8,5 com a adição de 3,3 µL de Tris-HCl 1,5 M pH 8,8. Hidrolisou-se a nucleosídeos com a adição de 4 µL de fosfatase alcalina (Pharmacia Biotech, 4 U/µL) e volume de tampão da enzima (one-phor-all plus 10 x) de maneira a ficar com concentração final de uma 1 vez; reação de 1h a 37 °C. A solução de digestão foi neutralizada com 20 µL de acetato de sódio 3 M pH 5,2. Inibiu-se as atividades enzimáticas restantes por meio da adição de 20 µL de solução de EDTA 50 mM, DFAM 1 mM. Por fim, as enzimas, que são moléculas grandes e podem provocar entupimento das

colunas cromatográficas, foram removidas das amostras a partir de filtração em filtros para centrífuga Microcon YM-10 (Millipore; corte para 10 kDa), por 30 – 45 min., 17.000 g, a 4 °C. As amostras foram analisadas o mais rápido possível.

3.10 Método analítico para separação, detecção e quantificação de 8-oxodG

O filtrado (ítem 3.9.2) foi injetado em cromatógrafo do tipo HPLC (Agilent 1200®) composto por auto injetor, forno de coluna e bomba quaternária, acoplado a espectrômetro de massas (QTRAP-3200 Applied Biosystems®/SCIEX com fonte turbo-V), composto de fonte ESI e analisador de massas do tipo triplo quadrupolo. O programa utilizado para operação remota foi o Analyst versão 1.4.2, Applied Biosystems/MDS SCIEX.

O método consiste na separação, detecção e quantificação de 8-oxodG utilizando-se coluna polar (4 µm, 150 x 2 mm, Polar-RP 80A Synergi, Phenomenex) acoplada à pré-coluna polar (4 x 2 mm, Polar-RP, Phenomenex), fluxo de 0,2 mL/min. por 10 min., análise isocrática: H_2O + ácido fórmico 0,1 % (v/v) : MeOH (85:15, v/v). O tempo de retenção de 8-oxodG foi 4,88 min. Para a análise de massas utilizou-se fragmentação no modo monitoramento de reação múltipla. No quadrupolo 1 era selecionada a razão *m/z* de 284,3 unidades de massa atômica (amu) correspondente ao íon precursor de 8-oxodG protonada; no quadrupolo 3 era selecionada a razão *m/z* de 168,4 amu correspondente ao íon produto gerado durante a quebra do íon precursor no quadrupolo 2.

Para a construção da curva de calibração utilizou-se volumes de injeção da solução padrão de 8-oxodG (15 ng/mL) no intervalo 0,5 – 25 µL, temperatura do forno e coluna a 30 °C. A curva de calibração, relacionando área do pico cromatográfico e quantidade em massa de 8-oxodG injetada na coluna, apresentou-se linear no intervalo 7,5 – 375 pg ($r > 0,99$).

A validação do método baseou-se nos critérios da Resolução 899 de maio de 2003 utilizado pela ANVISA para estudos bioanalíticos.

Este mesmo método permitiu a quantificação de dG. Dessa forma, tornou-se possível a quantificação de nucleosídeos de guanina oxidados (8-oxodG) pela quantidade total de nucleosídeos de guanina (dG) encontrados nas amostras.

3.11 Biologia molecular de *G. birdiae*

Foram desenhados pares de iniciadores específicos para os genes das seguintes enzimas: CYP450 (1 par de iniciadores desenhado), GST (2 pares), CAT (2 pares) e CuZnSOD (2 pares). Em colaboração com a PhD. Ângela Tonon e com o MSc. José Barufi, pares de iniciadores para GPx (1 par), APx (1 par) e ACT (1 par) foram obtidos. Na **Tabela 2** é possível observar algumas características dos iniciadores.

Tabela 2. Iniciadores utilizados nos PCR realizados com DNA da macroalga *G. birdiae*. Estão apresentados os sentidos, as sequências e as temperaturas de fusão (T_m) de cada um deles, além do gene ao qual estão relacionados. As letras B, D, H, K, R, S, V, W, Y representam degenerações.

Iniciadores – *G. birdiae*			
Gene	Sentido	Sequência	T_m (°C)
CYP450	FW	**5'** GCH TTC HTH CCR TTT GG **3'**	42 – 45
	RV	**5'** ATA AAR AYR TCR GTH CC **3'**	26 – 37
GST	FW 1	**5'** CSA ART CAA GGT AYT T **3'**	30 – 39
	RV 1	**5'** GAT GGT YGG GTG RCT RCC **3'**	43 – 52
	FW 2	**5'** GYG ATT CGC TKA CCT TGG **3'**	48 – 52
	RV 2	**5'** GTD CCR TGB GGT TCR TCC **3'**	43 – 54
CAT	FW 1	**5'** GCY GTC AAR TTY TAC AC **3'**	38 – 42
	RV 1	**5'** GCV AKY TGC TCR TTC TC **3'**	44 – 52
	FW 2	**5'** GAY GSS ATC AAG TTC CC **3'**	43 – 48
	RV 2	**5'** TGC ARC AGC TTR TCR TC **3'**	41 – 49
CuZnSOD	FW	**5'** CAY GGC TTY CAY ATY CA **3'**	31 – 33
	RV 1	**5'** CGC SGT TWG CAA AYC CGR TG **3'**	49 – 54
	RV 2	**5'** CAY CAC CAC AAA CAA CAC C **3'**	44 – 45
GPx	FW	**5'** AAA TCA AGT CTC GCC CAG TG **3'**	53
	RV	**5'** AGA GGT CGT AGC CAG CTT GA **3'**	56
APx	FW	**5'** AAA GTA TGC TGC GGA CCA AG **3'**	54
	RV	**5'** TCC ATT GCA GCA TCT ACT GG **3'**	53
ACT	FW	**5'** AAG ATG AGT ACG TTG GTG ACG C **3'**	55
	RV	**5'** ATC TTT TCC ATA TCG TCC CAG TT **3'**	53

Com relação à ACT, que é uma das proteínas eucarióticas mais abundantes e conservadas (EGELMAN, 2003), esta não está envolvida na defesa dos organismos contra poluentes da categoria dos HPA. Porém, sua participação nas reações de RT-PCR seria como controle constitutivo (função normalizadora) da expressão gênica da macroalga.

Os iniciadores foram desenhados com base em sequências de DNA publicadas em artigos e depositadas em bancos de dados públicos (NCBI). Alinhamentos de seqüências

homólogas e geração de seqüências consenso foram realizados usando-se o software BioEdit (http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html).

Devido à escassez de sequências de DNA de organismos aparentados com *G. birdiae* e à necessidade de realização de alinhamentos a partir das sequências daqueles organismos mais aparentados disponíveis, os iniciadores desenhados apresentaram as degenerações mostradas anteriormente. Nestes organismos, como as regiões conservadas não mostraram-se longas, os iniciadores ficaram com um comprimento final relativamente curto. Os iniciadores obtidos da colaboração não apresentavam degenerações, uma vez que foram desenhados a partir de biblioteca de EST (http://gracilaria.ib.usp.br/mirror/gracilaria/) de *Gracilaria tenuistipitata* para a realização de experimentos de RT-PCR com a mesma espécie. Assim, estáva-se apostando na conservação entre as sequências de DNA das duas espécies de *Gracilaria* para que os iniciadores de *G. tenuistipitata* pudessem funcionar.

3.11.1 Reação em cadeia da DNA polimerase

A reação em cadeia da DNA polimerase (PCR) foi realizada em termociclador Robocycler (Stratagene). A PCR foi feita em tampão Tris-HCl 10 mM pH 8,4 contendo KCl 50 mM, gelatina 0,01 % (p/v), Triton X-100 0,1 % (p/v), $MgCl_2$ 4 mM e dNTPs 0,2 mM; o DNA molde foi extraído a partir de *G. birdiae* não exposta a BaP. Os iniciadores utilizados estavam em uma concentração final de 1 μM, juntamente com 5 U de Taq DNA polimerase (Invitrogen).

Cada reação de PCR consistiu em 35 ciclos, cada um constituído de três fases. Na primeira há uma incubação por 30 seg a 94 ºC para desnaturação da dupla-fita do DNA; na segunda incuba-se o material por 45 seg na temperatura de anelamento dos iniciadores; e na terceira, incuba-se por 45 seg a 72 ºC para alongamento da nova fita de DNA. Após o término dos 35 ciclos, as amostras de PCR foram deixadas a 72 ºC por mais 7 min para a finalização

do alongamento de fitas de DNA que pudessem ter ficado incompletas. A temperatura de anelamento escolhida para cada par de iniciadores foi igual à sua T_m – 5 °C.

3.11.2 Eletrofore de DNA em gel de agarose

Para analisar os fragmentos de DNA derivados das amplificações com PCR foram feitas eletroforeses em gel de agarose. Os géis foram preparados na concentração final de 1 % (p/v) de agarose em tampão TAE (Tris-Acetato 8 mM, EDTA 0,4 mM, pH 8,5) e as amostras de DNA eram resolvidas em uma diferença de potencial de 80 – 100 V.

Ao material que foi separado por eletroforese adicionou-se um tampão de amostra (0,1 volumes da amostra) contendo azul de bromofenol. Este último era usado para monitorar a migração da amostra e determinar o encerramento da eletroforese. Após a eletroforese, o DNA era evidenciado utilizando-se brometo de etídio (0,5 µg/mL) e visualizado em transiluminador de luz UV (312 nm). Os fragmentos de DNA foram recuperados diretamente dos géis de agarose usando um protocolo de extração do Kit Gel Extraction Kit (250) (Qiagen), o qual baseia-se na dissolução da agarose em um tampão de alta força iônica e ligação do DNA a uma resina de troca iônica.

3.11.3 Ligação dos fragmentos de DNA a plasmídeos vetores

Para a clonagem de fragmentos de DNA obtidos de amplificações por PCR, utilizamos o Kit de Ligação "pGEM-T Easy Vector System I" (Promega). Foi usada uma mistura de reação que consistia de 1 U de T4 DNA ligase, tampão apropriado, plasmídeo (pGEM-T) e o produto de PCR (purificado do gel de agarose); o plasmídeo e o produto de PCR foram misturados numa proporção de 1:3, e incubados por 16h a 4 °C. Os produtos de ligação foram utilizados para transformar bactérias competentes *E. coli* XL1-Blue MRF'.

3.11.4 Transformação de bactérias por choque térmico e seleção dos clones transformantes

As bactérias da linhagem XL1-blue MRF' de *Escherichia coli* foram transformadas com uma construção que consistia de um produto de PCR ligado ao vetor pGEM-T, como descrito abaixo.

O volume total do meio de reação de ligação dos fragmentos ao plasmídeo vetor era adicionado a 100 µg/mL de células competentes e mantido em gelo por 30 min. Em seguida as células eram submetidas a um choque térmico a 42 °C por 90 segundos e retornavam ao gelo por mais 2 min. Adicionava-se então 0,5 mL de LB-liquído e as células eram mantidas a 37 °C por 1h para a recuperação e expressão do gene de resistência a ampicilina (presente no plasmídeo "pGEM-T Easy Vector" usado na transformação). Em seguida, as células eram plaqueadas em LB-ágar contendo ampicilina (50 µg/mL) e IPTG/Xgal (eram adicionados 40 µl de IPTG 100 mM e de Xgal 50 mg/mL às placas LB-ágar de 100 mm, que eram espalhados com uma alça de Drigalski sobre a superfície da placa) e mantidas a 37 °C durante 16h. As bactérias transformadas com o plasmídeo contendo o inserto cresciam nestas placas originando colônias brancas.

3.11.5 Preparação de plasmídeos a partir de cultura de bactérias

Os plasmídeos foram preparados a partir de 3 mL daquelas culturas de bactérias (*E. coli* XL1-Blue MRF') que apresentaram o inserto desejado. Para a extração dos plasmídeos utilizou-se o protocolo "Wizard Miniprep" (Promega). As bactérias eram precipitadas por centrifugação e ressuspendidas em tampão Tris-HCl 50 mM pH 7,5 contendo EDTA 10 mM e RNAse A 100 µg/mL. Em seguida, realizava-se uma lise alcalina usando uma solução de NaOH 0,2 M e SDS 1 % (p/v) e a solução era neutralizada pela adição de uma solução de acetato de potássio 1,32 M, pH 4,8. Esta mistura era centrifugada (10.000 g; 5 min.; temperatura ambiente) e o sobrenadante aplicado em uma mini-coluna contendo uma resina de troca iônica. A coluna era lavada com tampão acetato 80 mM, EDTA 40 µM e etanol 55 %

(v/v) para a retirada do material contaminante. Finalmente, o plasmídeo era eluído da coluna com água MilliQ. O rendimento e a pureza da amostra de plasmídeo eram avaliados através de determinação da absorbância a 260 nm e 280 nm.

3.11.6 PCR a partir de material obtido de colônias de bactérias

Para que se pudesse fazer uma triagem mais refinada das colônias com bactérias que apresentavam os insertos de interesse, era realizado PCR utilizando DNA das colônias de bactérias como molde. Esse procedimento consistia em um PCR como descrito no ítem 3.11.1, com a diferença que foram utilizados iniciadores que anelavam às regiões do vetor flanqueando o inserto. Ainda, antes do início dos ciclos da reação de PCR, as amostras eram deixadas a 94 °C por 10 min. para a lise das células e exposição dos plasmídeos bacterianos desnaturados. As amostras de DNA molde foram obtidas das colônias do meio sólido. Após o PCR, o tamanho do fragmento de DNA amplificado revelou quais colônias possuíam o inserto desejado.

3.11.7 Reação de sequenciamento de DNA

Apenas as colônias de bactérias que continham os insertos com tamanhos desejados (confirmação por PCR, ítem 3.11.6) foram aproveitadas para as reações de sequenciamento. Para o sequenciamento de DNA foi utilizado o método de interrupção da reação de polimerização do DNA com o uso de didesoxirribonucleotídeos (SANGER *et al*., 1977). As amostras a serem sequenciadas foram entregues ao serviço de sequenciamento do Departamento de Bioquímica do Instituto de Química da Universidade de São Paulo (IQ-USP). A reação de sequenciamento foi realizada usando 500 ng de DNA molde, 1 µL de iniciador na concentração de 3,3 pmol/µL, 2 µL de "Terminator Ready Reaction Mix" (Perkin Elmer), 6 µL de tampão Tris-HCl 200 mM pH 9,0; $MgCl_2$ 5 mM para um volume final de 20 µL. As reações foram realizadas em termociclador em um método de 35 ciclos que consistia de incubações sequenciais de 45 segundos a 96 ºC, 30 segundos a 50 ºC, e 4 min. a 60 °C.

Nessa técnica de sequenciamento automático cada um dos quatro didesoxirribonucleotídeos usados apresentam-se ligados a grupos fluorescentes distintos, o que facilita a detecção dos produtos da reação de sequenciamento no gel de poliacrilamida.

3.11.8 Análise das seqüências obtidas

Os eletroferogramas dos clones sequenciados foram automaticamente processados quanto ao sinal das bases e fragmentos de baixa qualidade usando-se o programa Chromas Lite (www.technelysium.com.au/chromas_lite.html). As sequências obtidas foram analisadas usando o programa BLAST (ALTSCHUL *et al.*, 1990; http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/).

3.12 Obtenção da membrana microssomal

Pretendíamos detectar e quantificar os níveis do biomarcador CYP450 nas amostras de *G. birdiae* após exposição a BaP. A obtenção da membrana celular que contém CYP450 envolve o consumo de grande biomassa fresca de alga, o que dificultou bastante a obtenção dos resultados pretendidos. Os resultados dessa etapa não foram apresentados na dissertação, mas apenas considerações àquilo que foi feito.

CYP450 encontra-se ligado à membrana da fração microssomal (retículo endoplasmático liso). O protocolo de obtenção dessa membrana foi obtido de PFLUGMACHER e SANDERMANN (1998), com adaptações: partiu-se de 50 g de biomassa fresca de *Gracilaria birdiae*; à alga, pré-macerada em N_2 líquido, adicionou-se 70 mL de tampão fosfato de sódio 100 mM, pH 6,5, contendo glicerol 20 % (p/v), DTT 6 mM, ácido ascórbico 8 mM, PVP 0,5 % (p/v; sem pré-hidratação), EDTA 1 mM, PMSF 0,2 mM, e DMSO 0,1 % (v/v). Esse material foi triturado utilizando-se um mixer (Tissue Tearor, Tekmar Ultra-Turrax, 20.000 rpm) por 4 min., permanecendo em solução em um total de 20 min. para o término da extração; o extrato foi submetido a ultra-som, em sonicador de ponteira (Sonifier 250, Branson), num processo composto de 16 ciclos: 8 ciclos de 15

segundos de aplicação de pulso (amplitude de 50 %) alternados com 8 ciclos de descanso, sem aplicação de energia; centrifugação a 10.000 g por 20 min., após a qual coletou-se o sobrenadante; como o corpo de chão dessa 1ª centrifugação ainda permaneceu muito úmido, realizou-se nova centrifugação nas mesmas condições, e esse 2º sobrenadante foi adicionado ao 1º; amberlite XAD-4 10 % (p/v) foi adicionado à solução resultante das centrifugações e procedeu-se com a extração (com agitação) de compostos fenólicos (absorvem energia na mesma faixa de comprimento de ondas que CYP450) por 20 min., seguida de filtração em membrana com porosidade de 3 µm; ajustou-se o pH para 7,0; ultracentrifugação a 100.000 g por 80 min.; o sobrenadante foi descartado e o pellet, contendo a fração microssomal, foi levemente lavado duas vezes com tampão fosfato de sódio 20 mM, pH 7,0, glicerol 20 % (v/v) e DTE 1,4 mM. Em seguida, procedeu-se com a ressuspensão do pellet em tampão fosfato de sódio 100 mM, pH 7,0. Experimento a 4 °C. Ensaiou-se imediatamente.

3.13 Detecção e quantificação de CYP450

Com relação à sua detecção nas amostras biológicas, as isoformas de CYP450 ("P" de pigmento) podem ser definidas por seu espectro de absorção. Dentre os grupos de citocromos, CYP450 são do tipo "b" no que se refere à máxima absorção de comprimento de onda, a qual acontece em 420 nm (pico ou banda Soret), indicando seu estado reduzido. Se ligado a CO, o complexo passa a apresentar máxima absorção em 450 nm. Assim, a observação da transferência da banda Soret para 450 nm, após ligação do CO à proteína reduzida (BERNHARDT, 2006), é o principal critério de identificação do complexo CYP450 (BOLWELL *et al*., 1994; OMURA e SATO, 1964a; b).

Assim sendo, tentou-se determinar o conteúdo de CYP450 pelo método de OMURA e SATO (1964a; b) em espectrofotômetro (Hitachi U-2010, a 25 °C) utilizando a fração microssomal que fora ressuspendida em tampão fosfato 100 mM, pH 7,0 (ítem 3.12). Após a adição de 50 mg de ditionito de sódio ($Na_2S_2O_4$; forte agente redutor) e o borbulhar saturante

de CO por 60 segundos, procurou-se averiguar a presença de um pico de absorção em torno de 450 nm a partir de varredura espectrofotométrica no intervalo 400 a 500 nm. As absortividades molares utilizadas para CYP450 complexado com CO e CYP450 na sua forma oxidada foram, respectivamente, ε_{447} = 1,2 x 10^5 $M^{-1}cm^{-1}$ e ε_{393} = 1,09 x 10^5 $M^{-1}cm^{-1}$ (SHIMIZU *et al*., 1991).

3.14 Eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes

As amostras que foram aplicadas em SDS-PAGE (microssoma contendo CYP450) foram ressuspensas em 20 μl de tampão de amostra: Tris-HCl 60 mM, pH 6,8; SDS 2,5 % (p/v); 2-β-mercaptoetanol 0,36 mM; EDTA 0,5 mM; glicerol 10 % (v/v); azul de bromofenol 0,005 % (p/v). Em seguida, foram mantidas por 4 min. em banho em ebulição.

A eletroforese foi realizada em placa fina de poliacrilamida na presença de SDS utilizando-se o sistema descontínuo de tampões descrito por LAEMMLI (1970). Foi usado gel de separação em concentração de poliacrilamida de 12 % (p/v) e o gel de empilhamento na concentração de 4 %, ambos contendo SDS 0,1 % (p/v). As placas de eletroforese foram submetidas a uma corrente de 0,2 mA/cm^2 (voltagem constante de 200 V) e coradas com prata (BLUM *et al*., 1987).

Valores de massa molecular foram calculados a partir da comparação com proteínas de massa molecular conhecida: fosforilase B (97,4 kDa), albumina sérica bovina (66,2 kDa), ovalbumina (45 kDa), anidrase carbônica (31 kDa), inibidor de tripsina de soja (SBTI, 21,5 kDa), lisozima (14,4 kDa). Para cálculos de massa molecular usou-se a relação linear entre o logarítmo da massa molecular e a migração relativa à linha de frente (R_f) no gel (STRYER *et al.*, 2002).

3.15 Refinamento estatístico

O tratamento estatístico dos dados obtidos durante o desenvolvimento do projeto foi feito pelo uso do teste *t* não pareado, com nível de significância de 5 % ($p < 0,05$). Todos os experimentos foram realizados em 3 repetições ($n = 3$), e a grande maioria dos valores apresentados nas **Figuras** e **Tabelas** da dissertação correspondem à médias dos valores obtidos para as triplicatas; os desvios apresentados representam desvios padrão da média.

4. Resultados

4.1 Obtenção de biomassa algal e cultivo em laboratório

A alga vermelha *Gracilaria birdiae*, organismo modelo deste projeto, foi obtida junto ao grupo de pesquisa da Prof. Dra. Eliane Marinho Soriano da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN), Centro de Biociências, Departamento de Oceanografia e Limnologia. A 1ª coleta foi realizada em 03/2007, na Praia do Cotovelo (5º 54' S e 35º 15' O), município de Parnamirim, RN. A necessidade de obtenção de mais biomassa fez com que uma 2ª coleta fosse realizada, desta vez na Praia de Rio do Fogo (5º 16' S e 35º 22' O), município de Rio do Fogo, RN. O material foi coletado em 08/2008 e totalmente utilizado para realização de experimentos de ultra-centrifugação para obtenção de membrana microssomal, como descrito nos ítens 3.12 e 3.13.

Exemplares da biomassa de *G. birdiae* coletada da Praia do Cotovelo (RN) está depositada no herbário do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo (IB-USP), disponível como referência e base de estudos pública. Seu registro de inclusão no herbário é SPF 56545.

As algas foram aclimatadas às condições de laboratório descritas em 3.1. As culturas foram mantidas em dois laboratórios distintos: 1) Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular de Algas Marinhas (IQ-USP); 2) Laboratório de Algas Marinhas (IB-USP). As culturas de *G. birdiae* foram estabelecidas com sucesso em laboratório, o que pode ser observado na **Figura 8**.

Figura 8. Assim que foram trazidas da natureza, as algas foram condicionadas a aclimatação em laboratório. Na tentativa de mimetizar as condições de vida das algas, estas foram colocadas em incubadoras (fotos **a**,**b** e **c**; local: IQ-USP) e em salas climatizadas (fotos **d** e **e**; local: IB-USP), as quais procuram reproduzir as condições de fotoperíodo, intensidade luminosa, temperatura e aeração encontradas em campo.

4.2 Toxicidade de BaP sobre o crescimento de *G. birdiae* e a determinação da IC_{50}

Com o intuito de obtenção de uma curva dose-resposta formada por vários dados relacionando TC e concentrações crescentes de BaP, alguns experimentos foram realizados. Primeiramente, desejava-se expor a alga a um período agudo de contato com o poluente de 96h. Porém, como a TC mais expressiva apresentada por *G. birdiae* esteve em torno de 1,05 % em peso fresco por dia (TC obtida a partir da fórmula apresentada por LIGNELL e PEDERSEN, 1989), a abordagem aguda revelou-se impraticável uma vez que a sensibilidade da balança analítica (incerteza da ordem de 0,1 mg) não permitiu a observação de diferenças de peso da alga dia após dia para um intervalo de tempo curto como o de 96h.

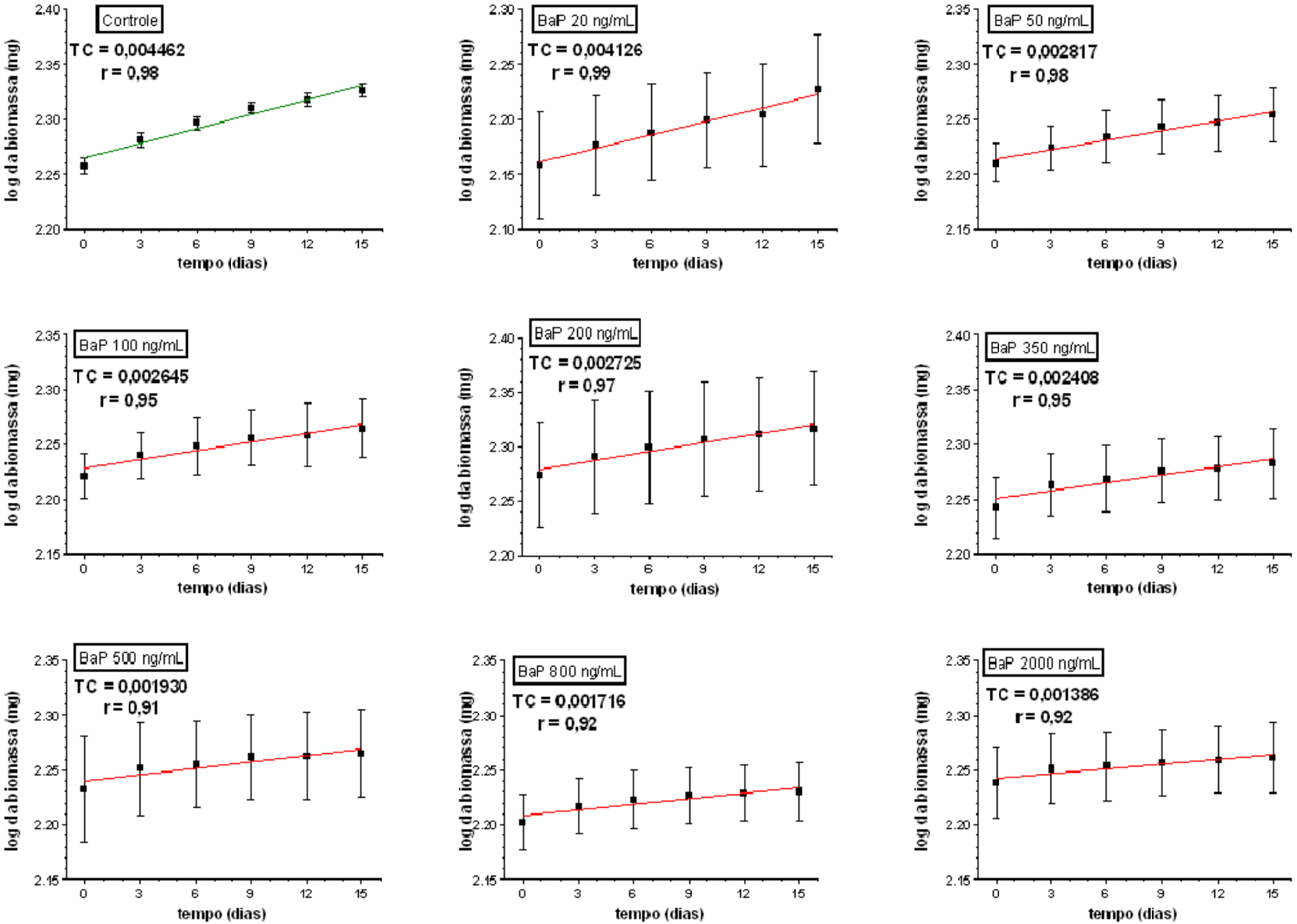
A partir daí, escolheu-se como tempo de exposição o período crônico de 15 dias, com coletas de valores de biomassa de 3 em 3 dias. Num primeiro momento, o experimento realizado utilizou-se das seguintes concentrações de BaP: 0,2; 2; 20; 500; e 5000 ng/mL.

A análise dos dados deste experimento permitiu a obtenção de uma curva dose-resposta preliminar e de algumas informações valiosas, tais como: as concentrações de 0,2, 2 e 20 ng/mL de BaP não exerceram nenhuma influência negativa sobre as TC da alga. A concentração de 500 ng/mL de BaP diminuiu significativamente a TC algal (em 80,2 %), e a concentração maior, de 5000 ng/mL de BaP, provocou crescimento nulo (e até negativo para algumas réplicas) e despigmentação das algas. Também foi possível obter um valor preliminar da concentração de BaP que inibe o crescimento da alga em 50 % (IC_{50}) em 375 ng/mL.

Com o objetivo de obter uma curva definitiva, a alga foi exposta a 9 concentrações crescentes do poluente, as quais abrangeram um intervalo de concentrações de BaP que foi de 0 a 2000 ng/mL. As concentrações de exposição ao HPA foram: 0; 20; 50; 100; 200; 350; 500; 800; e 2000 ng/mL. As TC obtidas a partir destas diferentes concentrações do HPA estão bem representadas na **Figura 9** e no histograma da **Figura 10**.

Na parte de baixo da **Figura 10** é mostrada a curva de inibição do crescimento da alga. O topo da curva é representado pela taxa ótima (100 %) de crescimento diária, isto é, aquela apresentada pelas algas controle, que não foram expostas a BaP. Conforme as concentrações do HPA vão aumentando, as TC de *G. birdiae* vão diminuindo, até atingir a base da curva, onde o crescimento da alga cessa. A curva dose-resposta (r = 0,9) permitiu a determinação da IC_{50} definitiva, com valor de 69 ng/mL (assinalado na **Fig. 10** pelo cruzamento das linhas pontilhadas e pelo círculo vermelho).

Figura 9. Taxas de crescimento (TC) apresentadas por *G. birdiae* em 9 diferentes concentrações de exposição ao poluente, considerando-se um período de 15 dias. Essas TC permitiram construir uma curva (com perfil dose-resposta) de inibição do crescimento da alga em função de concentrações crescentes do HPA (**Fig. 10**). Em cada um dos gráficos apresentados é possível encontrar a concentração de BaP utilizada, a TC e a correlação linear (r) apresentada pelos dados.



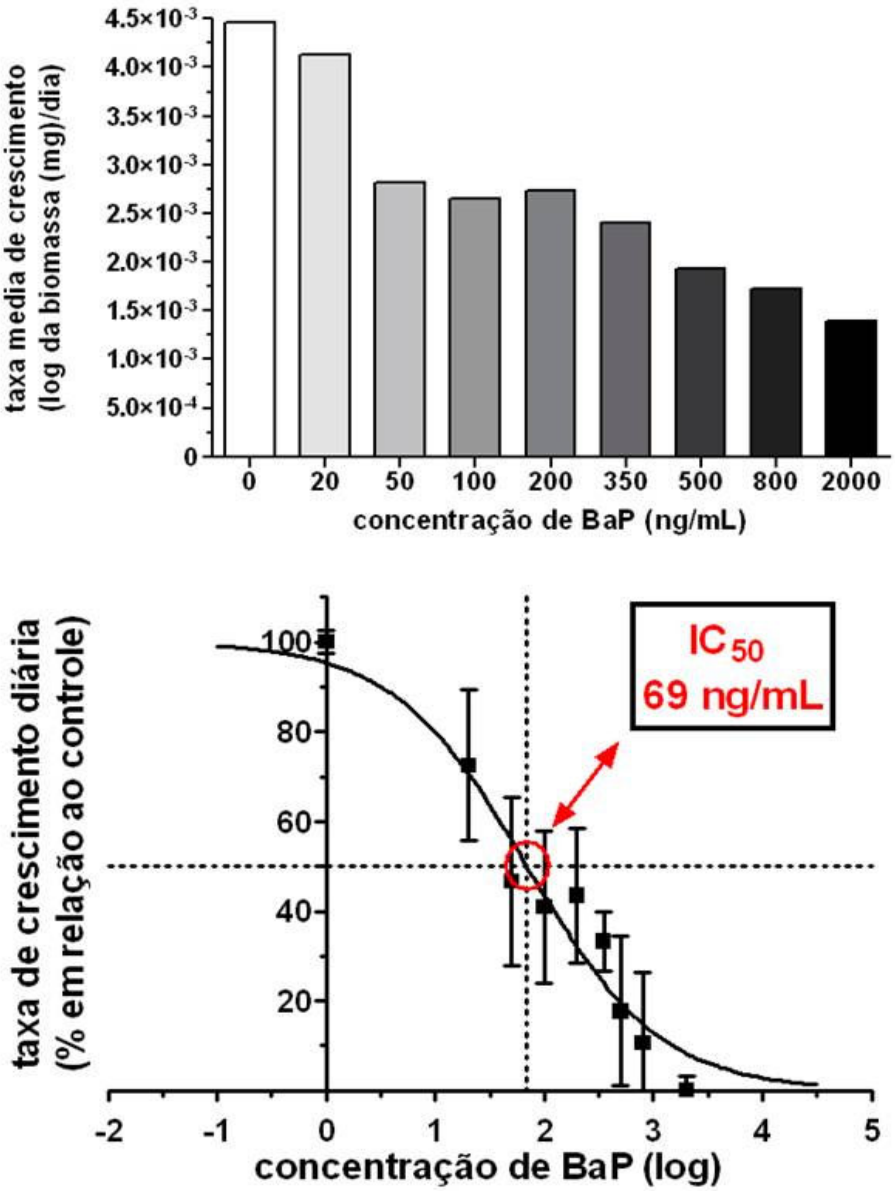


Figura 10. Efeito inibitório exercido por BaP sobre o crescimento da alga. Conforme adicionou-se mais BaP aos meios de cultura de *G. birdiae*, menores foram as TC médias apresentadas pelo organismo. O crescimento da alga foi monitorado por 15 dias; as TC apresentadas relacionam valores logaritmizados de biomassa (mg) por dia. Abaixo, é apresentada a curva de inibição do crescimento de *G. birdiae* frente a concentrações crescentes de BaP. A curva, que apresenta perfil dose-resposta, fora construída a partir da normalização dos valores de TC apresentados na **Figura 9**.

Como a abordagem crônica foi assumida, realizou-se o monitoramento do pH dos meios de cultura das algas com o intuito de averiguar se as variações biológicas observadas

poderiam estar relacionadas à variações de pH nos meios. A **Tabela 3** apresenta os dados de pH coletados, os quais não variaram no período observado.

Tabela 3. Dados de pH dos meios das algas considerando período crônico de 15 dias de análise. Não foram observadas alterações de pH. Meio algal como fora descrito em 3.3 (último parágrafo).

pH												
amostras	**Tempo (dias)**											
	zero	**1º**	**2º**	**3º**	**4º**	**7º**	**8º**	**9º**	**10º**	**11º**	**14º**	**15º**
Controle (*n* = 3)	7,9 ± 0,1	7,9 ± 0,1	7,7 ± 0,2	7,8 ± 0,1	7,8 ± 0,1	7,9 ± 0,1	8,0	8,0 ± 0,1	8,1 ± 0,1	8,1 ± 0,1	8,3 ± 0,2	8,1 ± 0,2
69 ng/mL de BaP (*n* = 3)	8,0 ± 0,1	8,0 ± 0,1	7,6 ± 0,1	7,6 ± 0,2	7,6 ± 0,1	7,8 ± 0,1	7,9 ± 0,1	7,9 ± 0,1	8,0	8,0	8,3 ± 0,2	8,2 ± 0,1

4.3 Defesas Antioxidantes

As quantificações do antioxidante de baixo peso molecular GSH e do dímero GSSG, assim como a determinação da atividade da enzima antioxidante SOD puderam ser bastante informativas no que se refere à toxicidade do HPA investigado.

4.3.1 Glutationa

Num primeiro momento, as algas foram expostas a 100 ng/mL de BaP por 96h (exposição aguda). A quantificação dessas amostras, em sistema HPLC/MS/MS, permitiu observar que algas tratadas com BaP apresentaram queda dos níveis de GSH e aumento dos níveis de GSSG quando comparadas aos controles (**Fig. 11**), sugerindo ocorrência de desbalanço oxidativo durante a exposição. Os valores do IR obtidos para amostras controle e para amostras expostas ao poluente foram, respectivamente, 83,9 e 71,4 %. A escolha de uma exposição com as características citadas acima ocorreu porque 100 ng/mL de BaP é uma concentração relativamente próxima à solubilidade do poluente em água do mar e também

porque desejava-se elucidar o que acontecia com glutationa considerando-se um período de exposição agudo de 96h, como aconteceu com a coleta dos valores de biomassa.

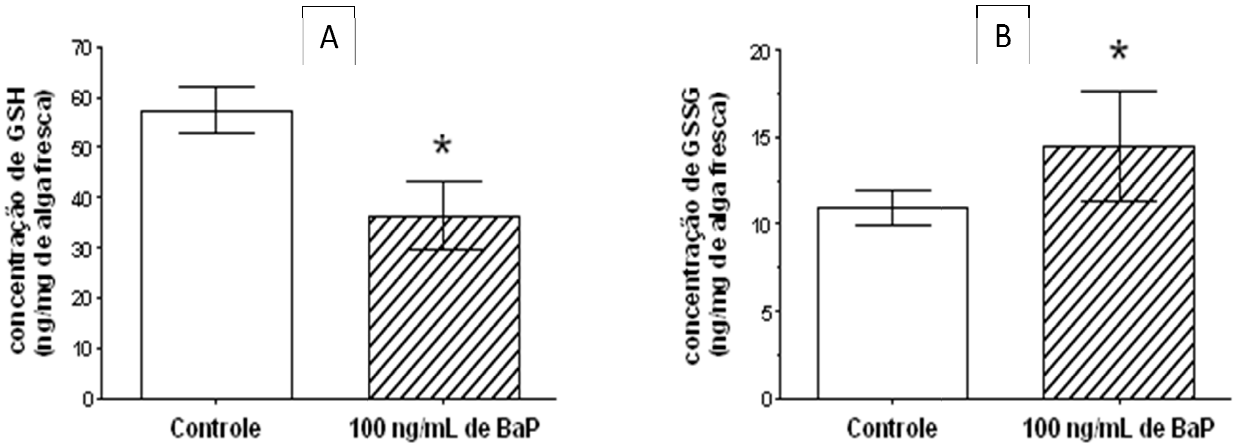


Figura 11. Níveis de GSH (A na Figura) e GSSG (B). As análises referem-se à exposição de 96h a 100 ng/mL de BaP. As barras listradas representam os indivíduos expostos ao poluente, enquanto as barras brancas representam os controles. Médias e desvios-padrão obtidos de triplicatas. *: diferenças significativas.

A quantificação seguinte foi feita com amostras de *G. birdiae* expostas a 375 ng/mL de BaP por 15 dias, valor da IC_{50} preliminar. O desbalanço oxidativo foi verificado mais uma vez. Após os 15 dias, os indivíduos expostos a BaP apresentaram níveis reduzidos de GSH e também de GSSG quando comparados aos indivíduos controle (**Fig. 12**). Os valores do IR obtidos para amostras controle e para amostras expostas ao poluente foram, respectivamente, 79,2 e 90,7 %.

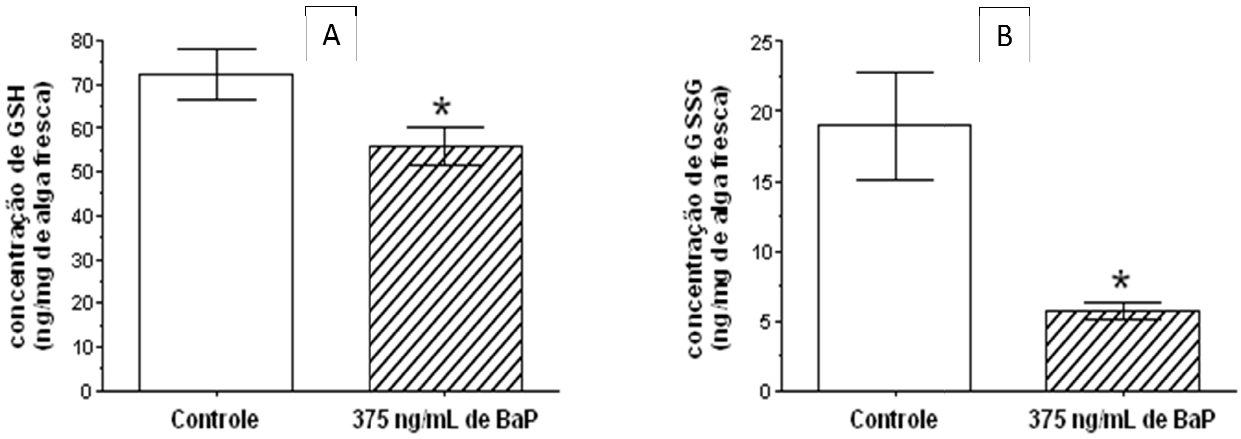


Figura 12. Níveis de GSH (A na Figura) e GSSG (B). As análises, estimadas por LC-MS, foram realizadas após exposição crônica de 15 dias a 375 ng/mL de BaP. Estas condições de exposição correspondem à IC_{50} preliminar. Os indivíduos expostos ao poluente (barras listradas) apresentaram menos GSH e GSSG do que os controles (barras brancas). Médias e desvios-padrão obtidos de triplicatas. *: diferenças significativas.

A 3ª condição de exposição a BaP na qual quantificou-se GSH e GSSG está apresentada na **Figura 13**. Também referente a período de exposição crônico de 15 dias, porém desta vez a 69 ng/mL de BaP (IC_{50} definitiva; será chamada apenas de IC_{50} daqui em diante), mostra resultados com tendências semelhantes aos observados na **Figura 12**. Após exposição à IC_{50}, foi possível perceber que a alga sofre desbalanço oxidativo: algas expostas ao HPA, representadas por barras listradas na **Figura 13**, apresentaram menos GSH e menos GSSG do que as algas controle. Os valores do IR obtidos para amostras controle e para amostras expostas ao poluente foram, respectivamente, 82,1 e 86,4 %.

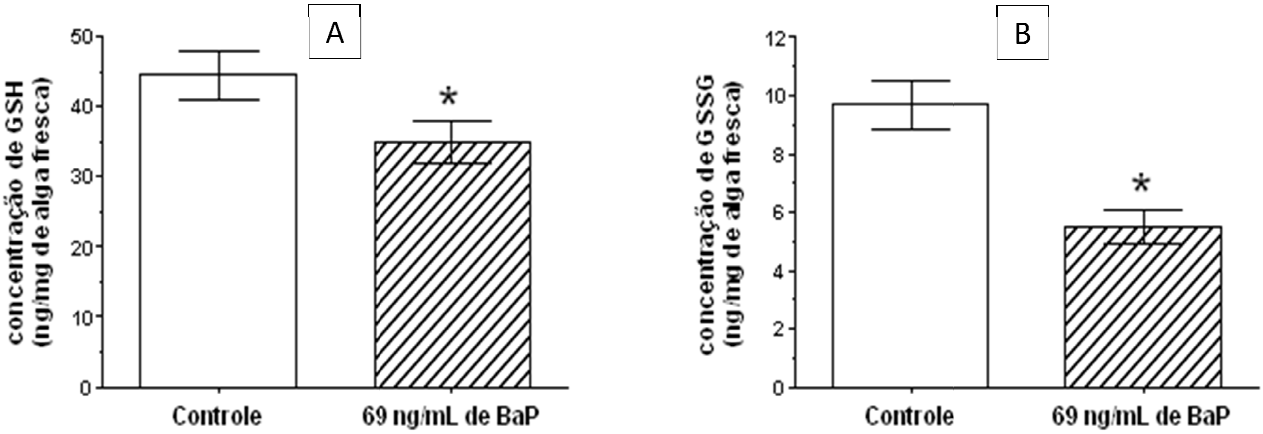


Figura 13. Níveis de GSH (A na Figura) e GSSG (B). As análises, estimadas por LC-MS, foram realizadas após exposição crônica de 15 dias à IC_{50} (69 ng/mL de BaP). Estas condições de exposição correspondem à IC_{50} definitiva. Os indivíduos expostos ao poluente (barras listradas) apresentaram menos GSH e GSSG do que os controles (barras brancas). Médias e desvios-padrão obtidos de triplicatas. *: diferenças significativas.

A 4ª e última quantificação de GSH e de GSSG realizada refere-se a período de exposição agudo de 24h, utilizando-se a concentração de BaP de 69 ng/mL obtida da curva de inibição do crescimento. A idéia era verificar se a alga respondia à presença do poluente num período curto de tempo (24h) e em concentração de BaP que afetou seu crescimento num período longo de 15 dias. Ainda, no mesmo experimento, aproveitou-se para quantificar GSH e GSSG de amostras de algas do cultivo estoque de *G. birdiae*, algas estas que não receberam adição de MeOH 1 % (v/v) como as amostras controle. Com isso, pretendia-se saber se as amostras controle apresentavam o mesmo comportamento bioquímico de amostras do estoque, que são aquelas com comportamento mais aproximado aos das algas de campo. Os resultados de quantificação dos biomarcadores podem ser observados na **Figura 14**. As diferenças surgem apenas quando comparamos amostras algais estoque e controle com as amostras expostas ao poluente, que mais uma vez apresentaram níveis diminuídos de GSH e de GSSG, corroborando as tendências observadas para as duas exposições crônicas de 15 dias. Os valores do IR obtidos para amostras do estoque, controle e expostas ao poluente foram, respectivamente, 77,4, 78,2 e 81,3 %.

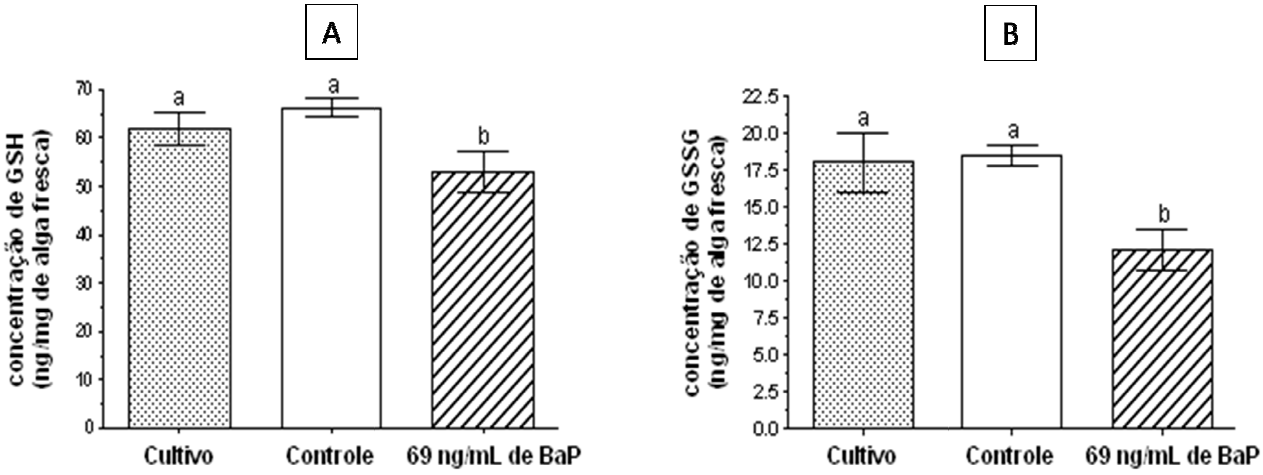


Figura 14. Níveis de GSH (A na Figura) e GSSG (B). As análises, estimadas por LC-MS, foram realizadas após exposição aguda de 24h a 69 ng/mL de BaP. Os indivíduos expostos ao poluente (barras listradas) apresentaram menos GSH e GSSG do que os controles (barras brancas). As quantificaçõs das glutationas de indivíduos de *G. birdiae* mantidos no cultivo principal do laboratório, isto é, do estoque de algas, estão representadas pelas barras pontilhadas. Médias e desvios-padrão obtidos de triplicatas. As letras distintas indicam diferenças significativas.

Amostras controle, que ficaram em experimentação em 3 tempos diferentes de exposição (24h, 96h e 15 dias), apresentaram uma variação da concentração de GSH ao final destas exposições que foi de, aproximadamente, 45 a 72,5 ng/mg de alga fresca, enquanto que a variação de GSSG ficou, aproximadamente, entre 10 e 18 ng/mg. Já para as amostras expostas a diferentes concentrações de BaP (69, 100 e 375 ng/mL) e também a 3 tempos diferentes de exposição (24h, 96h e 15 dias), o intervalo de concentrações de GSH ficou, aproximadamente, entre 35 e 55 ng/mg de alga fresca, enquanto que a variação de GSSG ficou, aproximadamente, entre 5 e 15 ng/mg.

A única situação na qual foi possível observar um aumento significativo na concentração das moléculas analisadas nas amostras expostas ao poluente foi após a exposição a 100 ng/mL de BaP por 96h, na qual as amostras expostas a BaP apresentaram

mais GSSG. Nas demais situações, as amostras controle apresentaram sempre maiores concentrações.

A **Tabela 4** mostra um resumo de todos os valores de IR obtidos. Apesar das particularidades de cada situação de exposição, as variações de IR não foram grandes.

Tabela 4. Com o intuito de se ter uma percepção da porcentagem de moléculas de glutationa que permaneceram no estado reduzido após as exposições que a alga sofreu ao poluente, determinou-se o IR médio de amostras controle e de amostras expostas a BaP em cada uma das situações apresentadas na tabela. O IR é esclarecedor na medida em que revela, em %, qual a capacidade antioxidante dependente de GSH que o organismo possui.

Tratamento	**IR (%)**	
	Controles: apenas MeOH 1 % (v/v)	**Exposição a BaP: MeOH 1 % (v/v) + BaP**
Cultivo (sem MeOH nem BaP)	77,4	
69 ng/mL de BaP – 24h	78,2	81,3
100 ng/mL de BaP – 96h	83,9	71,4
69 ng/mL de BaP – 15 dias	82,1	86,4
375 ng/mL de BaP – 15 dias	79,2	90,7

4.3.2 SOD

SOD, importante enzima antioxidante que remove ânion radical superóxido, teve sua atividade enzimática determinada em 3 situações distintas: IC_{50}; exposição aguda de 24h a 69 ng/mL de BaP; e 96h de exposição a 10 µg/mL de BaP seguidos de mais 72h de exposição a 20 µg/mL de BaP.

Com relação à esta última (ainda não havia sido apresentada em Resultados), faz-se necessário entender o porque de sua utilização. A atividade de SOD estava se apresentando como um biomarcador bioquímico de exposição a BaP pouco sensível, e assim, procurou-se expor a alga a uma condição que pudesse provocar a ela um dano evidente, como sua despigmentação. Por observações anteriores, sabia-se que concentrações de BaP $\geq$ 5 µg/mL eram capazes de produzir este efeito, e a idéia era tentar entender se SOD desempenhava algum papel diferenciado durante estas situações.

Após a exposição à IC_{50} e após a exposição aguda de 24h a 69 ng/mL de BaP, não puderam ser observadas diferenças de atividade de SOD entre amostras controle e amostras expostas ao poluente, sugerindo a manutenção da homeostase de ânion radical superóxido mesmo após estas situações. Porém, após 7 dias de exposição a altas concentrações de BaP (10 µg/mL de BaP por 4 dias + 20 µg/mL de BaP por mais 3 dias), foi possível detectar uma tendência (estatisticamente não significativa) de diminuição da atividade de SOD nas amostras expostas a BaP. A **Figura 15** mostra estes resultados em histogramas. A despigmentação das algas expostas a este tratamento de BaP pode ser vista na **Figura 20**, inserida no ítem 4.4.

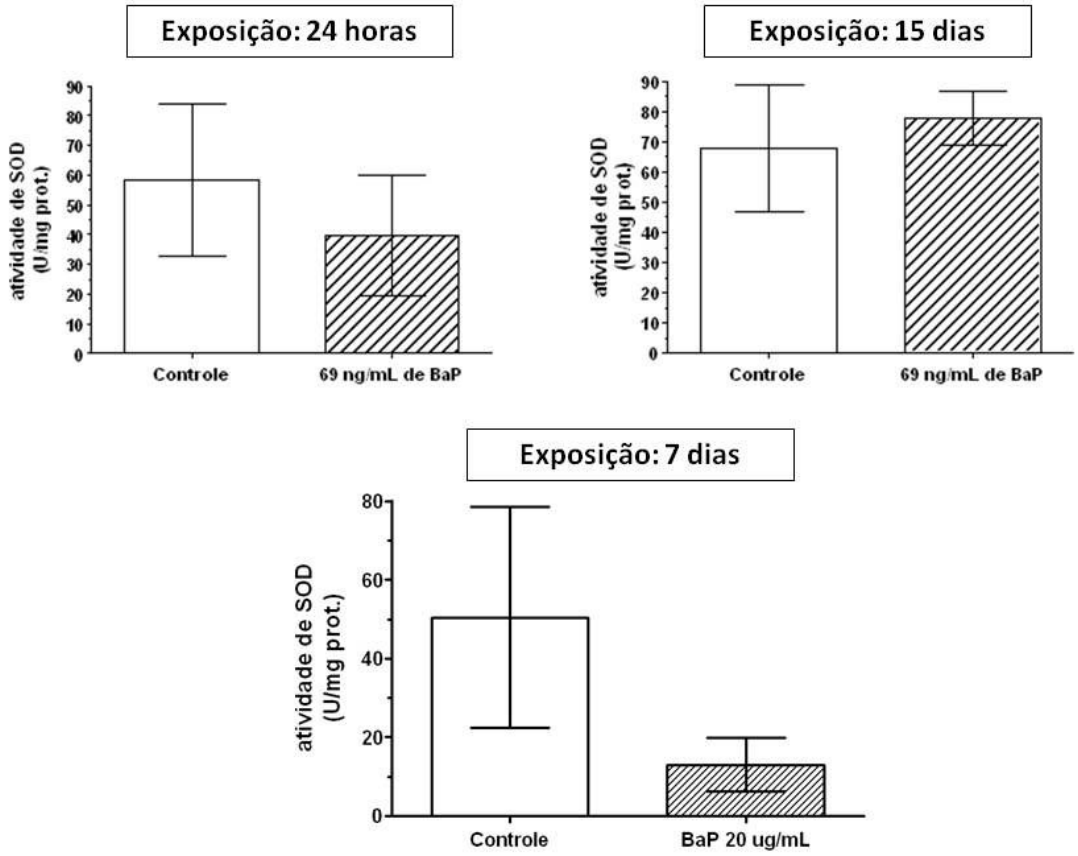


Figura 15. A atividade de SOD foi mensurada em diferentes condições de exposição da alga ao poluente: após exposição aguda de 24h a 69 ng/mL de BaP; após exposição à IC_{50}; e após 7 dias de exposição a altas concentrações de BaP (10 µg/mL de BaP por 4 dias + 20 µg/mL de BaP por mais 3 dias). Acima dos histogramas estão designados os tempos de duração de cada condição de exposição. Determinação da atividade de SOD por espectrofotometria.

Amostras controle, que ficaram em experimentação em 3 tempos diferentes de exposição (24h, 7 dias e 15 dias), apresentaram uma variação dos valores de atividade de SOD ao final destas exposições que foi de, aproximadamente, 50 a 70 U/mg de proteína, enquanto que a variação das algas expostas a diferentes concentrações de BaP (69 ng/mL e 20 µg/mL) e também a 3 tempos diferentes de exposição (24h, 7 dias e 15 dias) ficou, aproximadamente, entre 10 e 80 U/mg de proteína.

4.4 Toxicidade de BaP sobre a fotossíntese de *G. birdiae*

Outro biomarcador que foi explorado durante a execução deste projeto foi a fotossíntese da alga. Para tal, foram obtidas curvas PI (que relacionam fotossíntese com intensidades luminosas crescentes) da alga em diferentes situações de exposição ao hidrocarboneto: 375 ng/mL de BaP por 15 dias; IC_{50}; 69 ng/mL de BaP por 24h; e altas concentrações de BaP (10 µg/mL de BaP por 4 dias + 20 µg/mL de BaP por mais 3 dias) por 7 dias. Com exceção da exposição a 375 ng/mL de BaP, em todas as outras situações as curvas PI foram obtidas tanto em tempo zero quanto ao final dos períodos de exposição. As curvas em tempo zero foram obtidas com o intuito de garantir que as réplicas do início dos experimentos realmente possuíam valor biológico de réplica.

Importante salientar que antes de se iniciarem as tomadas de dados de fotossíntese de *G. birdiae*, foi necessário o desenvolvimento de um adaptador que permitisse acoplar a alga ao fluorímetro de maneira padronizada, colaborando com uma tomada confiável de dados biológicos. A **Figura 16** mostra o adaptador.

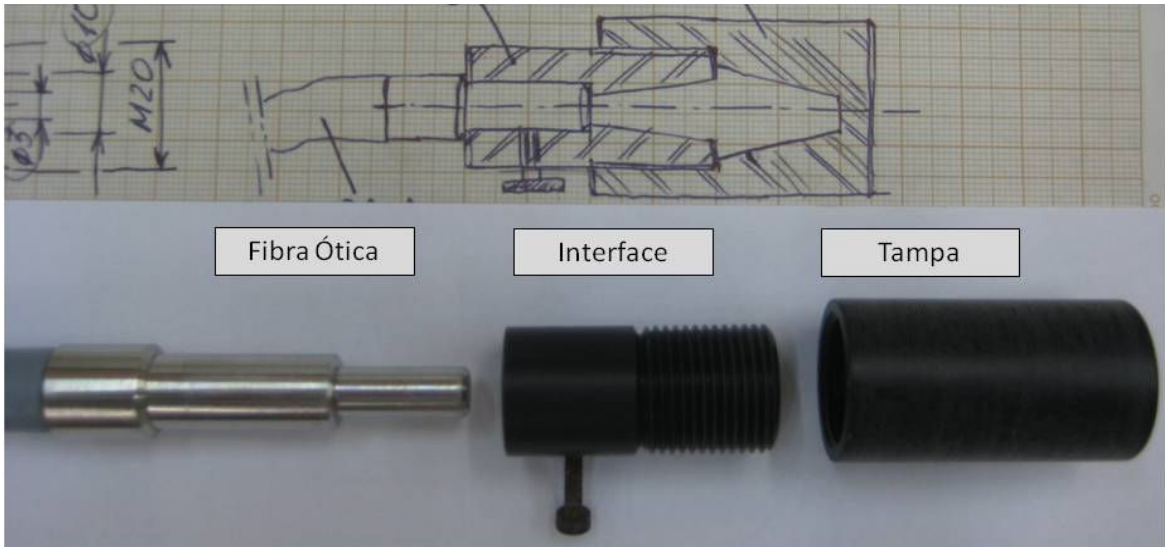


Figura 16. A Figura mostra o adaptador desenvolvido para que as leituras de fotossíntese de *G. birdiae* se fizessem possíveis. É constituído de duas peças: uma tampa e uma interface. O cabo de fibra ótica do fluorímetro se encaixa à extremidade lisa da interface, enquanto a tampa à extremidade rosqueável. Tanto a luz visível que excita a fotossíntese das algas (emitida pelo equipamento) quanto a luz re-emitida pela fluorescência das clorofilas da alga caminham pelo cabo de fibra ótica. É fundamental que as condições de iluminação que antecedem e que acompanham as leituras de fotossíntese não variem. Nesse sentido, o adaptador, como um compartimento fechado, atende às exigências de uso do equipamento.

A 1ª tomada de dados envolvendo a fotossíntese da alga foi feita ao término da exposição a 375 ng/mL de BaP por 15 dias (IC_{50} preliminar). A **Figura 17** apresenta a curva PI obtida. Esta situação de exposição a BaP não provocou alterações no desempenho fotossintético da macroalga, o que pode ser inferido pela obtenção de curvas PI com perfis muito semelhantes tanto para algas controle quanto para algas expostas ao HPA. Também pode-se perceber que a P_{max} de *G. birdiae* apresentaria valores em torno de 10 µmol de elétrons.m^{-2}.s^{-1}.

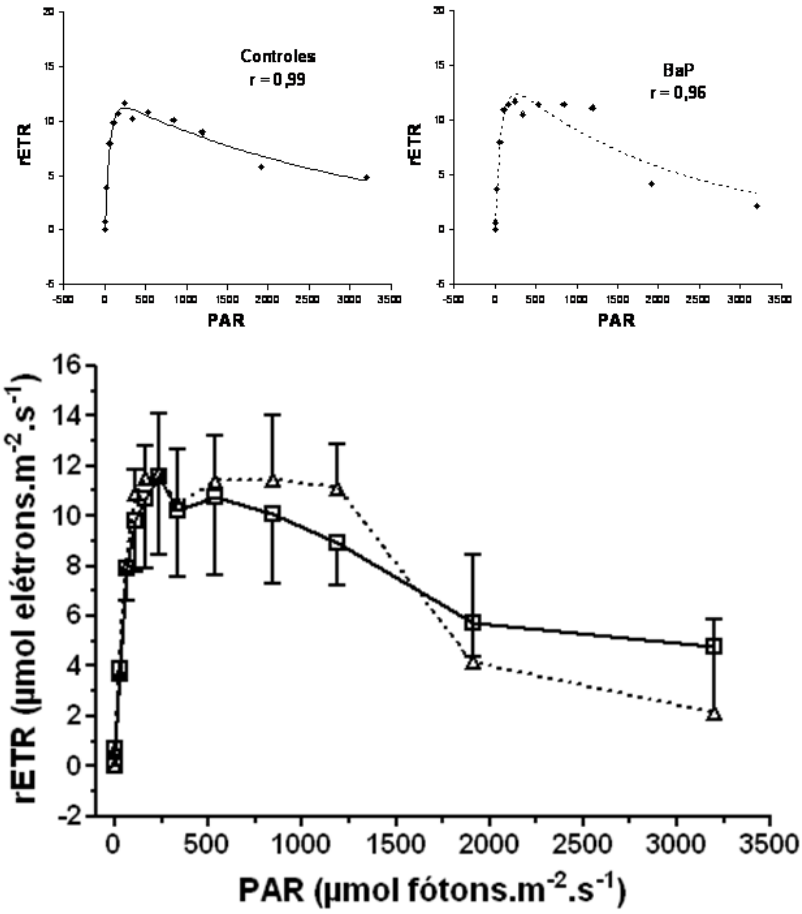


Figura 17. Curvas de fotossíntese-irradiância (PI) obtidas após experimento com duração de 15 dias. A curva PI contínua representa a fotossíntese dos controles; a curva PI pontilhada representa a fotossíntese de algas expostas a 375 ng/mL de BaP. O comportamento fotossintético da alga nas condições apresentadas foi muito semelhante. No detalhe, acima da figura principal, estão as curvas PI média de algas controle (à esquerda) e algas expostas a BaP (à direita), obtidas a partir da equação de PLATT *et al*. (1980) (regressão não linear). rETR: taxa de transporte de elétrons relativa (fotossíntese relativa); PAR: radiação fotossinteticamente ativa.

Em seguida, pretendeu-se saber se a exposição à IC_{50}, condição de grande interesse desta tese, era capaz de provocar alguma alteração sobre a fotossíntese da alga. A **Figura 18** mostra as curvas PI referentes a esta condição de exposição. Nestas condições de exposição, BaP também não foi capaz de provocar alterações fotossintéticas à alga, o que pode ser numericamente observado nas **Tabelas 5** e **6**, nas quais estão mostrados os valores obtidos para as variáveis fotossintéticas em tempo zero e após 15 dias, respectivamente.

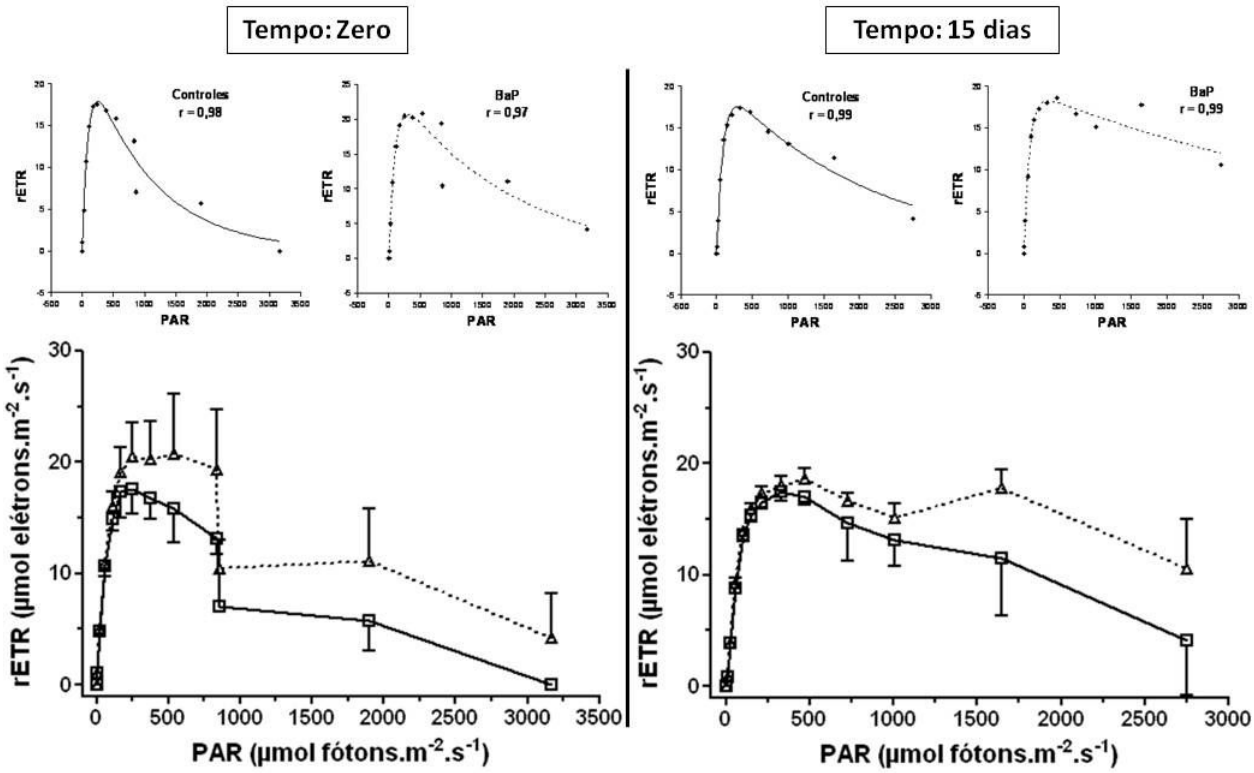


Figura 18. Curvas PI obtidas no início da exposição à IC_{50} (à esquerda), e ao seu final, após 15 dias (à direita). Curvas com traços contínuos representam a fotossíntese dos controles enquanto curvas com traços pontilhados representam as algas expostas a BaP. O comportamento fotossintético de todas as réplicas nas condições apresentadas foi muito semelhante. No detalhe, acima das figuras principais, estão as curvas PI média de algas controle e algas expostas a BaP. rETR: taxa de transporte de elétrons relativa (fotossíntese relativa); PAR: radiação fotossinteticamente ativa.

Tabela 5. Parâmetros fotossintéticos derivados das curvas PI da **Figura 18** (tempo: zero). Os dados da tabela representam amostras controle e amostras expostas ao poluente. Os valores foram obtidos por meio do uso da equação de PLATT *et al*. (1980). As variáveis não oscilaram diante das condições de exposição apresentadas. Letras distintas indicam diferenças significativas. Na tabela, entre parêntesis, estão colocadas as unidades de dimensão das variáveis.

Parâmetros Fotossintéticos	**Tratamento**	
	Controle	**69 ng/mL de BaP**
P_{max} (rETR)	17,825 ± 2,182 (a)	20,741 ± 3,227 (a)
RQE	0,605 ± 0,032 (a)	0,614 ± 0,023 (a)
I_k (µmol $m^{-2}.s^{-1}$)	72,757 ± 3,464 (a)	85,010 ± 12,254 (a)
α (rETR)	0,245 ± 0,02 (a)	0,244 ± 0,012 (a)
β (rETR)	0,018 ± 0,01 (a)	0,016 ± 0,008 (a)

Tabela 6. Parâmetros fotossintéticos derivados das curvas PI da **Figura 18** (tempo: 15 dias). Os dados da tabela representam amostras controle e amostras expostas ao poluente após 15 dias do início da exposição à IC_{50}. Os valores foram obtidos por meio do uso da equação de PLATT *et al*. (1980). As variáveis não oscilaram diante das condições de exposição apresentadas. Letras distintas indicam diferenças significativas.

Parâmetros Fotossintéticos	**Tratamento**	
	Controle	**69 ng/mL de BaP**
P_{max} (rETR)	17,600 ± 1,107 (a)	18,264 ± 0,737 (a)
RQE	0,597 ± 0,002 (a)	0,600 ± 0,013 (a)
I_k (µmol $m^{-2}.s^{-1}$)	79,249 ± 10,161 (a)	75,305 ± 4,159 (a)
α (rETR)	0,224 ± 0,019 (a)	0,243 ± 0,008 (a)
β (rETR)	0,011 ± 0,006 (a)	0,004 ± 0,003 (a)

A 3ª análise fotossintética realizada refere-se à exposição de 24h a 69 ng/mL de BaP. A **Figura 19** e as **Tabelas 7** (tempo zero) e **8** (tempo 24h) referem-se à esta exposição. Nas condições apresentadas, novamente a fotossíntese da alga não foi sensível ao HPA.

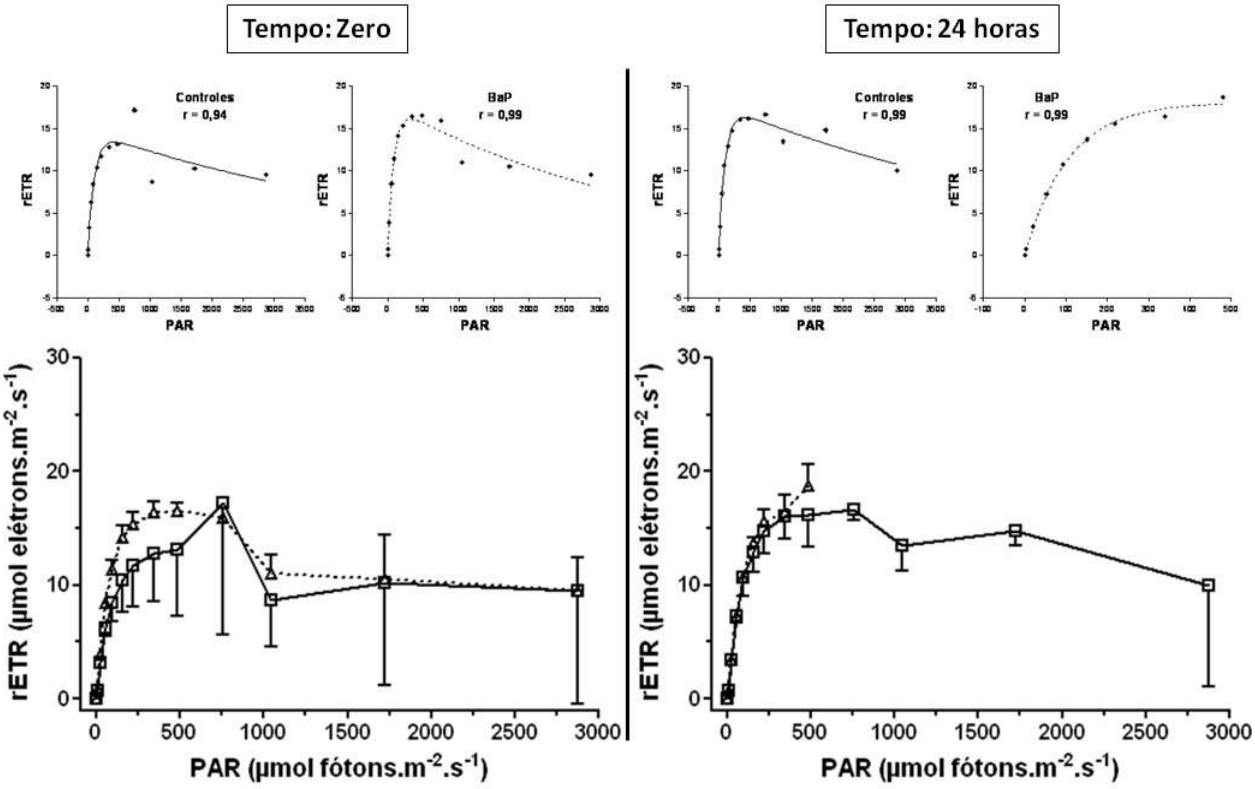


Figura 19. Curvas PI obtidas no tempo zero da exposição a 69 ng/mL de BaP (à esquerda), e ao seu final, após 24h (à direita). Curvas com traços contínuos representam a fotossíntese dos controles enquanto curvas com traços pontilhados representam as algas expostas a BaP. O comportamento fotossintético de todas as réplicas nas condições apresentadas foi muito semelhante. No detalhe, acima das figuras principais, estão as curvas PI média de algas controle e de algas expostas a BaP. rETR: taxa de transporte de elétrons relativa (fotossíntese relativa); PAR: radiação fotossinteticamente ativa.

Tabela 7. Parâmetros fotossintéticos derivados das curvas PI da **Figura 19** (tempo: zero). Os dados da tabela representam amostras controle e amostras expostas ao poluente no início da exposição de 24h a 69 ng/mL de BaP. Os valores foram obtidos por meio do uso da equação de PLATT *et al*. (1980). As variáveis não oscilaram diante das condições de exposição apresentadas. Letras distintas indicam diferenças significativas.

Parâmetros Fotossintéticos	**Tratamento**	
	Controle	**69 ng/mL de BaP**
P_{max} (rETR)	14,011 ± 6,659 (a)	16,126 ± 0,654 (a)
RQE	0,528 ± 0,030 (a)	0,602 ± 0,012 (a)
I_k (µmol $m^{-2}.s^{-1}$)	104,997 ± 57,459 (a)	77,607 ± 3,064 (a)
α (rETR)	0,144 ± 0,035 (a)	0,208 ± 0,016 (a)
β (rETR)	0,006 ± 0,010 (a)	0,005 ± 0,003 (a)

Tabela 8. Parâmetros fotossintéticos derivados das curvas PI da **Figura 19** (tempo: 24 horas). Os dados da tabela representam amostras controle e amostras expostas ao poluente após 24h de exposição a 69 ng/mL de BaP. Os valores foram obtidos por meio do uso da equação de PLATT *et al*. (1980). As variáveis não oscilaram diante das condições de exposição apresentadas. Letras distintas indicam diferenças significativas. A triplicata exposta a BaP não apresentou fotoinibição; por isso não foram obtidos valores para a variável β.

Parâmetros Fotossintéticos	**Tratamento**	
	Controle	**69 ng/mL de BaP**
P_{max} (rETR)	16,709 ± 2,312 (a)	18,119 ± 2,022 (a)
RQE	0,548 ± 0,009 (a)	0,570 ± 0,017 (a)
I_k (µmol $m^{-2}.s^{-1}$)	100,880 ± 4,881 (a)	105,771 ± 19,691 (a)
α (rETR)	0,165 ± 0,015 (a)	0,173 ± 0,015 (a)
β (rETR)	0,007 ± 0,006 (a)	---- ± ---- (a)

Assim como o que pode ser observado para as atividades de SOD, a fotossíntese da alga só oscilou diante do poluente quando as algas foram expostas a concentrações de BaP de µg/mL. Até se fazia possível prever esta situação: em altas concentrações de BaP a alga sofre despigmentação (**Fig. 20**). As **Figuras 21** e **22** mostram as curvas PI das macroalgas em tempo zero, após 4 dias (a 10 µg/mL de BaP) e após 7 dias (4 dias a 10 µg/mL de BaP + 3 dias a 20 µg/mL de BaP) de exposição. O comportamento fotossintético da alga em tempo zero e em 4 dias foi muito semelhante, porém, com o aumento da concentração de BaP para 20 µg/mL e a permanência nessas novas condições de exposição por mais 3 dias fizeram com que a alga sentisse a toxicidade do poluente. Essa situação pode ser corroborada a partir da análise dos valores das variáveis fotossintéticas que estão apresentados nas **Tabelas 9**, **10** e **11**, que, respectivamente, dizem respeito aos tempos zero, 4 dias e 7 dias de exposição.

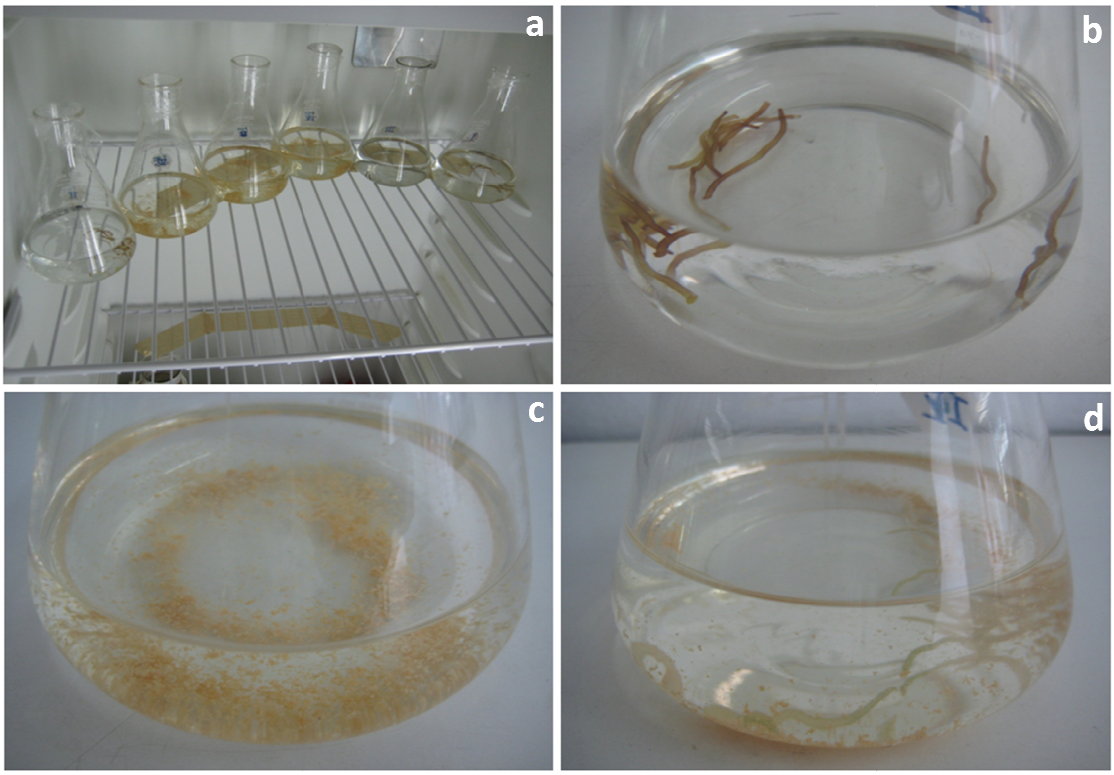


Figura 20. Estas fotos referem-se a experimento composto por dois momentos: 1º as algas foram expostas a 10 ug/mL de BaP por 96h. Como a bioquímica de sua fotossíntese permaneceu inalterada durante este período, num 2º momento a concentração do poluente foi aumentada para 20 ug/mL, situação que foi mantida por mais 72h, totalizando um total de 7 dias de experimento. Em **a**, é possível ver a algas durante experimentação. Ao término, as réplicas expostas a BaP perderam sua coloração avermelhada característica (**d**), enquanto as réplicas controles mantiveram seu aspecto normal (**b**). Interessante notar a pequena solubilidade apresentada por BaP nestas altas concentrações: em **c**, sem alga; e em **d**, com alga. O poluente mostrou-se bastante tóxico com o aumento da sua fração precipitada.

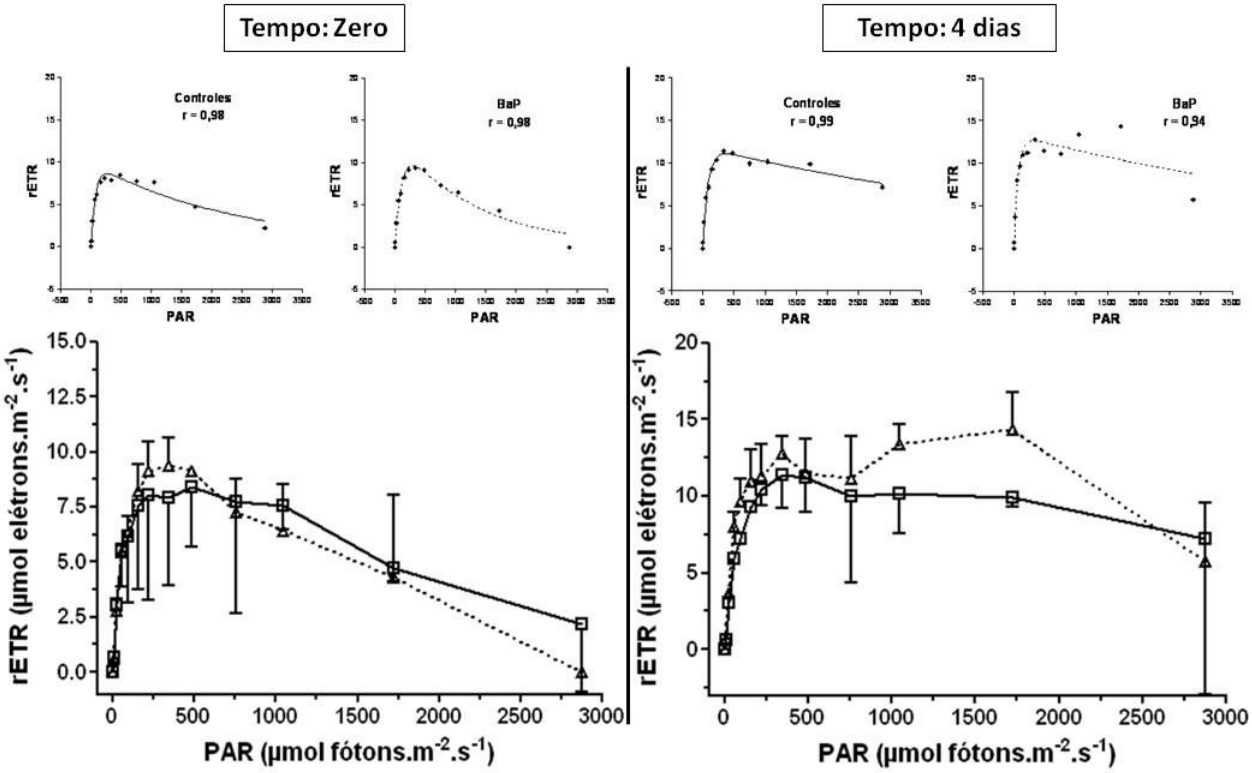


Figura 21. Curvas PI obtidas no início da exposição a 10 µg/mL de BaP (à esquerda), e após 4 dias (à direita). Curvas com traços contínuos representam a fotossíntese dos controles enquanto curvas com traços pontilhados representam as algas expostas a BaP. O comportamento fotossintético de todas as réplicas nas condições apresentadas foi muito semelhante. No detalhe, acima das figuras principais, estão as curvas PI média de algas controle e algas expostas a BaP. rETR: taxa de transporte de elétrons relativa (fotossíntese relativa); PAR: radiação fotossinteticamente ativa.

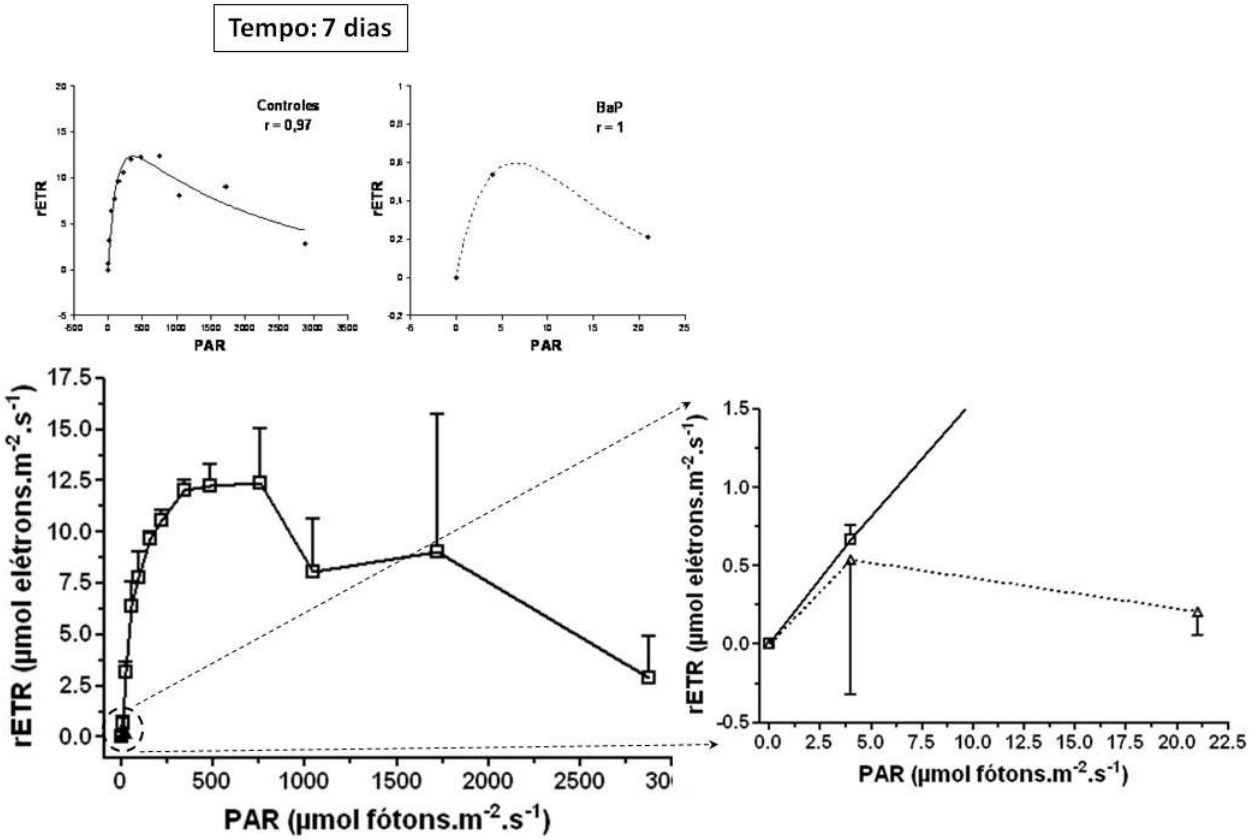


Figura 22. Curvas PI obtidas ao final de 7 dias de exposição a ug/mL de BaP. Após a tomada de dados de fotossíntese de 4 dias (**Fig. 21**), a concentração de BaP das amostras expostas ao poluente foi aumentada de 10 para 20 µg/mL. As curvas PI aqui apresentadas referem-se ao tratamento: 4 dias de exposição a 10 µg/mL de BaP + 3 dias de exposição a 20 µg/mL de BaP. Curvas com traços contínuos representam a fotossíntese dos controles enquanto curvas com traços pontilhados representam as algas expostas a BaP. O comportamento fotossintético entre amostras controle e amostras expostas ao HPA variou bastante. No detalhe, acima das figuras principais, estão as curvas PI média de algas controle e de algas expostas a BaP. rETR: taxa de transporte de elétrons relativa (fotossíntese relativa); PAR: radiação fotossinteticamente ativa.

BaP, nas condições descritas na **Figura 22**, foi prejudicial à fotossíntese da alga e exigiu diminuir a escala do eixo das ordenadas do gráfico para fazer-se possível enchergar o perfil da curva PI das algas expostas ao hidrocarboneto (à direita na **Fig. 22**).

Tabela 9. Parâmetros fotossintéticos derivados das curvas PI da **Figura 21** (tempo: zero). Os dados da tabela representam amostras controle e amostras expostas ao poluente no início da exposição de 7 dias a altas concentrações de BaP. As variáveis não oscilaram diante das condições de exposição apresentadas. Letras distintas indicam diferenças significativas.

Parâmetros Fotossintéticos	**Tratamento**	
	Controle	**10 µg/mL de BaP**
P_{max} (rETR)	8,582 ± 4,516 (a)	9,671 ± 1,316 (a)
RQE	0,459 ± 0,033 (a)	0,430 ± 0,054 (a)
I_k (µmol $m^{-2}.s^{-1}$)	57,475 ± 29,974 (a)	86,068 ± 19,498 (a)
α (rETR)	0,149 ± 0,001 (a)	0,115 ± 0,023 (a)
β (rETR)	0,006 ± 0,008 (a)	0,011 ± 0,006 (a)

Tabela 10. Parâmetros fotossintéticos derivados das curvas PI da **Figura 21** (tempo: 4 dias). Os dados da tabela representam amostras controle e amostras expostas ao poluente após 4 dias do início da exposição de 7 dias a altas concentrações de BaP. As variáveis não oscilaram diante das condições de exposição apresentadas. Letras distintas indicam diferenças significativas. Apenas uma das réplicas da triplicata controle apresentou fotoinibição; assim, o valor da variável β controle não é uma média de valores (sem desvio padrão).

Parâmetros Fotossintéticos	**Tratamento**	
	Controle	**10 µg/mL de BaP**
P_{max} (rETR)	11,301 ± 1,972 (a)	12,663 ± 1,782 (a)
RQE	0,352 ± 0,020 (a)	0,564 ± 0,009 (a)
I_k (µmol $m^{-2}.s^{-1}$)	83,026 ± 18,491 (a)	66,150 ± 11,651 (a)
α (rETR)	0,137 ± 0,007 (a)	0,195 ± 0,037 (a)
β (rETR)	0,005 ± ---- (a)	0,002 ± 0,002 (a)

Tabela 11. Parâmetros fotossintéticos derivados das curvas PI da **Figura 22**. Os dados da tabela representam amostras controle e amostras expostas ao poluente após 7 dias do início da exposição de 7 dias a altas concentrações de BaP (10 µg/mL de BaP por 4 dias + 20 µg/mL de BaP por 3 dias). Os valores das variáveis P_{max}, RQE, I_k e β variaram entre amostras controle e amostras expostas a BaP. Letras distintas indicam diferenças significativas.

Parâmetros Fotossintéticos	**Tratamento**	
	Controle	**20 µg/mL de BaP**
P_{max} (rETR)	12,689 ± 1,222 (a)	0,658 ± 0,780 (**b**)
RQE	0,521 ± 0,040 (a)	0,015 ± 0,011 (**b**)
I_k (µmol $m^{-2}.s^{-1}$)	107,096 ± 40,196 (a)	5,847 ± 6,317 (**b**)
α (rETR)	0,125 ± 0,036 (a)	0,323 ± 0,508 (a)
β (rETR)	0,008 ± 0,004 (a)	1,189 ± 0,161 (**b**)

A observação da **Figura 23** facilita entender o que ocorreu com as variáveis fotossintéticas P_{max}, I_k e β ao longo dos 7 dias de exposição. Ao sofrer despigmentação, a alga teve seu comportamento fotossintético bastante alterado: a fotossíntese máxima relativa e a intensidade de luz saturante diminuíram aproximadamente 20 vezes; a fotoinibição aumentou 125.000 vezes. O RQE de *G. birdiae* apresentou uma redução aproximada de 35 vezes.

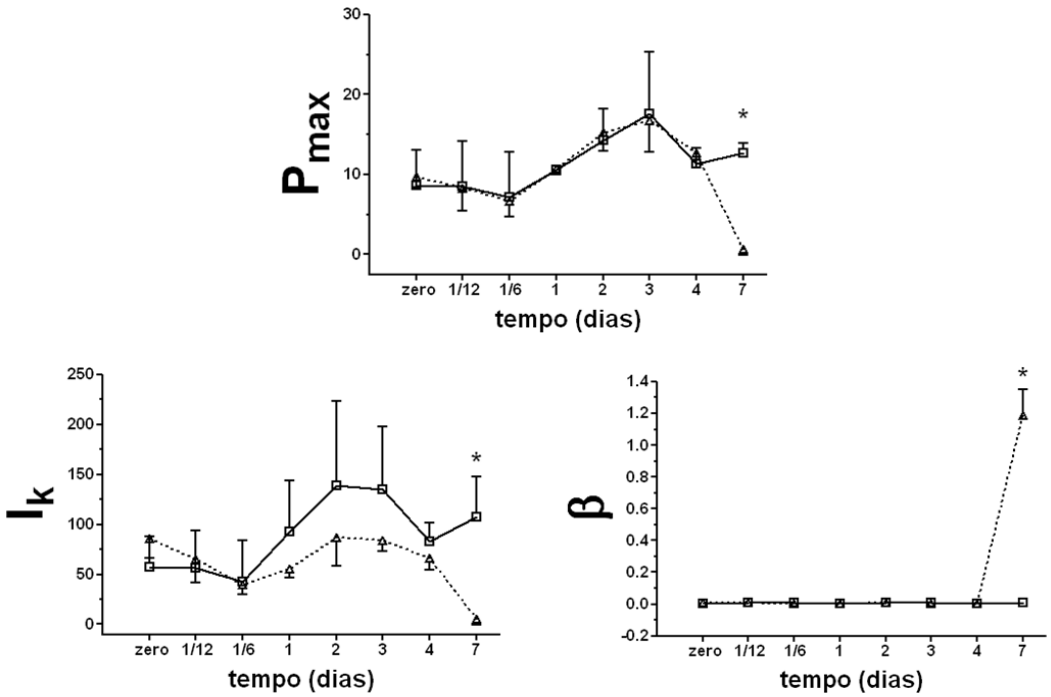


Figura 23. As curvas representam o comportamento das variáveis fotossintéticas P_{max} ($rETR_{max}$), I_k (µmol $m^{-2}.s^{-1}$) e β (rETR) ao longo de 7 dias de exposição a altas concentrações de BaP (10 µg/mL de BaP por 4 dias + 20 µg/mL de BaP por 3 dias). Em pontilhado estão representadas as amostras expostas ao poluente, enquanto as curvas contínuas representam as amostras controle. *: diferenças significativas.

4.5 Quantificação de BaP nos meios de cultura de *G. birdiae*

Um outro aspecto sobre o qual desejava-se saber a respeito de *G. birdiae* era se a alga tinha a capacidade de biotransformar BaP, tornando-o uma molécula mais hidrofílica e menos tóxica aos sistemas vivos. Para isso, fez-se necessário desenvolver um método analítico em sistema HPLC/FL que permitisse a detecção e a quantificação do HPA nos meios de cultura da alga. Esse método ainda poderia auxiliar na elucidação a respeito da solubilidade de BaP nas concentrações utilizadas nas mais diferentes situações de exposição apresentadas na dissertação.

O método desenvolvido (detalhes no ítem 3.7) apresentou grande reprodutibilidade e uma boa correlação linear entre áreas de picos de BaP obtidas nos cromatogramas com concentrações crescentes de BaP injetadas no equipamento. O perfil cromatográfico do método e mais detalhes podem ser vistos na **Figura 24**.

Com relação à biotransformação, um novo pico, com tempo de eluição maior e com as mesmas características de fluorescência de BaP, apareceu no cromatograma em dois tipos de amostra: contendo alga e BaP, ou seja, das quais poderia se esperar alguma biorremediação; e de amostras controle, sem alga mas contendo BaP (**Fig. 24**).

Não foi possível observar diminuições das áreas dos picos de BaP referentes a alíquotas coletadas dos meios algais em tempos crescentes da exposição (dados não apresentados). Essa observação, somada às evidências do parágrafo anterior (suspeitou-se que o pico com tempo de eluição maior que o de BaP pudesse representar um produto de biotransformação), sugerem que a alga não apresenta uma taxa eficiente de absorção e transformação de BaP. Porém, para a confirmação desta característica, faz-se necessário a realização de experimentos de cinética mais detalhados associados a melhoramentos do método de quantificação do HPA em água do mar.

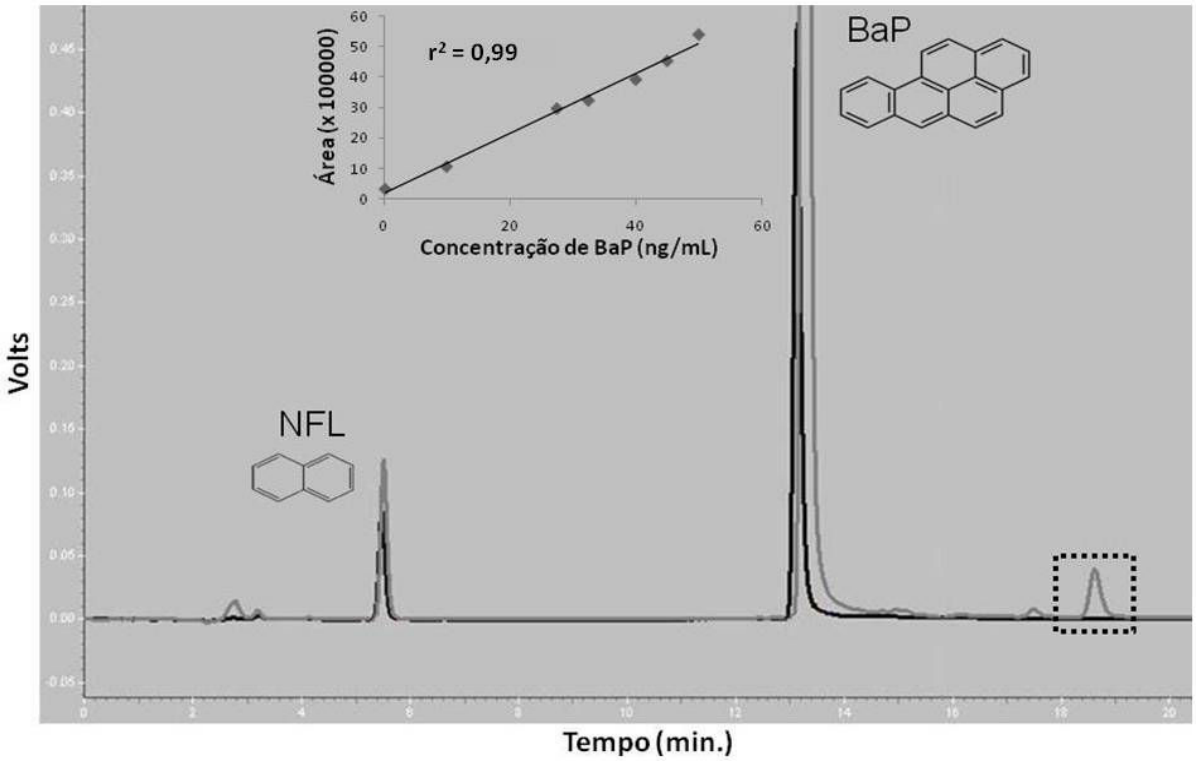


Figura 24. Perfis cromatográficos de 2 amostras contendo BaP. Foram obtidos a partir de injeção em sistema HPLC/FL. Perfil preto: referente à amostra contendo 50 ng/mL de BaP e 500 ng/mL de NFL. Perfil cinza: cromatograma de amostra contendo alga e 500 ng/mL de BaP, após 3 dias de exposição; neste perfil ainda pode-se observar a formação de um novo pico (indicado pelo quadrado preto descontínuo), com tempo de eluição de 18,6 min. A molécula que deu origem a esse pico tem as mesmas características de fluorescência de BaP. BaP e o padrão interno NFL foram detectados por fluorescência (BaP: λ_{ex} 250 nm e λ_{em} 420 nm; NFL: λ_{ex} 270 nm e λ_{em} 330 nm) em 12,8 e 5,4 min., respectivamente. Também estão representadas as estruturas químicas de BaP e NFL e a correlação linear (r^2) do método analítico desenvolvido.

Quanto à verificação da solubilidade de BaP em água do mar utilizando-se MeOH 1 % (v/v) para as concentrações de BaP compreendidas no intervalo 69 a 20 µg/mL, que foram aquelas apresentadas durante a execução do projeto, o que pode-se perceber é que a água do mar é uma matriz um tanto quanto complexa para as análises que se desejou realizar.

O método analítico apresentou-se bastante reprodutível, como apresentado na **Figura 24**, desde que as injeções fossem realizadas a partir de amostras preparadas em fase orgânica. As quantificações realizadas com o intuito de se determinar a solubilidade de BaP na água do mar dos meios algais foram feitas a partir de injeções diretas de alíquotas de solução marinha;

nestes casos, até mesmo repetições de injeções de uma mesma amostra resultaram em quantificações de BaP bastante distintas. Nestas situações, o método variou razoavelmente, evidenciando a falta de homogeneidade da matriz aquosa marinha. Essa constatação também dificultou as observações a respeito da capacidade biotransformadora da alga.

Tentou-se resolver a situação descrita acima utilizando-se de procedimentos de extração líquido-líquido ou de extração em fase sólida. Em ambos os casos, após o término das exposições a BaP, o poluente dos meios de cultura das algas foi extraído para a fase orgânica líquida ou para a matriz hidrofóbica das colunas, e ao final, BaP foi ressuspenso em um pequeno volume de fase orgânica metanólica, para posteriormente ser injetado em sistema HPLC/FL. Desta vez, apesar da reprodutibilidade do método, o grande problema enfrentado foi a falta de eficiência dos dois procedimentos de extração experimentados.

Apesar da falta de indícios sobre o que de fato pode ter ocorrido com a solubilidade de BaP em água do mar utilizando-se 1 % de MeOH (v/v), é certo que em concentrações muito elevadas do poluente, como ≥ 5 µg/mL, parte do HPA adicionado aos meios precipitou e os tornou mais túrbidos (**Fig. 30 a**). Algum tempo decorrido após a adição de BaP, este começou a formar pequenos aglomerados que sedimentaram (**Fig. 20 c** e **d**).

4.6 Biologia molecular de *G. birdiae*

4.6.1 Teste dos iniciadores

Após a extração do DNA total de *G. birdiae*, o próximo passo era testar a eficácia dos pares de iniciadores que tínhamos em mãos.

Os testes de amplificação do DNA foram feitos a partir de reações de PCR. Num primeiro momento, realizou-se um PCR com alto grau de estringência (alta especificidade), após o qual apenas pode ser observada amplificação de uma banda de DNA para ACT. Num momento seguinte, com a diminuição da estringência da reação puderam ser obtidas amplificações de DNA para: GST (com os pares de iniciadores 1 e 2), CAT (pares 1 e 2), SOD (par 2) e ACT. A **Figura 25** mostra os resultados dos dois PCR.

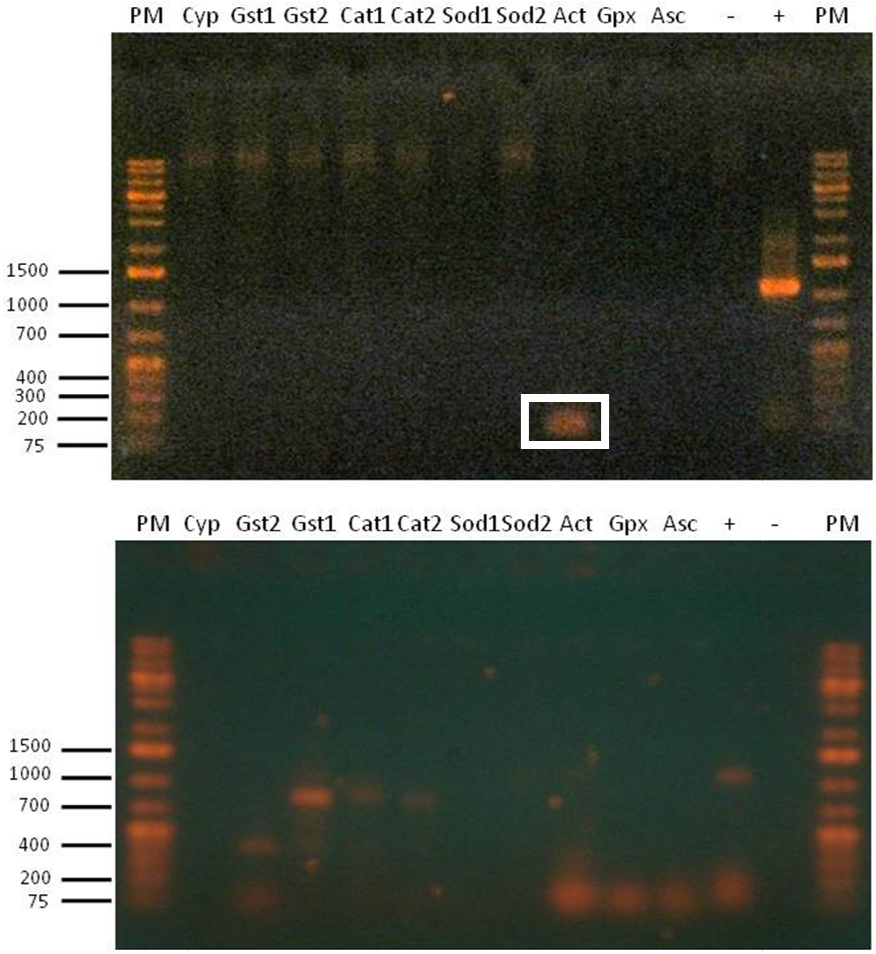


Figura 25. As imagens de eletroforeses em gel de agarose mostram duas situações de PCR diferentes. Acima, são mostrados os produtos do PCR com alto grau de estringência, após a qual apenas amplificou-se DNA de ACT (destacada pelo retângulo branco). A imagem abaixo apresenta as amplificações referentes a: GST 2, GST 1, CAT 1, CAT 2, SOD 2 e ACT obtidas com a diminuição da estringência da reação de PCR. PM: padrão de peso molecular, em pares de bases; Cyp: citocromo P450; Gst: glutationa S-transferase; Cat: catalase; Sod: superóxido dismutase; Act: actina; Gpx: glutationa peroxidase; Asc: ascorbato peroxidase; + e -: controles positivo e negativo do PCR.

Após a obtenção dos resultados do segundo PCR, procedeu-se com as etapas necessárias para se conseguir sequenciar e descobrir o que eram as seguintes bandas da imagem de baixo da **Figura 25**: a banda de 400 pares de bases (pb) de GST 2; as bandas em torno de 1000 e 400 pb de GST 1 (assinaladas, respectivamente, como Gst 1.1 e 1.2 na **Fig. 26**); a banda de 1000 pb de CAT 1; a banda de 900 pb de CAT 2; a banda entre 1000 e 1500

pb de SOD 2 (mais visível no transluminador); e 3 bandas de ACT em torno de 1500, 400 e 300 pb (respectivamente, Act 1.1, 1.2 e 1.3 na **Fig. 26**).

A **Figura 26** apresenta o resultado do PCR realizado com material genético de colônias de bactérias (ítem 3.11.6 da dissertação) que foram previamente transformadas com o DNA referente às bandas de interesse citadas no parágrafo anterior. Para todas as reações, os iniciadores utilizado foram SP6 e T7, que anelam junto ao plasmídeo bacteriano. Estas mesmas colônias bacterianas foram crescidas em meio líquido (LB) e posteriormente sofreram extração de seus plasmídeos, os quais foram encaminhados para sequenciamento.

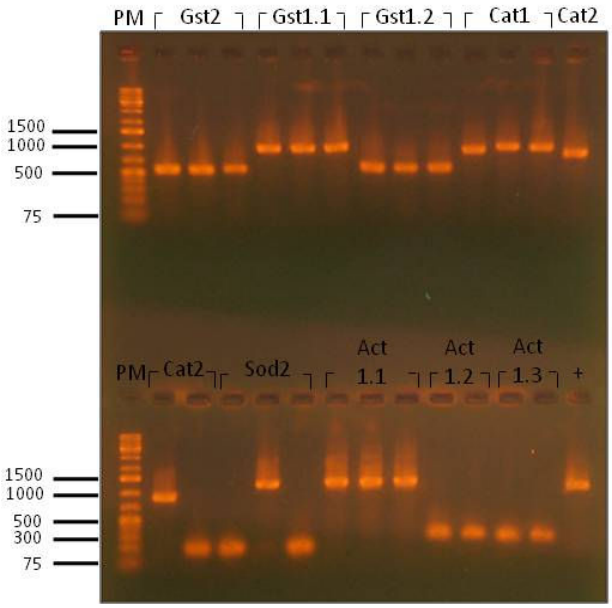


Figura 26. Eletroforese em gel de agarose mostrando o resultado do PCR realizado com DNA de colônias de bactérias transformadas, confirmando que estas haviam incorporado os fragmentos de DNA de interesse. PM: padrão de peso molecular, em pares de bases; Gst: glutationa S-transferase; Cat: catalase; Sod: superóxido dismutase; Act: actina.

O alinhamento das sequências obtidas contra o banco público de sequências do NCBI, no entanto, não foi positivo. Todos os alinhamentos das sequências referentes às amplificações de DNA obtidas do 2º PCR (foto de baixo da **Fig. 25**) apontaram para sequências não pretendidas: proteína hipotética (registro GenBank gb|CP000830.1|),

regulador de transcrição (gb|AE008923.1|), e gene de rRNA 16s (emb|FM252905.1|) de bactéria, e transposon de planta (gb|EU558531.1|). Essa série de experimentos foi repetida uma outra vez, porém os alinhamentos apresentaram resultados semelhantes.

Numa última repetição super-estringente da reação de PCR, obteve-se amplificação de banda para actina, com peso molecular abaixo dos 250 pb (**Fig. 27**), que provavelmente corresponde ao mesmo produto de amplificação obtido no 1º PCR (**Fig. 25**). O resultado do alinhamento da sequência desta banda de ACT com o banco de sequências do NCBI foi positivo, mostrando que fora possível amplificar um fragmento de ACT de *G. birdiae* com o uso dos iniciadores não degenerados de *G. tenuistipitata*. A sequência de nucleotídeos da ACT de *G. birdiae* que fora amplificada apresentou alta conservação de bases quando comparada a sequências de outras 3 espécies de Rhodophyta (*Nemalionopsis shawii, Hildenbrandia rubra*, *Bonnemaisonia hamifera*). A **Figura 28** apresenta os alinhamentos de nucleotídeos das ACT destas 4 espécies de algas, além de mostrar os alinhamentos das proteínas traduzidas.

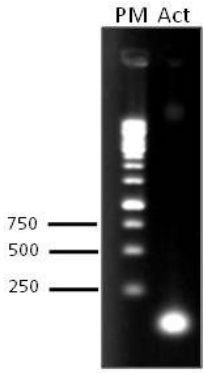


Figura 27. Eletroforese em gel de agarose mostrando o resultado do PCR realizado com DNA de colônia de bactéria transformada com DNA de actina. Par de iniciadores utilizado: SP6 e T7. PM: padrão de peso molecular, em pares de bases. Act: actina.

sequência de nucleotídeos

```
G. birdiae    1  GATGAGTACGTTGGTGACGCCGCTATGGCTCGCCGTGGTGTCTTAATCATCAAGTACCCTCTGGAACACG 70
N. shawii     1  GACGAGTATGTCGGTGATGCGGCTATGGCCCGCCGTGGTGTGCTCATTATCAAGTATCCACTTGAGCACG 70
H. rubra      1  GATGAATATGTAGGTGATGCAGCAATGGCACGACGTGGAGTACTCATCATCAAGTATCCTTTGGAACATG 70
B. hamifera   1  GACGAGTACGTCGGTGATGCCGCCATGGCTCGCCGTGGTGTCCTCATCATCAAGTATCCTCTTGAGCATG 70

G. birdiae   71  GTATCGTCACAAACTGGGACGAT 93
N. shawii    71  GTATTGTCACCAACTGGGAGGAC 93
H. rubra     71  GTATTGTAACCAACTGGGATGAT 93
B. hamifera  71  GTATCGTCACTAACTGGGAGGAC 93
```

sequência de aminoácidos

```
G. birdiae   1  DEYVGDAAMARRGVLIIKYPLEHGIVTNWDD 31
N. shawii    1  DEYVGDAAMARRGVLIIKYPLEHGIVTNWED 31
H. rubra     1  DEYVGDAAMARRGVLIIKYPLEHGIVTNWDD 31
B. hamifera  1  DEYVGDAAMARRGVLIIKYPLEHGIVTNWED 31
```

Figura 28. Sequência de ACT de *G. birdiae* e melhores alinhamentos desta com o banco de sequências do NCBI. Os alinhamentos de sequências de nucleotídeos foram obtidos por meio de tblastx, enquanto os alinhamentos de sequências de proteína foram determinados por blastx. N. shawii: *Nemalionopsis shawii*; H. rubra: *Hildenbrandia rubra*; e B. hamifera: *Bonnemaisonia hamifera*.

4.6.2 Análise dos danos provocados por BaP ao DNA da alga

A outra abordagem do projeto relacionada a aspectos moleculares de *G. birdiae* envolve a detecção e a quantificação de lesões oxidativas causadas ao DNA algal em decorrência da exposição a BaP. O biomarcador rastreado foi a 8-oxodG.

Nesse sentido, um método analítico em sistema HPLC/MS/MS foi desenvolvido (detalhes no ítem 3.10). O método apresentou, respectivamente, um LOD e um LOQ de 1,3 e 4,32 pg para 8-oxodG, valores que foram derivados de extrapolação da razão sinal/ruído por um fator de 3 (LOD) e 10 (LOQ). O método apresentou reprodutibilidade e correlação linear satisfatórias. A **Figura 29** apresenta um perfil cromatográfico obtido a partir do método descrito.

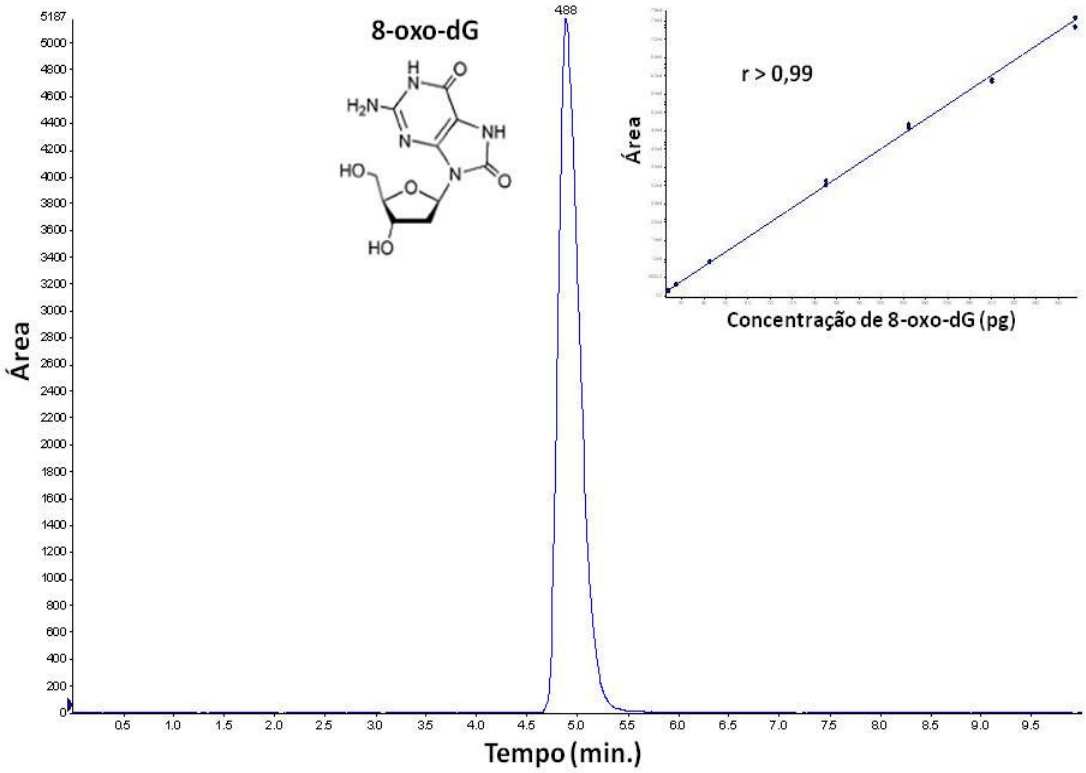


Figura 29. Cromatograma do método bioanalítico desenvolvido com o objetivo de detectar e quantificar 8-oxodG. O pico apresentado refere-se a uma injeção de 375 pg de 8-oxodG no sistema cromatográfico. O analito apresentou tempo de eluição de 4,88 min. O sinal *m/z* para $[8\text{-oxodG} + H]^+$ foi de 284,3 amu, enquanto que o íon produto apresentou sinal *m/z* de 168,4 amu. A estrutura química da 8-oxodG e a correlação linear do método (r > 0,99) também estão na figura. Injeções realizadas em sistema HPLC/MS/MS.

Com o método analítico padronizado, o próximo passo era a preparação das amostras biológicas. A **Figura 30** mostra fotos do experimento a partir do qual o DNA de *G. birdiae* foi extraído. Após 96h de exposição a 10 µg/mL de BaP, os 5 g de algas expostos ao poluente despigmentaram, enquanto os 5 g de algas controle apresentavam um aspecto saudável.

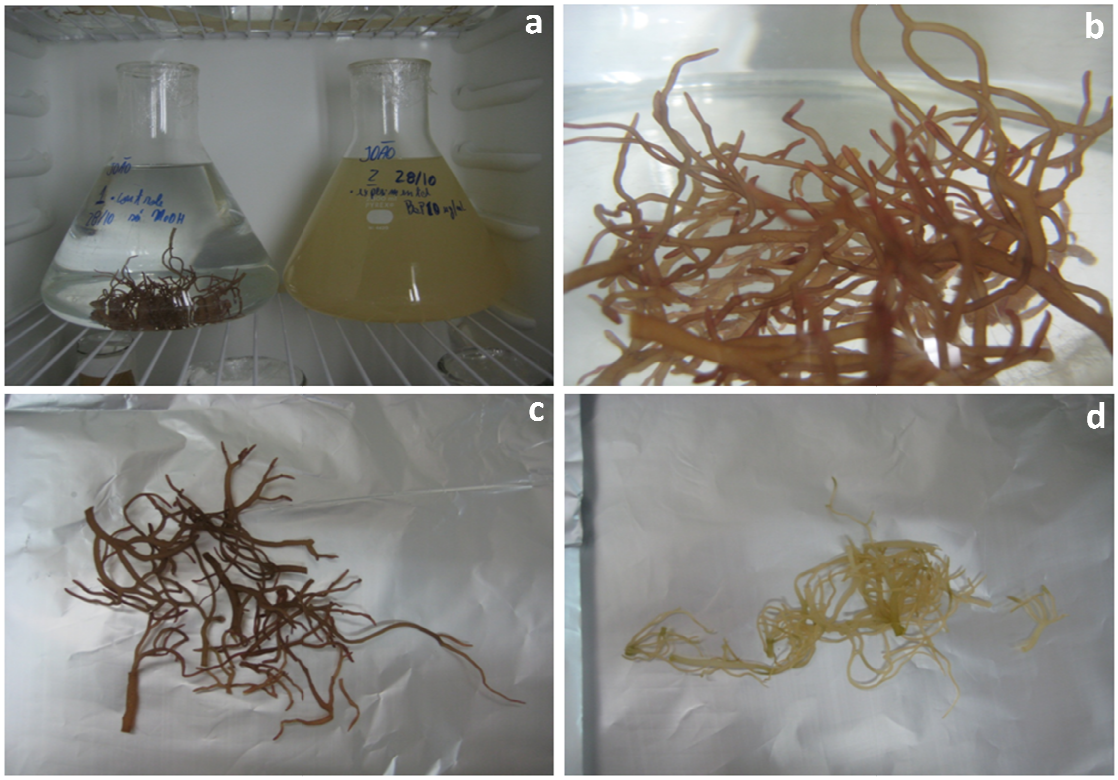


Figura 30. As fotos representam experimento caracterizado por exposição de 96h a 10 ug/mL de BaP. Após este período, o DNA das algas foi extraído. Devido à grande quantidade de biomassa utilizada em cada réplica (5 g), o número amostral do experimento teve que ser igual a 1 (**a**). As fotos **b** e **c** mostram detalhes das algas expostas à condição controle (sem BaP): em **b**, alga dentro de erlenmeyer durante a experimentação; em **c**, alga ao término das 96h de experimento. Em **d**, pode-se observar o aspecto de *G. birdiae* após as 96h de exposição a BaP.

O DNA das algas foi extraído como está descrito em 3.9.1. Para nos certificarmos que de fato o DNA estava sendo extraído com qualidade, quantificações foram realizadas em espectrofotômetro a 260 nm (mais detalhes em 3.9.1). Após esta confirmação, para poder ser analisado em sistema HPLC/MS/MS, o DNA algal ainda precisava ser fragmentado a nucleosídeos, e para isso se fazia necessário alguns passos sucessivos de digestão enzimática. A **Figura 31** mostra o resultado do tratamento com DNAse I sofrido pelo DNA algal. Esta enzima tem a capacidade de quebrar as ligações fosfodiéster existentes entre nucleotídeos adjacentes de uma mesma hélice de DNA, provocando assim a formação de oligo e mono-nucleotídeos.

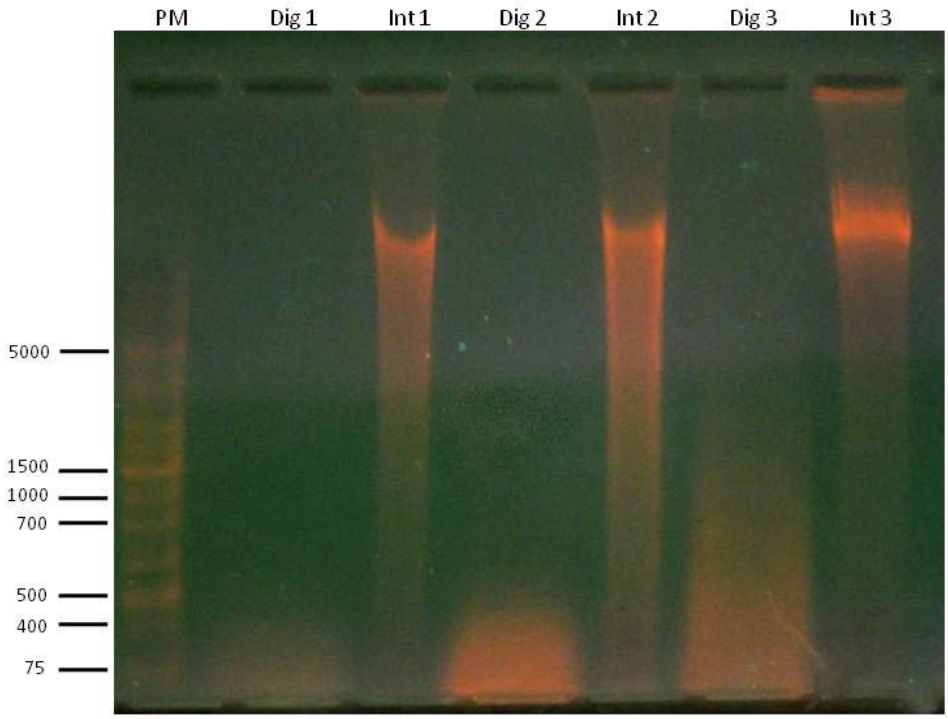


Figura 31. Com o intuito de confirmação da digestão que o DNA extraído de *G. birdiae* deveria ter sofrido, realizou-se eletroforese em gel de agarose. Fez-se possível notar que as amostras de DNA total da alga que foram submetidas à digestão por DNAse I (raias: Dig 1, 2 e 3) não resistiram à sua ação, enquanto amostras de DNA total que não foram submetidas à digestão, isto é, DNA íntegro (raias: Int 1, 2 e 3), mantiveram seu alto peso molecular e praticamente não migraram no gel. PM: padrão de peso molecular, em pares de bases.

O passo seguinte constituía-se na remoção dos grupos fosfato dos nucleotídeos por ação de uma fosfatase. Em seguida, procedeu-se com a filtração das amostras de DNA para remoção de moléculas com peso molecular acima de 10 kDa (para impedir o entupimento da coluna cromatográfica). Ao final, os nucleosídeos de DNA foram injetados em sistema HPLC/MS/MS para se averiguar a existência de lesões.

Ainda não se sabe ao certo qual a razão mas não foi possível detectar bases do DNA normais ou oxidadas. O fato das bases normais não poderem ter sido detectadas nos faz acreditar que o problema ocorrido esteja relacionado com a fosfatase. Numa outra aproximação, utilizando um outro método analítico, tentou-se detectar o aduto BaPDE-DNA, porém as análises preliminares não permitiram evidenciar a molécula.

4.7 Citocromo P450

A obtenção da membrana microssomal que contém CYP450 logo mostrou-se desafiadora. Essas membranas correspondem a uma fração ínfima do conteúdo total celular, e nesse sentido, experimentos para sua obtenção exigem a utilização de biomassas muito elevadas, as quais não correspondiam à realidade do banco de algas do laboratório. Em pouco tempo percebeu-se que se insistíssemos com tais experimentos, faltaria biomassa algal viva para a realização dos outros objetivos do projeto.

Mesmo assim, alguns experimentos para obtenção de CYP450 foram realizados e resumem-se àquilo que fora descrito em 3.12, 3.13 e 3.14. Após obter o precipitado oriundo da ultra-centrifugação, tentou-se detectar, por espectrofotometria, uma mudança no padrão de absorção das amostras de 420 para 450 nm após o borbulhar saturante realizado com CO. As varreduras realizadas no intervalo de 400 a 500 nm não permitiram identificar qualquer pico de absorção. Tentou-se entender um pouco sobre o conteúdo protéico obtido a partir das ultra-centrifugações por meio de SDS-PAGE. A revelação do gel de poliacrilamida (não apresentado) evidenciou duas bandas mais fortes com pesos moleculares (de 52,2 e 60 kDa) próximos daquele esperado para enzimas CYP450 com atividade sobre xenobióticos (da categoria dos HPAs) caracterizadas em *Helianthus tuberosus* (com 55 kDa) (BATARD *et al*., 1998). Uma alternativa para desvendar a natureza destas proteínas teria sido a realização de western-blot utilizando anticorpos específicos para CYP450. Porém, não foi possível obter tais marcadores no tempo de desenvolvimento do projeto.

Diante do que fora exposto acima, a obtenção, detecção e quantificação de CYP450 de *G. birdiae* foi deixada para ser elucidada posteriormente.

Mesmo assim, algumas considerações merecem ser feitas. Alguns artigos já descreveram aumento na indução da expressão e da atividade de isoformas de sub-famílias específicas de CYP450 relacionadas à presença de HPAs no ambiente. A maioria destas publicações caracterizaram CYP450 em mamíferos, peixes, artrópodes e moluscos

(PHILLIPSON *et al*., 1985; STEGEMAN e HAHN, 1994; BUCHELI e FONT, 1995; ISHIZUKA *et al*., 1996; SHIMADA *et al*., 2001).

Por outro lado, vale salientar as considerações feitas por MATUO (2007) à respeito de dificuldades encontradas para detectar CYP450 em laboratório. Manipulando o fungo unicelular *Saccharomyces cerevisiae*, a pesquisadora comenta que a detecção de CYP450 a partir da prévia solubilização da enzima em tampão apropriado (caso deste projeto) pode trazer a desvantagem de haver perda da oxigenase por desnaturação, mesmo respeitando-se condições de pH e temperatura ótimos. Ainda, a autora comenta sobre os custos materiais e sobre o tempo necessário para realização das análises. No caso de MATUO (2007), como estava-se trabalhando com organismos unicelulares, havia a possibilidade de determinação de CYP450 em suspensão de células intactas. Nestas condições, a caracterização de CYP450 revelou-se mais praticável. Porém, esta abordagem não era uma opção para a manipulação de *G. birdiae* dada a sua natureza macro.

5. Discussão

5.1 Toxicidade de BaP sobre o crescimento de *G. birdiae*

Limitações biológicas, como um crescimento pouco expressivo apresentado por *G. birdiae*, associadas à limitações instrumentais, como o relatado para a balança analítica (em 4.2), podem ter impedido uma avaliação rigorosa sobre a toxicidade aguda de BaP sobre *G. birdiae*. Por outro lado, não são poucos os estudos envolvendo macroalgas do gênero *Gracilaria* que estimam TC baseadas em períodos longos de análise.

PLASTINO *et al*. (2004) o fez para *G. birdiae* para um período de 4 semanas, o mesmo que fora apresentado por URSI e PLASTINO (2001). Nestes dois trabalhos, as medições de biomassa fresca da alga foram feitas em intervalos de tempo semanais. LIGNELL e PEDERSÉN (1989), investigando TC de *Gracilaria secundata* e *G. verrucosa*, realizaram experimentação de 14 e de 17 dias de duração. LAING *et al* (1989), manipulando *G. sordida*, mediu biomassa 3 vezes por semana por um período que foi de 4 a 7 semanas. A opção por tomadas de dados de biomassa em intervalos de tempos maiores (3 ou mais dias) reduz a interferência por parte do experimentador sobre o comportamento dos organismos testados. Metodologias de tomadas de dados de biomassa a partir de secagem das algas manualmente em papel ou a partir de centrifugação, que são, respectivamente, os casos do presente estudo e dos trabalhos destacados acima, não devem ser ignoradas enquanto estressoras para as algas.

Mesmo sabendo-se destas limitações, muitos são os trabalhos que procuram entender os fenômenos intrínsecos às exposições agudas. Neste contexto, trabalhar com organismos que apresentem TC maiores ajuda a diminuir a importância da interferência realizada pelo investigador. Se as TC de *G. birdiae* do presente estudo tivessem sido mais próximas daquelas apresentadas nas publicações de LIGNELL e PEDERSÉN (1989), URSI e

PLASTINO (2001), COLLÉN *et al*. (2003) (estudo com *G. tenuistipitata*) e PLASTINO *et al*. (2004), talvez a abordagem aguda pudesse ter sido mais factível. Nestas publicações, as TC ficaram entre 3,7 e 11 % do peso fresco por dia, enquanto no presente trabalho, ficou em torno de 1,05 % (TC como descrito em LIGNELL e PEDERSEN, 1989). Valores de TC também podem ser obtidos a partir da inclinação de curvas relacionando o logarítmo natural dos valores de biomassa fresca contra o tempo (TC como descrito em LAING *et al*., 1989), como aquelas apresentadas nas **Figuras 9** e **10** (da última, os histogramas). LAING *et al*. (1989) relata que as máximas TC diárias com valores desta natureza podem oscilar, para macroalgas, entre 0,06 e 0,25. As TC de *G. birdiae* deste estudo ficaram abaixo deste intervalo, apresentando valor de 0,005.

Essa diferença expressiva encontrada para os valores de TC talvez possa ser explicada por mais de uma variável: 1) diferentes características entre as espécies de macroalgas que possam influenciar seus crescimentos. Por exemplo, diferentes espécies apresentam diferentes valores para a razão superfície/volume. Algas com alto valor da razão são consideradas de alta produtividade quando comparadas com algas com baixo valor para a razão; as 1as normalmente possuem talo fino e são altamente ramificadas, mostrando-se mais eficientes na tomada de nutrientes do meio do que algas com talo mais grosso (PATWARY e VAN DER MEER **apud** LIGNELL e PEDERSEN, 1989). Talo grosso foi uma característica evidente dos exemplares de *G. birdiae* utilizados neste estudo. 2) diferenças nas condições de crescimento das algas, principalmente no que se refere à luminosidade (foto-período e intensidade), densidade de alga, e concentração de nutrientes. A condição de exposição mais parecida com a do presente estudo foi aquela apresentada por PLASTINO *et al*. (2004), que também investigou *G. birdiae*, porém utilizando o dobro de concentração de meio VS (0,2 %, v/v). Nestas condições, *G. birdiae* apresentou TC de 8,5 %.

Quanto à toxicidade de BaP, a observação das **Figuras 9** e **10** permite concluir que o HPA é nocivo à macroalga na medida em que consegue inibir de maneira crescente a TC do organismo conforme seus níveis estão mais altos no meio: a TC de algas controle foi 300 % superior àquela observada para algas expostas a 2000 ng/mL de BaP. Os dados de TC contra concentrações crescentes de BaP apresentaram correlação linear dose-dependente. Como havia sido sugerido na Introdução (ítem 1.3), a logaritmização dos valores de concentração de BaP transformou a correlação linear original dos dados numa correlação não linear: a partir da reta obteve-se uma curva sigmóide.

Não são numerosos os artigos disponíveis na literatura que relatam a toxicidade de compostos orgânicos frente a macroalgas marinhas. O composto mais estudado é o fenol, que até o ano 2003 tinha 5 artigos publicados envolvendo 4 espécies diferentes. Artigos envolvendo HPAs, mais especificamente BaP, quase não existem. Para piorar, EKLUND *et al*. (2003) relatam que a maioria dos resultados publicados sobre o assunto investigaram os efeitos causados pela toxicidade dos poluentes sem se basear em valores derivados (*i.e.*: IC, EC – concentração efetiva–, LC – concentração letal) a partir de curvas dose-resposta, o que é recomendado para testes de toxicidade padronizados.

Ainda, apesar de o sintoma ("end point") mais frequentemente avaliado em testes de toxicidade envolvendo plantas e algas ser a alteração do crescimento, atualmente não se faz possível comparar diferentes valores de IC_{50} entre macroalgas que tenham sido expostas a BaP, uma vez que a forma diferente de expressão dos resultados torna impraticáveis as comparações de efeito direto. Ainda, os artigos disponíveis apresentam uma enorme variedade no que se refere a objetivos e à concepção experimental. Pelo mesmo motivo ainda não existia, até 2003, nenhum método internacional padronizado para testar toxicidade de poluentes orgânicos frente a macroalgas (EKLUND e KAUTSKY, 2003).

O trabalho de DJOMO *et al*. (2004) apresenta resultados de exposição da microalga verde *Scenedesmus subspicatus* frente a 5 HPAs distintos. Os resultados do trabalho mostram que o potencial tóxico destes compostos parece ser fortemente influenciado por suas características físico-químicas (solubilidade em água, K_{ow}, coeficiente de volatilização, e outros); pode-se perceber que HPAs com maior peso molecular, como BaP, apresentam maior toxicidade. O valor de IC_{50} de BaP para *S. subspicatus*, considerando-se um período de exposição de 7 dias, foi 1,48 ng/mL, valor 45 vezes menor daquele encontrado para *G. birdiae*. Já BOPP e LETTIERI (2007) encontraram valor de IC_{50} de BaP para a diatomácea (microalga) marinha *Thalassiosira pseudonana*, para exposição de 24h, de 55,24 ng/mL, valor próximo da IC_{50} de *G. birdiae* para 15 dias. Em projeto associado a este artigo (disponível em www.thresholds-eu.org), os mesmos autores ainda relatam o valor de IC_{50} de BaP para *Scenedesmus vacuolatus* exposta por 24h em 1,77 ng/mL. Trabalho de OKAY *et al*. (2002) apresenta valor de IC_{50} para *Phaeodactylum tricornutum* (fitoplâncton) igual ao encontrado para *G. birdiae*, porém considerando exposição aguda a pireno.

A maior parte da informação disponível sobre contaminação por petróleo a macroalgas envolve pouca ecotoxicologia. STEPANYIAN (2008) demonstra redução das TC em concentrações de óleos (mistura) que vão de 5 a 30 µg/mL. Outros artigos mostram que desastres envolvendo petroleiros, cargueiros, e derramamentos oriundos de guerras, que são situações nas quais as concentrações dos componentes do petróleo também tornam-se elevadas, podem surtir pequenos impactos sobre a distribuição, a abundância, a riqueza e a produtividade de espécies de macroalgas. Em alguns casos, os impactos destes desastres sobre a fauna e a flora podem até ser revertidos em curto a médio prazos (KENWORTHY *et al*., 1993; EDGARA e BARRETT, 2000; TERUHISA *et al*., 2003; VILLARES *et al*., 2007; LOBON *et al*., 2008).

Com relação à razoável resistência apresentada por *G. birdiae* frente a BaP, esta não parece ter sido uma observação isolada. SVERDRUP *et al*. (2007) relata a considerável insenbilidade de 3 espécies de plantas terrestres, 1 espécie de verme e 1 espécie de bactéria nitrificadora frente a BaP.

5.2 Comportamento das Defesas Antioxidantes

5.2.1 Glutationa

As **Figuras 11**, **12**, **13** e **14** apresentam uma característica em comum. Em todas elas é possível observar que as concentrações de GSH e de GSSG em amostras controle e em amostras expostas ao HPA foram diferentes estatisticamente; esse fato indica que o poluente pode ter sido absorvido pela alga e ainda provocado a formação de ERO ao ser metabolizado por enzimas da fase I dos sistemas de biotransformação.

De maneira geral, a concentração de ambos os biomarcadores diminuiu nas amostras expostas a BaP, independentemente da concentração do poluente e do tempo de exposição. A única exceção foi aquela observada em amostras expostas a 100 ng/mL de BaP por 96h (**Fig. 11**): houve aumento na concentração de GSSG em relação àquilo que fora observado para os controles.

Dessa forma, pode-se perceber que GSH e GSSG caracterizaram-se como biomarcadores bastante sensíveis à presença do HPA; desempenharam alguma função celular logo que o poluente foi absorvido pelas células da macroalga, mesmo em situações nas quais as concentrações de BaP nos meios de cultura foram mais baixas. Assim que o HPA é absorvido pela alga, são dois os mecanismos mais prováveis de manifestação da sua toxicidade: 1) geração de ERO em caso de sofrer biotransformação; e 2) biotransformação de BaP a BaPDE (molécula bastante reativa).

GSH poderia desempenhar papel protetor atuando sobre as duas vias: em 1, poderia participar como espécie doadora de elétrons às EROs, tornando-as estáveis. Nesse caso,

ocorreria formação do dímero GSSG. Ainda, caso ascorbato também estivesse participando como antioxidante frente ao desbalanço oxidativo gerado por BaP, GSH poderia ser consumida no ciclo ascorbato-GSH, permitindo a regeneração de ascorbato reduzido (PINTO *et al*., 2003). Em 2, GSH poderia ser consumida por GST na fase II dos processos de biotransformação (nessa reação, GSH seria conjugada com BaP).

SZALAI *et al*. (2009) considera uma gama ainda maior de papéis que poderiam ser desempenhados por GSH: além do controle direto e indireto da concentração de ERO, participa da degradação de H_2O_2 em reação catalisada por GPx, participa da regulação do ciclo celular, da expressão gênica, e da atividade de enzimas devido aos seus efeitos sobre o estado redox celular, dentre outros.

Quanto ao dímero GSSG, amostras expostas ao HPA apresentaram menor concentração em relação às amostras controle após as exposições de: 24h; e as 2 exposições de 15 dias (IC_{50} preliminar; e IC_{50}); porém apresentaram maior concentração de GSSG após exposição de 96h a 100 ng/mL de BaP.

Este último resultado pode sugerir que entre 24 e 96h de exposição GSH esteja sendo consumida preferencialmente como espécie doadora de elétrons, e menos pelo processo de conjugação. No entanto, entre 96h e 15 dias a concentração dos dímeros GSSG diminui, provavelmente devido a um aumento de atividade de glutationa redutase (forma GSH a partir de GSSG). Essa reciclagem de GSH contribuiria para o restabelecimento dos valores normais do IR.

A **Figura 32** permite visualizar melhor o que ocorreu com as concentrações de GSH e GSSG nas diferentes situações de exposição nas quais os biomarcadores foram quantificados. As curvas pretas contínuas, que representam os controles, permaneceram quase sempre acima das curvas pontilhadas, que representam as amostras expostas a BaP, demonstrando

graficamente a maior concentração dos biomarcadores nas algas que não depararam-se com o HPA.

A **Tabela 4** (ítem 4.3.1) apresenta os valores obtidos para o IR de algas controle e algas expostas a BaP. Por mais que exista uma variação entre os valores obtidos, principalmente dentre os IR de amostras expostas a BaP (chegam a variar no máximo 27 %), no geral os valores foram parecidos. Neste sentido, parece haver uma "programação comportamental bioquímica" determinando um deslocamento da equação 2 GSH → GSSG + 2 H^+ para a esquerda. Assim, pequenas variações na proporção "normal" entre as formas de glutationa desencadeariam os mecanismos bioquímicos necessários para o restabelecimento da mesma.

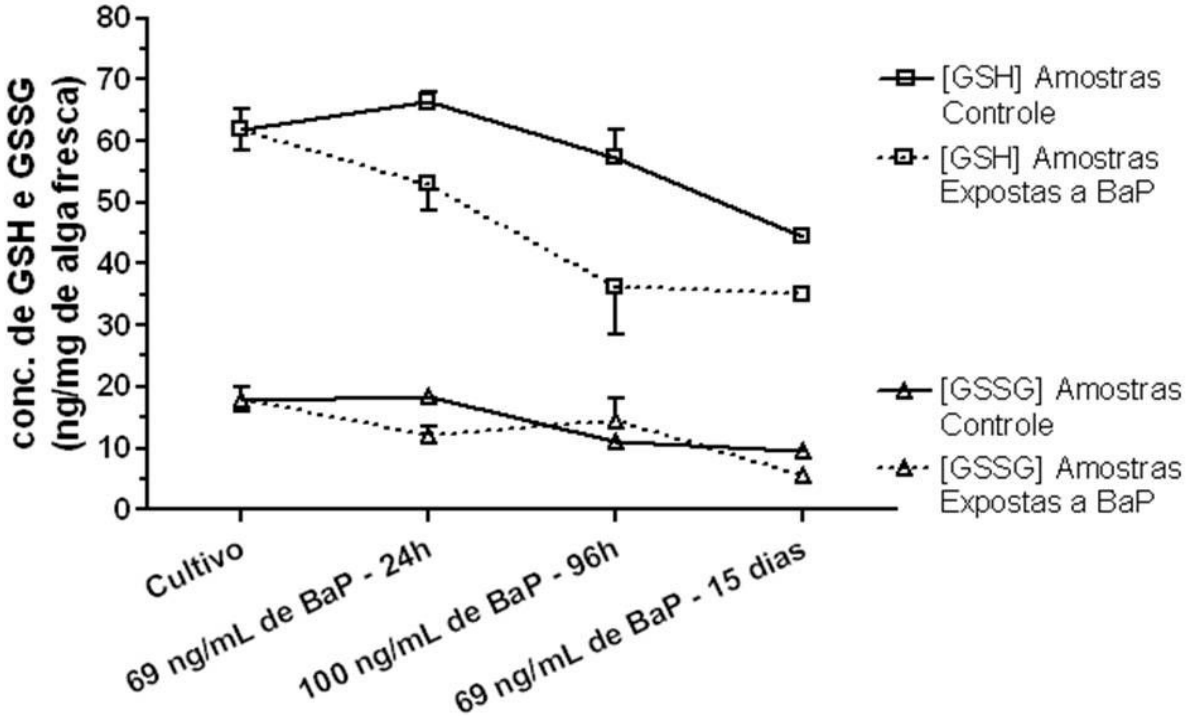


Figura 32. As curvas relacionam concentrações de GSH e GSSG obtidas após o término de diferentes tratamentos (independentes) aos quais as algas foram submetidas. Concentrações de GSH e GSSG das amostras provenientes do cultivo não são diferentes das amostras controle. As barras de erros correspondem a desvios padrão (n = 3).

Em todos os experimentos realizados para quantificar as duas formas de glutationa, as amostras de *G. birdiae* expostas ao HPA apresentaram valores inferiores para o denominador do IR, que é igual à soma: quantidade de GSSG (transformada para valores de quantidade de GSH) adicionada à quantidade de GSH. Isso provavelmente aconteceu porque a exposição a BaP provocou o consumo de GSH no sentido de formação de novas moléculas de GSSG e também do aduto composto por BaP biotransformado mais GSH (reação catalisada por GST). Esse desbalanço na proporção das formas de glutationa deve ter funcionado como sinal para a retomada da proporção "normal" existente entre estas espécies químicas em *G. birdiae*. Esse mecanismo pode acontecer por diversas vias bioquímicas.

Segundo SZALAI *et al*. (2009), o alto valor da razão GSH/GSSG encontrado em condições normais pode ser restaurado pela atividade de glutationa redutase, síntese aumentada de GSH, diminuição da degradação de GSH, ou pelo transporte de GSH e GSSG.

Até o momento não existem artigos que tenham investigado os níveis dos biomarcadores de estresse oxidativo GSH e GSSG em macroalgas expostas a BaP. As publicações que mencionam estes marcadores em micro e macroalgas estão relacionadas a outras situações de estresse, como metais, salinidade, radiação UV, peróxido de hidrogênio, epifitismo, biotoxinas (nodularina), ou simplesmente estudos envolvendo bioprospecção com o intuito de caracterização de produtos naturais de algas (RIJSTENBIL *et al*., 1998; AGUILERA *et al*., 2002; DUMMERMUTH *et al*., 2003; LU *et al*., 2006; PFLUGMACHER *et al*., 2007; ZUBIA *et al*., 2007; PAWLIK-SKOWRONSKA *et al*., 2007; outros). Uma outra dificuldade encontrada para realizar a comparação dos dados com a literatura foi o fato de existir uma grande variedade de técnicas e formas de apresentação dos resultados.

No artigo de LEI *et al*. (2006) averiguou-se as respostas antioxidantes de 4 espécies de microalgas de água doce diante da exposição a pireno, um HPA constituído de 4 anéis benzênicos justapostos, ou seja, com uma estrutura química muito semelhante à de BaP. As

espécies *Chlorella vulgaris*, *Selenastrum capricornutum*, *Scenedesmus platydiscus* e *Scenedesmus quadricauda* foram expostas a 0,1 e 1 µg/mL de pireno por 7 dias. Foi possível perceber que a resposta à presença do xenobiótico foi espécie-específica. O conteúdo de GSH variou em função da concentração de pireno no meio, com o tempo de incubação, e de acordo com a espécie testada. Pireno em concentração de 0,1 µg/mL não foi suficiente para alterar o conteúdo de GSH de nenhuma das espécies. Porém, 1 µg/mL de pireno aumentou o conteúdo de GSH em *S. capricornutum* após 4 dias (em 7 dias foi igual ao início da exposição) e provocou aumento em *S. platydiscus* e *S. quadricauda* após 7 dias de exposição. A espécie *Chlorella vulgaris* mostrou-se incapaz de metabolizar o poluente: pireno não alterou sua concentração de GSH e nem de GST. Os aumentos de conteúdo de GSH em *S. capricornutum* e *S. platydiscus* foram acompanhados por aumentos de atividade de GST, o que as caracterizou como espécies metabolizadoras de pireno. *S. quadricauda* apresentou-se sensível ao HPA uma vez que sua GST sofreu inibição.

Com relação aos valores das concentrações de GSH e de GSSG encontrados nos estudos envolvendo *G. birdiae*, pode-se perceber uma grande semelhança com aqueles reportados por AGRAWAL (1992) e AGRAWAL *et al*. (1992), que também normalizaram as concentrações das formas de glutationa por peso fresco de alga.

No artigo de AGRAWAL (1992) foram observados efeitos decorrentes da exposição da microalga verde *Chlorococcum infusionum* e *Chlorogonium elongatum* a UV-B por 6h. As amostras controle destas espécies (não expostas a UV-B) apresentaram níveis de concentração constantes para GSH e GSSG durante todo o tempo de exposição: respectivamente, 20 e 10 ng/mg de alga fresca. Com a incidência de UV-B, as duas espécies apresentaram aumento de GSH e de GSSG. Interessante notar que os picos de GSH, em 65 ng/mg de alga fresca para *C. elongatum* e em 80 ng/mg para *C. infusionum*, aconteceram respectivamente após 2 e 4h do início da exposição, mesmo fenômeno que pode ser observado para concentração de GSSG de

G. birdiae em 96h de exposição a BaP em concentração de 100 ng/mL. Ainda, mesmo após o estresse gerado por radiação UV-B, os valores do IR para as duas espécies oscilaram entre 70,8 e 73,2 %, comportamento parecido com aquele visto em *G. birdiae*.

Em AGRAWAL *et al*. (1992) realizou-se exposição da microalga *C. elongatum* a 5 e 10 µg/mL de Hg^+ por 6h. Foi possível observar uma relação de dose-dependência entre Hg^+ nos meios de cultura das algas e as formas de glutationa: quanto mais mercúrio, maior a concentração de GSH e GSSG. Os níveis de GSH e de GSSG das amostras expostas a 10 µg/mL de Hg^+ chegaram a aumentar, respectivamente, 350 e 480 % quando comparados aos níveis das algas controle; estas últimas apresentaram, respectivamente, concentração de 18,23 e 7,14 ng/mg de alga fresca de GSH e de GSSG.

Nos dois artigos os autores atribuem os aumentos observados a fenômenos encadeados: o estresse provoca formação de ERO; ocorre consumo do antioxidante GSH e consequente formação de GSSG; essa oxidação dispara os mecanismos que levam à nova síntese de GSH.

Porém, diminuições das concentrações de GSH e GSSG também podem ocorrer em organismos estressados. SIGAUD-KUTNER *et al*. (2005) mostrou que o dinoflagelado *Lingulodinium polyedrum* apresentou diminuição nos níveis das duas formas de glutationa durante crescimento de 21 dias em sistemas fechados de larga escala. Apesar do estresse, as algas apresentaram aumento do valor do IR com o passar dos dias, ou seja, as células foram capazes de manter um potencial redox crescente.

Parte da resistência de algas a estresses abióticos parece estar relacionada a altos valores de IR, ou seja, contextos biológicos caracterizados por altos valores da razão GSH/GSSG.

5.2.2 SOD

A observação da **Figura 15** permite perceber que SOD não se mostrou sensível à presença do HPA. Apenas em concentrações altas, entre 10 e 20 µg/mL de BaP, nas quais inclusive parte do poluente adicionado não solubilizou (**Fig. 20**), foi que a enzima de algas testes apresentou tendência de diminuição da atividade em relação às amostras controle. Nestas circunstâncias a alga já havia perdido seus pigmentos, isto é, já havia apresentado um sintoma sistêmico grave, que indicava a ocorrência de algo errado. Esse comportamento apresentado pela SOD de *G. birdiae* não permite caracterizá-la como um biomarcador sensível frente ao poluente estudado. A enzima não foi capaz de informar de maneira precoce sobre a presença e a toxicidade de BaP nos meios de cultura das algas. Ainda, este resultado pode sugerir que o poluente não foi capaz de induzir o aumento na geração de $^{\bullet-}O_2$.

Por outro lado, se BaP foi absorvido pelas células da alga, que é o que parece ter acontecido, e se a oxigenase CYP450 metabolizou BaP na fase I do processo de biotransformação (o que não pode ser concluído a partir dos experimentos realizados), é possível que tenha ocorrido aumento na geração de ERO.

Neste caso, a diminuição da concentração de GSH em amostras expostas ao HPA pode ser uma explicação possível para a falta de sensibilidade de SOD. Talvez a reação de parte das moléculas de GSH com $^{\bullet-}O_2$ tenha sido suficiente para manter a homeostase do radical.

Diferentemente do que fora visto para *G. birdiae*, em alguns organismos a enzima SOD está envolvida nos mecanismos de defesa frente a BaP. YANG *et al*. (2009) mostra que ratos expostos a BaP tiveram maior geração de ERO. Dentre estes, aqueles que tiveram suas CuZnSOD e CAT super-expressas reduziram os níveis de $^{\bullet-}O_2$ e de H_2O_2 produzidos durante a biotransformação de BaP, e consequentemente inibiram a aterosclerose acelerada pelo HPA. NAHRGANG *et al*. (2009) relata, em peixe, aumento do nível de expressão do gene de CuZnSOD em vinte vezes após 16h do início da exposição a BaP. AN *et al*. (2008)

demonstrou, em peixe, aumento dos níveis de expressão dos genes de SOD durante exposição a BaP 30 µg/mL em 6, 12 e 24h. COLLÉN *et al*. (2003), em estudo envolvendo a macroalga *Gracilaria tenuistipitata*, investigou os efeitos oriundos da exposição aguda aos metais Cu^{2+} e Cd^{2+}. A atividade de SOD aumentou após exposição a 0,2 µg/mL de Cu^{2+} e apresentou uma tendência de aumento após a exposição a 1 µg/mL de Cd^{2+}. ASKMANN e TUKAJ (2004) expuseram a microalga *Scenedesmus armatus*, por 24h, a dois HPAs compostos por 3 anéis aromáticos: antraceno e fenantreno. Em situações específicas, ambos os HPAs foram capazes de estimular a atividade de SOD da alga.

Por outro lado, MONARI *et al*. (2007) demonstrou que bivalves expostos a 440 ng/mL de BaP por 36h não apresentaram aumento de atividade e nem aumento na quantidade de CuZnSOD presente nas glândulas digestivas em relação a bivalves não expostos. Quanto a MnSOD, um leve aumento de atividade pode ser observado em 36h de exposição a BaP.

Ainda, MONARI *et al*. (2009) demonstrou diminuição dos níveis de expressão e atividade de MnSOD e diminuição da expressão de ECSOD (SOD extra-celular) e CuZnSOD em bivalves expostos a 500 ng/mL de BaP por 12 dias. A atividade enzimática de CuZnSOD permaneceu inalterada entre amostras controle e expostas a BaP durante todo o período de experimentação. MONARI sugere que a toxicidade de BaP pode reduzir a capacidade sequestradora de oxiradicais de algumas células de organismos expostos ao poluente. Nesses casos, o excesso de ERO produzidas pela biotransformação de BaP fatalmente recairíam sobre alguns sistemas celulares e isso poderia explicar o decaimento de GSH nas amostras de *G. birdiae* expostas a BaP.

LEI *et al*. (2006) expôs as microalgas de água doce *Chlorella vulgaris*, *Selenastrum capricornutum*, *Scenedesmus platydiscus* e *Scenedesmus quadricauda* a 0,1 e 1 µg/mL de pireno por 7 dias. Os ensaios de atividade enzimática de SOD foram realizados com amostras controle e amostras expostas ao poluente após 4 e 7 dias do início da exposição. O tratamento

com pireno não demonstrou ter qualquer efeito significativo sobre a atividade de SOD das 4 microalgas, com apenas 2 exceções para exposições a 1 ug/mL de BaP: uma tendência inibitória sobre a atividade de SOD de *C. vulgaris* após 7 dias de exposição; e um pequeno aumento em *S. platydiscus* após 4 dias.

Com relação aos valores de atividade de SOD disponíveis para algas expostas a diferentes fatores de estresse, foi possível perceber que eles podem variar aproximadamente até 2 ordens de grandeza. EL-BAKY *et al*. (2009) expôs a microalga *Spirulina platensis* (habita água doce e marinha) a diferentes concentrações de H_2O_2. A atividade de SOD da alga chegou a variar de 6,22 a 35,62 U/mg de proteína. LEI *et al*. (2006) expôs 4 microalgas de água doce a duas concentrações distintas de pireno. As atividades das SOD dessas microalgas variou, aproximadamente, entre 40 e 65 U/mg de proteína. COLLÉN *et al*. (2003) expôs a macroalga vermelha marinha *G. tenuistipitata* aos metais Cu^{2+} e Cd^{2+}. A atividade de SOD nestas situações apresentou valores que variaram aproximadamente entre 220 e 500 U/mg de proteína.

Em *G. birdiae* foi possível perceber uma variação de atividade de SOD entre 10 e 80 U/mg de proteína, variação que fica compreendida no intervalo de atividades visto para algas em geral. SOD de *G. birdiae* apresentou um comportamento mais semelhante ao apresentado por SOD microalgais do que aquele apresentado por SOD de *G. tenuistipitata*.

Resumindo aquilo que fora discutido neste tópico, SOD não parece apresentar uma resposta única relacionada à presença e à toxicidade de compostos da classe dos HPA, como BaP. As atividades de SOD parecem variar de maneira diferente em organismos distintos durante exposições a compostos quimicamente semelhantes. Essa constatação faz dela uma enzima com comportamento de certa maneira imprevisível, ou seja, um biomarcador de difícil caracterização.

5.3 Toxicidade de BaP sobre a fotossíntese de *G. birdiae*

Diferentemente da sensibilidade apresentada pelo crescimento e pelos peptídeos de baixo peso molecular GSH e GSSG, a fotossíntese de *G. birdiae*, enquanto potencial sistema bioquímico biomarcador da exposição a BaP, assemelhou-se mais às características da enzima SOD. Assim como o antioxidante enzimático, a fotossíntese da alga apenas variou quando esta foi exposta a concentrações mais elevadas do poluente.

As curvas PI apresentadas nas **Figuras 17**, **18** e **19**, assim como as variáveis fotossintéticas que constam nas **Tabelas 5** a **8**, são representativas da baixa interferência do HPA sobre a fotossíntese da macroalga. As 3 situações de exposição apresentadas pelas **Figuras** foram, respectivamente, 375 ng/mL de BaP por 15 dias, 69 ng/mL de BaP também por 15 dias (IC_{50}), e 69 ng/mL de BaP por 24h. Nessas condições crônicas e agudas de exposição da alga a BaP, os valores das variáveis fotossintéticas P_{max}, RQE, I_k, α e β, apresentados nas **Tabelas**, não foram diferentes.

Até mesmo quando a concentração de exposição da alga ao poluente foi de 10 µg/mL, a alga ainda assim apresentou um funcionamento "normal" de sua fotossíntese, o que pode ser mostrado pelas curvas PI da **Figura 21** e pelos valores para as variáveis fotossintéticas que constam nas **Tabelas 9** e **10**. No entanto, um pequeno incremento de BaP ao meio algal já contendo o poluente causou sérios danos à alga na medida em que provocou sua despigmentação generalizada, mostrada na **Figura 20**. A duplicação da concentração de BaP de 10 para 20 µg/mL foi bastante agressiva às características fotossintéticas da alga, o que pode ser notado a partir da observação das curvas PI da **Figura 22** e da **Tabela 11**. Como resultado numérico desta toxicidade pode-se destacar o grau de mudança dos valores das variáveis P_{max}, I_k, RQE e β. As duas 1as tiveram uma redução de 20 vezes; RQE diminuiu 35 vezes, enquanto β aumentou 125.000 vezes. A **Figura 23** explicita graficamente a variação apresentada pelas variáveis fotossintéticas P_{max}, I_k e β ao longo dos 7 dias. No 7º dia fica evidente a discrepância apresentada pelos valores das variáveis.

Uma redução de 20 vezes da P_{max} pode ser entendida como uma diminuição de 20 vezes no fluxo de elétrons que ocorre entre o PSII e o PSI, fluxo este que é necessário à formação de ATP e NADPH. Esses dois compostos são consumidos na etapa das reações de carboxilação da fotossíntese, durante a qual ocorre formação de glicose. Nesse sentido, pode-se dizer que a velocidade de formação de compostos orgânicos de alta energia da fotossíntese ficou bastante prejudicada. A redução de 35 vezes no valor do RQE é um dado bastante informativo à respeito da toxicidade de BaP sobre a fotossíntese da macroalga. O RQE, parâmetro fotossintético mais utilizado, mede a proporção entre a energia efetivamente utilizada na via fotossintética em relação ao total de luz absorvida pelas clorofilas associadas ao PSII. Com relação ao I_k, um abaixamento de até 20 vezes em relação ao seu valor normal, que oscilou entre 57 e 105 µmol de fótons.m^{-2}.s^{-1}, significa que a quantidade de energia luminosa que provocava a saturação do fluxo de elétrons ($rETR_{max}$) da fotossíntese da alga passou a ficar em torno de 5 µmol de fótons.m^{-2}.s^{-1} após exposição a altas concentrações do HPA. Caso este abaixamento do I_k não estivesse acompanhado de um concomitante abaixamento de P_{max}, até podería-se atribuir um efeito positivo do HPA sobre a fotossíntese da alga; porém, não foi o que aconteceu. O incremento de 125.000 vezes sobre os valores da variável β após a exposição de 7 dias a 20 µg/mL de BaP pode ser entendido como o mesmo que não ter havido fotoinibição sobre a fotossíntese da alga até o momento que antecedeu tal exposição. A **Figura 23** permite visualizar bem esta idéia: no 7º dia, os valores de β, que vinham beirando o valor zero, passam a apresentar valor 1,2 nas amostras expostas a BaP.

STEPANIYAN (2008) investigou os efeitos da adição de óleo cru a 5 espécies de macroalgas marinhas, sendo 3 delas algas marrons (*Laminaria saccharina*, *Fucus vesiculosus* e *Ascophyllum nodosum*) e 2 algas vermelhas (*Porphyra umbilicalis* e *Palmaria palmata*). As exposições, que duraram 10 dias, foram feitas a concentrações de óleo de 5, 10, 20 e 30 µg/mL. Para todas as espécies, com exceção de *A. nodosum*, foi possível perceber um

decréscimo da fotossíntese relacionado ao incremento de óleo absorvido pelos organismos. Em concentrações de óleo acima dos 10 µg/mL foi possível perceber supressão da fotossíntese em *P. umbilicalis* e *P. palmata* ao final dos 10 dias de exposição. Ainda, o decréscimo do desempenho fotossintético destas 5 espécies foi acompanhado de mudança na coloração dos talos (mesmo fenômeno que fora observado para *G. birdiae*) e, em alguns casos, até deformação. STEPANIYAN (2008) explica a toxicidade dos hidrocarbonetos absorvidos por meio de sua capacidade em destruir a membrana plasmática, causando distúrbio ao balanço de íons, o que reduz a pressão intracelular, ocasionando decréscimo na quantidade de ficoeritrinas e clorofilas.

O fenômeno da despigmentação foi também reportado por KUMMEROVÁ *et al*. (2006b) após expor *Pisum sativum* (ervilha) ao HPA fluoranteno em concentrações de 0,01 e 1 µg/mL por 18 e 25 dias. A concentração maior do HPA provocou redução do valor do RQE de *Pisum sativum* após 18 dias de exposição. Os autores do trabalho sugerem que a exposição ao HPA pode ter provocado fosforilação de proteínas envolvidas na captação de energia luminosa, diminuindo a eficiência de transferência desta energia aos fotossistemas, o que termina por diminuir a rETR entre PSII e PSI. Ainda, como HPA e seus produtos de transformação apresentam semelhanças estruturais com alguns herbicidas, eles podem afetar o fluxo de elétrons entre fotossistemas de maneira similar a estes últimos: causando danos ao 1º doador de elétrons entre PSII e PSI, a tirosina Z.

KUMMEROVÁ *et al*. (2006a) também demonstra diminuição do RQE de algas em simbiose com fungos (líquens) após exposição a fluoranteno no intervalo de concentração de 1 a 5 µg/mL.

BOPP e LETTIERI (2007) estudaram a regulação gênica na diatomácea marinha *Thalassiosira pseudonana* após exposição de 24h aos HPA pireno, fluoranteno e BaP. Os intervalos de concentrações utilizados para os HPA foram os seguintes: 2,5 a 500 ng/mL de

pireno; 3 a 3000 ng/mL de fenantreno; 0,05 a 328 ng/mL de BaP. Os genes *3HfcpA* e *3HfcpB*, cuja tradução resulta na formação de proteínas de membrana que ficam associadas a pigmentos fotoprotetores constituintes dos fotossistemas, apresentaram tendência de inibição de expressão, o que pode ser um indicador de atividade fotossintética reduzida.

MARWOOD *et al*. (1999), investigou a foto-toxicidade do HPA antraceno sobre a fotossíntese de fitoplâncton. Primeiramente, as células foram deixadas absorvendo o poluente em ambiente escuro. Logo em seguida, deixou-se que ficassem em ambiente iluminado por 1h. Organismos expostos a 0,2 e 1 µg/mL de antraceno apresentaram, após o período de iluminação, redução significativa dos seus valores de P_{max} em relação a algas que absorveram o HPA e não foram iluminadas. Os autores comentam que antraceno foi capaz de aumentar a foto-sensibilidade de organimos ao ser foto-oxidado a outros subprodutos tóxicos. Segundo os autores, para exibir sua toxicidade antraceno precisou de luz, situação que é consistente com a produção de radicais.

Com relação a alguns valores já relatados na literatura científca para as variáveis fotossintéticas de macroalgas, pode-se destacar os trabalhos de YOKOYA *et al*. (2007) e BAUTISTA e NECCHI (2007), que quantificaram a fotossíntese de Rhodophyta por meio da fluorescência da clorofila *a*. Nos dois trabalhos, as macroalgas vermelhas estudadas foram *Hypnea musciformis*, *Audouinella eugenea*, *Audouinella hermannii* e *Compsopogon coeruleus*. O intervalo de valores encontrados para as variáveis são os que seguem: P_{max} (rETR): 10,3 a 50,1; RQE (adimensional): 0,17 a 0,64; I_k ($\mu mol.m^{-2}.s^{-1}$): 45,8 a 173,5 ($\mu mol.m^{-2}.s^{-1}$); alfa: 0,05 a 0,29 (rETR); beta: 0,01 a 0,22 (rETR). Pode-se perceber que todos os valores encontrados para as variáveis de *G. birdiae* enquadram-se nestes intervalos apresentados, com exceção dos dados apresentados na **Tabela 11**, coluna "20 µg/mL de BaP". Neste sentido, essa comparação pode ser elucidativa quanto à toxicidade de BaP sobre a

fotossíntese da macroalga uma vez que a exposição ao HPA em altas concentrações, por 7 dias, foi capaz de transformar seu desempenho fotossintético a valores mais extremados.

5.4 Análise de BaP nos meios de cultura da alga

O método analítico desenvolvido para analisar BaP nos meio de cultura de *G. birdiae* mostrou-se reprodutível e sensível. Além disso, por utilizar detecção por fluorescência, tornou-se uma estratégia mais seletiva quando comparada à utilização de detector baseado simplesmente na absortividade molecular.

Inicialmente, a observação do cromatograma apresentado na **Figura 24** criou uma expectativa de que talvez o pico com tempo de eluição em 18,6 min. fosse resultante de alguma biotransformação realizada pela macroalga sobre BaP. Porém, como já fora apontado no ítem 4.5, o fato deste pico ter apresentado tempo de eluição maior que o de BaP e também por ele ter surgido em amostras controle (sem alga), tornou improvável esta suspeita. Eventos de biotransformação necessariamente envolvem o aumento do caráter polar de HPA. O trabalho de WARSHAWSKY *et al*. (1995) permite uma visualização cromatográfica característica de fenômenos biotransformadores sobre HPA. Neste trabalho os autores investigaram a biotransformação realizada por algumas espécies de algas sobre BaP. Todos os produtos de metabolização de BaP produzidos pelas algas (dihidrodióis e quinonas) apresentaram tempo de retenção inferior a BaP utilizando-se coluna cromatográfica C18.

Ainda, antes de realizar a análise dos subprodutos biotransformados presentes nos meios de cultura das algas, WARSHAWSKY *et al*. (1995) realizou LLE, com posterior secagem dos solventes utilizados na extração, seguido de ressuspensão em fase orgânica apropriada para realizar a injeção em HPLC. Apenas dessa maneira foi possível evitar a falta de homogeneidade natural da matriz aquosa marinha sobre os resultados de quantificação.

Durante o desenvolvimento do projeto realizou-se algumas tentativas de padronização de procedimentos de extração em fase sólida e extração líquido-líquido. Esses procedimentos

de extração de BaP a partir de amostras aquosas marinhas não apresentaram rendimento satisfatório, não passando dos 30 % de recuperação (dados não apresentados).

CAVALCANTE *et al*. (2007) testou a recuperação de HPA a partir de amostras aquosas marinhas por meio das mesmas técnicas de extração utilizadas neste projeto: SPE e LLE. Os autores mostram rendimentos satisfatórios apresentados por ambas as técnicas: após análise em sistema cromatográfico gasoso acoplado a detector de ionização por chama, pode-se observar uma recuperação de BaP em torno de 71 e 62 % para SPE e LLE, respectivamente.

Quanto à SPE, provavelmente as diferenças de eficiência observadas entre o presente estudo e o de CAVALCANTE *et al*. (2007) devam estar relacionadas à utilização de solventes orgânicos diferentes para a eluição de BaP da matriz apolar das colunas. No artigo, é mostrado que ACN, solvente utilizado por nós, teve menor capacidade de arrastar BaP das colunas de extração quando comparada a outros solventes com polaridades mais baixas.

Ao mesmo tempo, a falta de domínio das metodologias de extração química por parte do experimentador associada ao surgimento de outras prioridades durante o desenvolvimento do projeto, fizeram com que essas experimentações fossem deixadas para ser elucidadas em um outro momento.

A habilidade de metabolizar HPA e BaP foi descrita para alguns animais, fungos e bactérias; alguns estudos caracterizando essa capacidade em algas também foram realizados (WARSHAWSKY *et al*., 1995; JUHASZ e NAIDU, 2000; WARSHAWSKY *et al*., 2007; BOPP e LETTLERI, 2007).

Organismos com baixo valor para a razão área/volume possuem uma capacidade diminuída para absorver compostos do meio quando comparados com aqueles organismos com baixo valor para a razão (LIGNELL e PEDERSEN, 1989). Neste sentido, essa morfologia ótima para absorção está mais para micro do que para macroalgas (*i.e.*,

Gracilarias). Os dados preliminares a respeito da biotransformação realizada por *G. birdiae* sobre BaP indicam que a alga não apresenta tal capacidade ou ela é muito reduzida: não houve abaixamento da altura do pico de BaP em cromatogramas obtidos de injeções de amostras coletadas dos meios algais em dias consecutivos de exposição da alga ao HPA; também não foi possível detectar o surgimento de nenhuma nova molécula com os perfis de fluorescência semelhantes ao de BaP. Ainda, como utilizou-se detector de absortividade (DAD) junto com a detecção por FL, pode-se dizer com maior sustentação que provavelmente nenhum composto novo foi formado.

Esses casos já reportados na literatura só servem de estímulo para tentarmos elucidar o papel desempenhado por espécies de algas endêmicas da costa brasileira enquanto remediadoras de poluição que contaminam esse vasto litoral. Com o método analítico já desenvolvido e com base nas experiências adquiridas durante as tentativas de se realizar as quantificações do poluente nos meios de cultura da alga, sentimo-nos interessados em tentar averiguar com maior precisão o papel biotransformador desempenhado por *G. birdiae* e outras espécies de algas disponíveis no laboratório.

Os mesmos problemas apontados para garantir a caracterização biotransformadora da alga também atrapalharam na determinação da solubilidade de BaP nas diferentes concentrações de exposição às quais as algas foram submetidas no decorrer do projeto.

TURNER e RAWLING (2002) comentam que a solubilidade de BaP em água do mar é inferior àquela observada em água doce, uma vez que esta última não sofre os efeitos de agregação de partículas induzido pela alta concentração de solutos (*i.e.* sal). Segundo FERNANDEZ *et al*. (2006), a solubilidade de BaP em água do mar está em torno de 4 ng/mL. BOPP e LETTLERI (2007) comenta que a solubilidade de HPA pode variar entre ng/L a ng/mL dependendo do grau de contaminação dos corpos d'água avaliados. FENG *et al*.

(2007) relata que os níveis de BaP encontrados nas águas do Rio YangTze (China) variaram entre 0,214 e 0,279 ng/mL.

Porém, a somatória da fração solúvel de vários HPA contaminando ao mesmo tempo um determinado corpo hídrico pode atingir valores maiores. O artigo de FENG *et al*. (2007) reúne informação de vários trabalhos que realizaram quantificações em ambientes aquáticos nestas condições. Esses valores somados oscilaram entre 0,004 a 6,2 ng/mL para águas de rios. A concentração somada mais elevada foi encontrada para águas salobras de estuários, nas quais chegou-se a quantificar 27 ng de HPA por mL de água.

Como o K_{ow} de BaP é alto (6,06), existe uma forte tendência deste composto ficar adsorvido ao sedimento de ambientes aquáticos naturais. Essa insolubilidade os torna menos biodisponíveis, isto é, menos passíveis de sofrer decomposição, o que termina por caracterizá-los como moléculas ambientalmente mais persistentes. FENG *et al*. (2007) relata que os níveis de BaP encontrados nos sedimentos do Rio YangTze e afluentes variou entre 50 e 94 µg/kg. GEYER *et al*. (1981) sustenta correlação inversa entre bioacumulação de compostos orgânicos e solubilidade em água em estudo envolvendo a microalga *Chlorella fusca*.

Mesmo assim, não são poucos trabalhos que estudaram a toxicidade de BaP sobre micro e macroalgas em concentrações algumas ordens de grandeza acima da sua solubilidade (WARSHAWSKY *et al*., 1995; BOPP e LETTLERI, 2007; CHOY *et al*., 2007; STEPANIYAN, 2008). Se considerarmos exposições de outros organismos a BaP, esse número pode aumentar. FLIEDNER (1997) salienta a importância para a ecotoxicologia do estudo de substâncias pouco solúveis em água em concentrações acima da sua solubilidade. O autor defende tal idéia uma vez que a IC_{50} de alguns xenobióticos expressa-se, muitas vezes, acima das suas respectivas solubilidades. Ainda, MARWOOD *et al*. (1999) comenta que resultados obtidos a partir de períodos curtos de exposição a altas concentrações de poluentes, como apresentado no atual trabalho, podem ter características semelhantes àqueles oriundos

de períodos longos de exposição a baixas concentrações de xenobióticos, que são situações mais comuns em ambientes naturais.

Considerando-se o contexto do atual trabalho, que utilizou uma concentração final de 1 % de MeOH (v/v) nos meios de cultura da alga, é bem provável que este tenha amplificado razoavelmente o limite de solubilidade de BaP em água do mar. O fato de as TC de *G. birdiae* terem diminuído gradativamente conforme aumentou-se a concentração de BaP nos meios algais no intervalo 0 a 2000 ng/mL é uma evidência que sustenta essa suposição. WOLFE *et al*. (1998) comenta sobre o aumento da biodisponibilidade, da absorção e da transferência trófica (biomagnificação) de hidrocarbonetos presentes no petróleo em ambientes aquáticos por meio da adição de diferentes dispersantes.

Ainda, quando fala-se em toxicidade de xenobióticos em ambiente aquático, a fração reconhecidamente tóxica é a fração solúvel, enquanto a fração precipitada não recebe tal atribuição. No entanto, foi possível perceber durante o desenvolvimento do projeto que o incremento da fração precipitada em réplicas biológicas expostas a concentrações de µg/mL de BaP foi capaz de provocar danos mais severos à macroalga *G. birdiae*; talvez a fração insolúvel não seja apenas um precipitado inerte.

5.5 Biologia molecular de *G. birdiae*

5.5.1 Confirmação do par de iniciadores para actina

Os resultados de amplificação de DNA obtidos a partir das reações de PCR apresentados nas **Figuras 25**, **26** e **27** foram esclarecedores no sentido de caracterizar a eficácia dos pares de iniciadores testados. Foram testadas situações de baixa (**Fig. 25** foto de baixo) e alta (**Fig. 25**, foto de cima; e **Fig. 27**) estringência com o intuito de descobrir quais porções do DNA de *G. birdiae* eram passíveis de ser amplificadas.

Após a realização dos sequenciamentos e a revelação dos resultados negativos à respeito dos DNA amplificados, estávamos acreditando que os problemas dos experimentos

pudessem estar relacionados às degenerações dos iniciadores e/ou à qualidade do DNA algal extraído. Porém, com a obtenção da sequência de actina a partir do PCR realizado com os iniciadores desenhados para *G. tenuistipitata*, a suspeita sobre a qualidade do DNA extraído foi abandonada.

Dessa forma, provavelmente o grande problema para o sucesso na amplificação de outras porções do DNA algal tenham sido as degenerações. Iniciadores não degenerados contendo pelo menos 17 pares de bases costumam ser suficientes para ligarem de forma específica a apenas uma região do DNA. Porém, quando consideramos iniciadores com este comprimento contendo muitas degenerações (no caso deste trabalho, de 1 a 5; porém, a maioria continha 3 ou 4), pode acontecer de eles não reconhecerem qualquer região do DNA ou de ligarem de maneira inespecífica. Essas foram, respectivamente, as situações apresentadas para os PCR mostrados na **Figura 25**, foto de cima, e na **Figura 25,** foto de baixo. Na 1ª reação (**Fig. 25**, foto de cima), na qual as concentrações finais de Mg^{2+} foram baixas e a estringência alta, apenas houve amplificação de DNA de actina porque existia conservação entre os genomas de *G. birdiae* e de *G. tenuistipitata* e porque o par de iniciadores de actina não continha degenerações. Na 2ª reação (**Fig. 25** foto de baixo), para a qual as concentrações de Mg^{2+} foram aumentadas em 2 vezes e a estringência fora diminuída, houve amplificação de uma série de produtos inespecíficos. Provavelmente o que houve foram anelamentos inespecíficos dos pares de iniciadores (menos para ACT) aos braços dos plasmídeos bacterianos. Daí o alinhamento das sequências terem sido bons com porções de DNA bacteriano.

O alinhamento das sequências disponíveis para os diferentes genes alvos permitiu determinar alguns segmentos gênicos conservados com comprimento aproximado de 17 pb. Daí o tamanho escolhido para os iniciadores. Estas conservações, no entanto, possuíam diferenças pontuais, que correspondem exatamente às posições escolhidas para as

degenerações dos iniciadores. Assim, para cada segmento gênico conservado desenhou-se um único iniciador contendo várias degenerações. Porém, esta estratégia não mostrou-se uma boa opção. Talvez o mais apropriado tivesse sido desenhar pares de iniciadores diferentes contendo pouca ou nenhuma degeneração por segmento de DNA conservado, e apostar que pelo menos para uma das combinações de pares possíveis fosse possível amplificar produtos desejados. Poderiam-se utilizar as mesmas regiões conservadas como molde, uma vez que estas correspondiam às regiões com o maior grau de conservação.

A **Figura 28** apresenta a sequência de nucleotídeos de 93 pb obtida para actina e seu respectivo alinhamento com actinas de 3 outras espécies de Rhodophyta. Elas são muito semelhantes entre si. Após traduzir estas sequências de DNA de actina, procedeu-se o alinhamento das proteínas (**Fig 28**). O segmento protéico obtido possui 31 aminoácidos, dos quais apenas 1 não é conservado nas 4 algas vermelhas. Porém, esta substituição se dá entre aspartato e glutamato, dois aminoácidos polares ácidos, ou seja, provavelmente não mudam as características físico-químicas da actina madura.

5.5.2 Método analítico de quantificação de 8-oxodG

A sensibilidade do método analítico desenvolvido (**Fig. 29**) mostrou-se significativa. Comparando-se os valores do LOD e do LOQ obtidos neste trabalho com os revelados por CHURCHWELL *et al*. (2002), que também utilizou sistema LC/MS/MS para a análise de 8-oxodG, pode-se perceber que ambos possuem sensibidade aproximada. CHURCHWELL *et al*. (2002) chegou a detectar e quantificar 8-oxodG em quantidade abaixo de 1 pg de analito injetado junto à coluna cromatográfica, o que corresponde a encontrar 1 molécula de 8-oxodG/10^8 nucleosídeos. Nosso método foi capaz de detectar 1 molécula de 8-oxodG/10^8 nucleosídeos e quantificar 4 moléculas de 8-oxodG/10^8 nucleosídeos.

Este método mostrou-se tão ou mais sensível quando comparado a outros métodos largamente empregados em análises de 8-oxodG, tais como LC-ECD, ELISA, marcação radioativa.

De acordo com os dados preliminares sobre digestão do DNA apresentados na **Figura 31**, sentimo-nos estimulados em seguir adiante com as análisesde 8-oxodG uma vez que os problemas parecem estar razoavelmente cercados.

Se estivermos certos a respeito da falta de atividade da fosfatase, o que ocorreu foi que os fosfatos acabaram não sendo removidos dos nucleotídeos, que permaneceram como tais. Assim, o detector de massas, que estava configurado para analisar nucleosídeos, acabou não acusando nada.

Ainda, deve-se considerar a possibilidade da toxicidade de BaP sobre *G. birdiae* não estar associada à formação de 8-oxodG, mas a outros mecanismos.

6. Conclusões

A idéia deste projeto nasceu do sonho de se ampliar o entendimento a respeito do impacto que as atividades antropogênicas causam sobre o ambiente natural. Neste sentido, podemos enquadrar o conhecimento aqui gerado na categoria de ações que têm sido desenvolvidas com o intuito de preservar a natureza e a qualidade de vida dos seres vivos.

O trabalho apresentado, que investigou algumas características tóxicas do hidrocarboneto BaP, não deixa dúvidas quanto à sua capacidade tóxica sobre a macroalga vermelha *G. birdiae*. O HPA foi capaz de alterar o funcionamento normal de alguns sistemas biológicos da alga, tais quais: taxas de crescimento, concentração do antioxidante GSH e do dímero de glutationa GSSG, atividade de SOD, fotossíntese, e pigmentação. As sensibilidades apresentadas pelas taxas de crescimento da alga e por seus peptídeos de baixo peso molecular GSH e GSSG revelaram-se elevadas, enquanto a atividade da enzima antioxidante SOD, de seu desempenho fotossintético e sua pigmentação mostraram ser mais resistentes aos efeitos provocados pelo poluente orgânico; responderam à sua presença em concentrações mais altas.

Dependendo da situação ambiental averiguada, pode-se optar pela utilização de um ou de outro dentre os sistemas biológicos estudados para funcionarem como biomarcadores frente a BaP. A associação das informações biológicas da toxicidade de BaP obtidas a partir do uso destes biomarcadores, com a utilização concomitante de outros marcadores e técnicas, pode ser capaz de caracterizar a gravidade do impacto sofrido por uma área e preparar ações de manejo para a mesma.

O desenvolvimento do projeto também abriu novos caminhos a serem explorados. Já é possível saber que o par de iniciadores de actina apresentado no ítem 3.11 pode ser utilizado em experimentos de RT-PCR que utilizem actina como controle endógeno do nível de expressão de genes na macroalga *G. birdiae*. Ainda, por meio da utilização do método

analítico para detecção e quantificação de 8-oxodG em DNA será possível avaliar a intensidade de lesões oxidativas em ácidos nucléicos de algas e outros organismos expostos a BaP e outros tipos de estresse.

Para finalizar, faz-se interessante dar atenção à afirmação de EKLUND e KAUTSKY (2003) que diz que testes de toxicidade utilizando espécies de macroalgas devem ser desenvolvidos para diferentes regiões climáticas. Nesse sentido, a diversidade ficológica brasileira certamente serve de estímulo para continuarmos a investigar, uma vez que o universo biológico daqui ainda tem muito a ser explorado.

7. Referências Bibliográficas

IPCS, W. I. P. O. C. S. **Biomarkers and risk assessment: concepts and principles**. Geneva, 1993.

ABD EL-BAKY, H. H.; EL BAZ, F. K.; EL-BAROTY, G. S. Enhancement of antioxidant production in *Spirulina platensis* under oxidative stress. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 31, n. 3, p. 623-631, 2009.

AGRAWAL, S. B. Effects of supplemental UV-B radiation on photosynthetic pigment, protein and glutathione contents in green algae. **Environmental and Experimental Botany**, v. 32, n. 2, p. 137-143, 1992.

AGRAWAL, S. B.; AGRAWAL, M.; LEE, E. H.; KRAMER, G. F.; PILLAI, P. Changes in polyamine and glutathione contents of a green alga, *Chlorogonium elongatum* (Dang) France exposed to mercury. **Environmental and Experimental Botany**, v. 32, n. 2, p. 145-151, 1992.

AGUILERA, J.; DUMMERMUTH, A.; KARSTEN, U.; SCHRIEK, R.; WIENCKE, C. Enzymatic defences against photooxidative stress induced by ultraviolet radiation in Arctic marine macroalgae. **Polar Biology**, v. 25, n. 6, p. 432-441, 2002.

AKSMANN, A.; TUKAJ, Z. The effect of anthracene and phenanthrene on the growth, photosynthesis, and SOD activity of the green alga *Scenedesmus armatus* depends on the PAR irradiance and CO2 level. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 47, n. 2, p. 177-184, 2004.

ALTENBURGER, R.; WALTER, H.; GROTE, M. What contributes to the combined effect of a complex mixture? **Environmental Science & Technology**, v. 38, n. 23, p. 6353-6362, 2004.

ALTSCHUL, S. F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E. W.; LIPMAN, D. J. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, v. 215, n. 3, p. 403-410, 1990.

AN, K. W.; SHIN, H. S.; CHOI, C. Y. Physiological responses and expression of metallothionein (MT) and superoxide dismutase (SOD) rnRNAs in olive flounder, *Paralichthys olivaceus* exposed to benzo[a]pyrene. **Comparative Biochemistry and Physiology B-Biochemistry & Molecular Biology**, v. 149, n. 3, p. 534-539, 2008.

BAIRD, C. Produtos Orgânicos Tóxicos. In: BAIRD, C. (Ed.). **Química Ambiental**: Bookman: Porto Alegre, 2002. p.380-385.

BATARD, Y.; LERET, M.; SCHALK, M.; ROBINEAU, T.; DURST, F.; WERCK-REICHHART, D. Molecular cloning and functional expression in yeast of CYP76B1, a xenobiotic-inducible 7-ethoxycoumarin O-de-ethylase from *Helianthus tuberosus*. **Plant Journal**, v. 14, n. 1, p. 111-120, 1998.

BAUTISTA, A. I. N.; NECCHI, O. Photoacclimation in three species of freshwater red algae. **Braz. J. Plant Physiol.**, v. v. 19, n. n. 1, 2007.

BAYNE, B. L. *et al.* **The effects of stress and pollution on marine animals**. Nova Iorque, EUA.: Praeger Publishers, 1995.

BEBIANNO, M. J.; BARREIRA, L. A. Polycyclic aromatic hydrocarbons concentrations and biomarker responses in the clam *Ruditapes decussatus* transplanted in the Ria Formosa lagoon. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 72, n. 7, p. 1849-1860, 2009.

BELAND, F. A. *et al.* High-performance liquid chromatography electrospray ionization tandem mass spectrometry for the detection and quantitation of benzo[a]pyrene-DNA adducts. **Chemical Research in Toxicology**, v. 18, n. 8, p. 1306-1315, 2005.

BERNHARDT, R. Cytochromes P450 as versatile biocatalysts. **Journal of Biotechnology**, v. 124, n. 1, p. 128-145, 2006.

BLUM, H.; BEIER, H.; GROSS, H. J. Improved silver staining of plant-proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. **Electrophoresis**, v. 8, n. 2, p. 93-99, 1987.

BOLWELL, G. P.; BOZAK, K.; ZIMMERLIN, A. Plant cytochrome P450. **Phytochemistry**, v. **37**, p. 1491-1506, 1994.

BOPP, S. K.; LETTLERI, T. Gene regulation in the marine diatom *Thalassiosira pseudonana* upon exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). **Gene**, v. 396, n. 2, p. 293-302, 2007.

BRADFORD, M. M. Rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976.

BUCHELI, T. D.; FONT, K. Induction of cytochrome-P450 as a biomarker for environmental contamination in aquatic ecosystems. **Critical Reviews in Environmental Science and Technology**, v. 25, n. 3, p. 201-268, 1995.

BUICK, R. The antiquity of oxygenic photosynthesis - evidence from stromatolites in sulfate-deficient archean lakes. **Science**, v. 255, n. 5040, p. 74-77, 1992.

CAMERA, E.; PICARDO, M. Analytical methods to investigate glutathione and related compounds in biological and pathological processes. **Journal of Chromatography B**, v. 781, p. 181-206, 2002.

CAVALCANTE, R. M.; FILHO, N. S. M.; VIANA, R. B.; OLIVEIRA, I. R. N.; NASCIMENTO, R. F.; SILVEIRA, E. R.; FREIRE, G. S. S. Utilization of solid-phase extraction (SPE) for the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in environmental aqueous matrices. **Quimica Nova**, v. 30, n. 3, p. 560-564, 2007.

CETESB. **Sistema Estuarino de Santos e São Vicente**. São Paulo, 2001. p.1-141.

CETESB. **Valores Orientadores para Solos e Águas Subterrâneas no Estado de São Paulo**. São Paulo, 2005. p.1-4.

CETESB. **Qualidade de Águas Litorâneas no Estado de São Paulo**. São Paulo, 2008a. p.1-332.

CETESB. **Relatório de Qualidade das Águas Interiores do Estado de São Paulo**. São Paulo, 2008b. p.1-528.

CHIANG, P. C.; MEANS, J. C. Quantification of benzo[a]pyrene-guanine adducts in in vitro samples by LC tandem mass spectrometry with stable isotope internal standardization. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v. 31, n. 20, p. 3169-3193, 2008.

CHOY, E. J.; JO, Q.; MOON, H. B.; KANG, C. K.; KANG, J. C. Time-course uptake and elimination of benzo(a)pyrene and its damage to reproduction and ensuing reproductive outputs of Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. **Marine Biology**, v. 151, n. 1, p. 157-165, 2007.

CHURCHWELL, M. I.; BELAND, F. A.; DOERGE, D. R. Quantification of multiple DNA adducts formed through oxidative stress using liquid chromatography and electrospray tandem mass spectrometry. **Chemical Research in Toxicology**, v. 15, n. 10, p. 1295-1301, 2002.

COLLEN, J.; PINTO, E.; PEDERSEN, M.; COLEPICOLO, P. Induction of oxidative stress in the red macroalga *Gracilaria tenuistipitata* by pollutant metals. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 45, n. 3, p. 337-342, 2003.

CORDI, B.; DEPLEDGE, M. H.; PRICE, D. N.; SALTER, L. F.; DONKIN, M. E. Evaluation of chlorophyll fluorescence, in vivo spectrophotometric pigment absorption and ion leakage as biomarkers of UV-B exposure in marine macroalgae. **Marine Biology**, v. 130, n. 1, p. 41-49, 1997.

COSTA, V. L. **Caracterização genética, reprodutiva e pigmentar de uma linhagem selvagem e duas variantes cromáticas de *Gracilaria* sp. (Gracilariales, Rhodophyta)**. 2000. 79. Dissertação de mestrado, Universidade de São Paulo, São Paulo.

DERRAIK, J. G. B. The pollution of the marine environment by plastic debris: a review. **Marine Pollution Bulletin**, v. 44, n. 9, p. 842-852, 2002.

DEWEZ, D.; GEOFFROY, L.; VERNET, G.; POPOVIC, R. Determination of photosynthetic and enzymatic biomarkers sensitivity used to evaluate toxic effects of copper and fludioxonil in alga *Scenedesmus obliquus*. **Aquatic Toxicology**, v. 74, n. 2, p. 150-159, 2005.

DJOMO, J. E.; DAUTA, A.; FERRIER, V.; NARBONNE, J. F.; MONKIEDJE, A.; NJINE, T.; GARRIGUES, P. Toxic effects of some major polyaromatic hydrocarbons found in crude oil and aquatic sediments on *Scenedesmus subspicatus*. **Water Research**, v. 38, n. 7, p. 1817-1821, 2004.

DONATO, R. **Diversidade intraespecífica em linhagens tetrasporofíticas de *Gracilaria birdiae* (Gracilariales, Rhodophyta): crescimento, caracterização pigmentar, fotossíntese e assimilação de nitrato**. 2005. 98. Tese de Doutorado, Universidade de São Paulo, São Paulo.

DUMMERMUTH, A. L.; KARSTEN, U.; FISCH, K. M.; KONIG, G. M.; WIENCKE, C. Responses of marine macroalgae to hydrogen-peroxide stress. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 289, n. 1, p. 103-121, 2003.

EDGARA, G. J.; BARRETT, N. S. Impact of the Iron Baron oil spill on subtidal reef assemblages in Tasmania. **Marine Pollution Bulletin**, v. 40, n. 1, p. 36-49, 2000.

EGELMAN, E. H. Actin's prokaryotic homologs. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 13, n. 2, p. 244-248, 2003.

EKLUND, B. T.; KAUTSKY, L. Review on toxicity testing with marine macroalgae and the need for method standardization - exemplified with copper and phenol. **Marine Pollution Bulletin**, v. 46, n. 2, p. 171-181, 2003.

FARINA, O.; RAMOS, R.; BASTIDAS, C.; GARCIA, E. Biochemical responses of cnidarian larvae to mercury and benzo(a)pyrene exposure. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 81, n. 6, p. 553-557, 2008.

FAUGERON, S.; VALERO, M.; DESTOMBE, C.; MARTINEZ, E. A.; CORREA, J. A. Hierarchical spatial structure and discriminant analysis of genetic diversity in the red alga *Mazzaella laminarioides* (Gigartinales, Rhodophyta). **Journal of Phycology**, v. 37, n. 5, p. 705-716, 2001.

FENG, C. L.; XIA, X. H.; SHEN, Z. Y.; ZHOU, Z. Distribution and sources of polycyclic aromatic hydrocarbons in Wuhan section of the Yangtze River, China. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 133, p. 447-458, 2007.

FENG, F.; YIN, J. F.; SONG, M. Y.; WANG, H. L. Preparation, identification and analysis of stereoisomeric anti-benzo[a]pyrene diol epoxide-deoxyguanosine adducts using phenyl liquid chromatography with diode array, fluorescence and tandem mass spectrometry detection. **Journal of Chromatography A**, v. 1183, n. 1-2, p. 119-128, 2008.

FERNANDEZ, N.; CESAR, A.; SALAMANCA, M. J.; DELVALLS, T. A. Toxicological characterisation of the aqueous soluble phase of the Prestige fuel-oil using the sea-urchin embryo bioassay. **Ecotoxicology**, v. 15, n. 7, p. 593-599, 2006.

FLIEDNER, A. Ecotoxicity of poorly water-soluble substances. **Chemosphere**, v. 35, n. 1-2, p. 295-305, 1997.

FLOHE, L.; OTTING, F. Superoxide-dismutase assays. **Methods in Enzymology**, v. 105, p. 93-104, 1984.

GEYER, H.; VISWANATHAN, R.; FREITAG, D.; KORTE, F. Relationship between water solubility of organic-chemicals and their bioaccumulation by the alga *Chlorella*. **Chemosphere**, v. 10, n. 11-1, p. 1307-1313, 1981.

GOLDBERG, E. D. Emerging problems in the coastal zone for the twenty-first century. **Marine Pollution Bulletin**, v. 31, p. 152-158, 1995.

GRAHAM, L. E.; WILCOX, L. W. Algal diversity and relationships - Taxonomy, systematics, and phylogeny. In: GRAHAM, L. E. e WILCOX, L. W. (Ed.). **Algae**. Upper Saddle River: Prentice-Hall, 2000a. p.80-96.

GRAHAM, L. E.; WILCOX, L. W. Introduction to the algae: occurrence, relationships, nutrition, definition, general features. In: GRAHAM, L. E. e WILCOX, L. W. (Ed.). **Algae**. Upper Saddle River: Prentice-Hall, 2000b. p.1-21.

GRAHAM, L. E.; WILCOX, L. W. Macroalgal and periphyton ecology. In: GRAHAM, L. E. e WILCOX, L. W. (Ed.). **Algae**. Upper Saddle River: Prentice-Hall, 2000c. p.603-640.

GRAHAM, L. E.; WILCOX, L. W. The roles of algae in biogeochemistry. In: GRAHAM, L. E. e WILCOX, L. W. (Ed.). **Algae**. Upper Saddle River: Prentice-Hall, 2000d. p.22-39.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. Oxygen is a toxic gas - an introduction to oxygen toxicity and reactive species. In: HALLIWELL, B. e GUTTERIDGE, J. (Ed.). **Free radicals in biology and medicine**: Oxford University Press Inc.: New York, 2007a. p.1-29.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. Reactive species can be poisonous: their role in toxicology. In: HALLIWELL, B. e GUTTERIDGE, J. (Ed.). **Free radicals in biology and medicine**: Oxford University Press Inc.: New York, 2007b. p.440-487.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. Reactive species can be useful: some more examples. In: HALLIWELL, B. e GUTTERIDGE, J. (Ed.). **Free radicals in biology and medicine**: Oxford University Press Inc.: New York, 2007c. p.395-439.

HERNANDEZ, I.; FERNANDEZ-ENGO, M. A.; PEREZ-LLORENS, J. L.; VERGARA, J. J. Integrated outdoor culture of two estuarine macroalgae as biofilters for dissolved nutrients from *Sparus auratus* waste waters. **Journal of Applied Phycology**, v. 17, n. 6, p. 557-567, 2005.

HERNANDEZ, I.; MARTINEZ-ARAGON, J. F.; TOVAR, A.; PEREZ-LLORENS, J. L.; VERGARA, J. J. Biofiltering efficiency in removal of dissolved nutrients by three species of estuarine macroalgae cultivated with sea bass (*Dicentrarchus labrax*) waste waters 2. Ammonium. **Journal of Applied Phycology**, v. 14, n. 5, p. 375-384, 2002.

HERNANDEZ, I.; PEREZ-PASTOR, A.; VERGARA, J. J.; MARTINEZ-ARAGON, J. F.; FERNANDEZ-ENGO, M. A.; PEREZ-LLORENS, J. L. Studies on the biofiltration capacity of *Gracilariopsis longissima*: from microscale to macroscale. **Aquaculture**, v. 252, n. 1, p. 43-53, 2006.

HIDEG, E.; KOS, P. B.; VASS, I. Photosystem II damage induced by chemically generated singlet oxygen in tobacco leaves. **Physiologia Plantarum**, v. 131, n. 1, p. 33-40, 2007.

HIDEG, E.; SCHREIBER, U. Parallel assessment of ROS formation and photosynthesis in leaves by fluorescence imaging. **Photosynthesis Research**, v. 92, n. 1, p. 103-108, 2007.

HIS, E.; BEIRAS, R.; SEAMAN, M. N. L. The assessment of marine pollution. In: SOUTHWARD, A. J.; TYLER, P. A., *et al* (Ed.). **Advances in Marine Pollution**. London: Academic Press, 1999. p.2 - 139.

HUANG, X. D.; ZEILER, L. F.; DIXON, D. G.; GREENBERG, B. M. Photoinduced toxicity of PAHs to the foliar regions of *Brassica napus* (Canola) and *Cucumbis sativus* (Cucumber) in simulated solar radiation. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 35, n. 2, p. 190-197, 1996.

ISHIZUKA, M.; HOSHI, H.; MINAMOTO, N.; MASUDA, M.; KAZUSAKA, A.; FUJITA, S. Alterations of cytochrome P450-dependent monooxygenase activities in *Eriocheir japonicus* in response to water pollution. **Environmental Health Perspectives**, v. 104, n. 7, p. 774-778, 1996.

ISLAM, M. S.; TANAKA, M. Impacts of pollution on coastal and marine ecosystems including coastal and marine fisheries and approach for management: a review and synthesis. **Marine Pollution Bulletin**, v. 48, n. 7-8, p. 624-649, 2004.

JONES, A. B.; PRESTON, N. P.; DENNISON, W. C. The efficiency and condition of oysters and macroalgae used as biological filters of shrimp pond effluent. **Aquaculture Research**, v. 33, n. 1, p. 1-19, 2002.

JUHASZ, A. L.; NAIDU, R. Bioremediation of high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons: a review of the microbial degradation of benzo[a]pyrene. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 45, p. 57-88, 2000.

KENWORTHY, W. J.; DURAKO, M. J.; FATEMY, S. M. R.; VALAVI, H.; THAYER, G. W. Ecology of seagrasses in northeastern saudi-arabia one-year after the gulf-war oil-spill. **Marine Pollution Bulletin**, v. 27, p. 213-222, 1993.

KISS, G.; VARGAPUCHONY, Z.; HLAVAY, J. Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in precipitation using solid-phase extraction and column liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 725, n. 2, p. 261-272, 1996.

KOOLMAN, J.; ROEHM, K. H. Tissue and Organs - Liver. In: KOOLMAN, J. e ROEHM, K. H. (Ed.). **Color Atlas of Biochemistry**. Stuttgart: Georg Thieme Verlag, 2005. p.467.

KUMMEROVA, M.; BARTAK, M.; DUBOVA, J.; TRISKA, J.; ZUBROVA, E.; ZEZULKA, S. Inhibitory effect of fluoranthene on photosynthetic processes in lichens detected by chlorophyll fluorescence. **Ecotoxicology**, v. 15, n. 2, p. 121-131, 2006a.

KUMMEROVA, M.; KRULOVA, J.; ZEZULKA, S.; TRISKA, J. Evaluation of fluoranthene phytotoxicity in pea plants by Hill reaction and chlorophyll fluorescence. **Chemosphere**, v. 65, n. 3, p. 489-496, 2006b.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during assembly of head of bacteriophage-T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680-&, 1970.

LAING, W. A.; CHRISTELLER, J. T.; TERZAGHI, B. E. The effect of temperature, photon flux-density and nitrogen on growth of *Gracilaria sordida* nelson (Rhodophyta). **Botanica Marina**, v. 32, n. 5, p. 439-445, 1989.

LECH, J. J.; VODICNIK, M. J. Biotransformation. In: RAND, G. M. e PETROCELLI, S. R. (Ed.). **Fundamentals of aquatic toxicology: methods and applications**. New York: Hemisphere Publishing Corporation, EUA, 1985. p.526-557.

LEE, W.; SHIN, H. S.; HONG, J. E.; PYO, H.; KIM, Y. Studies on the analysis of benzo(a)pyrene and its metabolites in biological samples by using high performance liquid chromatograpy/fluorescence detection and gas chromatography/mass spectrometry. **Bulletin of the Korean Chemical Society**, v. 24, n. 5, p. 559-565, 2003.

LEI, A. P.; HU, Z. L.; WONG, Y. S.; TAM, N. F. Antioxidant responses of microalgal species to pyrene. **Journal of Applied Phycology**, v. 18, n. 1, p. 67-78, 2006.

LIGNELL, A.; PEDERSEN, M. Agar composition as a function of morphology and growth-rate - studies on some morphological strains of *Gracilaria secundata* and *Gracilaria verrucosa* (Rhodophyta). **Botanica Marina**, v. 32, n. 3, p. 219-227, 1989.

LIN, T.; YANG, M. S. Benzo[a]pyrene-induced elevation of GSH level protects against oxidative stress and enhances xenobiotic detoxification in human HepG(2) cells. **Toxicology**, v. 235, n. 1-2, p. 1-10, 2007.

LOBON, C. M.; FERNANDEZ, C.; ARRONTES, J.; RICO, J. M.; ACUNA, J. L.; ANADON, R.; MONTEOLIVA, J. A. Effects of the 'Prestige' oil spill on macroalgal assemblages: Large-scale comparison. **Marine Pollution Bulletin**, v. 56, n. 6, p. 1192-1200, 2008.

LOVEJOY, T. E. Biodiversity: What is it? In: REAKA-KUDA, M. K.; WILSON, D. E.*, et al* (Ed.). **Biodiversity II: Understanding and Protecting Our Biological Resources**. Washington DC.: Joseph Henry Press, 1997. p.7-14.

LU, I. F.; SUNG, M. S.; LEE, T. M. Salinity stress and hydrogen peroxide regulation of antioxidant defense system in *Ulva fasciata*. **Marine Biology**, v. 150, n. 1, p. 1-15, 2006.

MACFARLANE, G. R. Chlorophyll *a* fluorescence as a potential biomarker of zinc stress in the grey mangrove, *Avicennia marina* (Forsk.) Vierh. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 70, n. 1, p. 90-96, 2003.

MARWOOD, C. A.; SMITH, R. E. H.; CHARLTON, M. N.; SOLOMON, K. R.; GREENBERG, B. M. Photoinduced toxicity to Lake Erie phytoplankton assemblages from intact and photomodified polycyclic aromatic hydrocarbons. **Journal of Great Lakes Research**, v. 29, n. 4, p. 558-565, 2003.

MARWOOD, C. A.; SMITH, R. E. H.; SOLOMON, K. R.; CHARLTON, M. N.; GREENBERG, B. M. Intact and photomodified polycyclic aromatic hydrocarbons inhibit photosynthesis in natural assemblages of Lake Erie phytoplankton exposed to solar radiation. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 44, n. 3, p. 322-327, 1999.

MATUO, M. **Indução da produção de citocromo P-450 em *Saccharomyces cerevisiae*.** 2007. 79. Dissertação de mestrado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo.

MENSING, T. *et al.* DNA adduct formation of benzo[a]pyrene in white blood cells of workers exposed to polycyclic aromatic hydrocarbons. **International Journal of Hygiene and Environmental Health**, v. 208, n. 3, p. 173-178, 2005.

MONARI, M.; CATTANI, O.; SERRAZANETTI, G. P.; SELLI, A.; PAGLIUCA, G.; ZIRONI, E.; O'HARA, S. C. M.; LIVINGSTONE, D. R. Effect of exposure to benzo[a]pyrene on SODs, CYP1A1/1A2-and CYP2E1 immunopositive proteins in the blood clam *Scapharca inaequivalvis*. **Marine Environmental Research**, v. 63, n. 3, p. 200-218, 2007.

MONARI, M.; FOSCHI, J.; MATOZZO, V.; MARIN, M. G.; FABBRI, M.; ROSMINI, R.; SERRAZANETTI, G. P. Investigation of EROD, CYP1A immunopositive proteins and SOD in haemocytes of *Chamelea gallina* and their role in response to B[a]P. **Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology & Pharmacology**, v. 149, n. 3, p. 382-392, 2009.

MORANT, M.; BAK, S.; LINDBERG, B.; WERCK-REICHHART, D. Plant cytochromes P450: tools for pharmacology, plant protection and phytoremediation (vol 14, pg 151, 2003). **Current Opinion in Biotechnology**, v. 14, n. 3, p. 355-355, 2003.

MSUYA, F. E.; KYEWALYANGA, M. S.; SALUM, D. The performance of the seaweed *Ulva reticulata* as a biofilter in a low-tech, low-cost, gravity generated water flow regime in Zanzibar, Tanzania. **Aquaculture**, v. 254, n. 1-4, p. 284-292, 2006.

NAHRGANG, J.; CAMUS, L.; GONZALEZ, P.; GOKSOYR, A.; CHRISTIANSEN, J. S.; HOP, H. PAH biomarker responses in polar cod (*Boreogadus saida*) exposed to benzo(a)pyrene. **Aquatic Toxicology**, v. 94, n. 4, p. 309-319, 2009.

NECCHI, O. Light-related photosynthetic characteristics of lotic macroalgae. **Hydrobiologia**, v. 525, n. 1-3, p. 139-155, 2004.

NECCHI, O. J.; ALVES, A. H. S. Photosynthetic characteristics of the freshwater red alga *Batrachospermum delicatulum*. **Acta Botanica Brasilica**, v. **19**, p. 125-137, 2005.

OKAY, O. S.; TUFEKCI, V.; DONKIN, P. Acute and chronic toxicity of pyrene to the unicellular marine alga *Phaeodactylum tricornutum*. **Protection and Restoration of the Environment Vi, Vols I - Iii, Proceedings**, p. 803-808, 2002.

OLIVEIRA, E. C.; MIRANDA, G. E. C. Aspectos sociais e econômicos da explotação de algas marinhas no Brasil. **Anais do IV Congresso Latino-Americano, II Reunião Ibero-Americana, VII Reunião Brasileira de Ficologia**. AZEVEDO, M. T. P.**:** 149-156 p. 1998.

OLIVEIRA, E. C.; PLASTINO, E. M. Gracilariaceae. In: AKATSUKA, I. (Ed.). **Biology of the economic seaweeds**. The Hague, Netherlands: SPB Academic Publishing, 1994. p.185-226.

OMURA, T.; SATO, R. Carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes .2. Solubilization purification + properties. **Journal of Biological Chemistry**, v. 239, n. 7, p. 2379, 1964a.

OMURA, T.; SATO, R. Carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes .I. Evidence for its hemoprotein nature. **Journal of Biological Chemistry**, v. 239, n. 7, p. 2370, 1964b.

PAWLIK-SKOWRONSKA, B.; PIRSZEL, J.; BROWN, M. T. Concentrations of phytochelatins and glutathione found in natural assemblages of seaweeds depend on species and metal concentrations of the habitat. **Aquatic Toxicology**, v. 83, n. 3, p. 190-199, 2007.

PFLUGMACHER, S.; OLIN, M.; KANKAANPAA, H. Nodularin induces oxidative stress in the Baltic Sea brown alga *Fucus vesiculosus* (Phaeophyceae). **Marine Environmental Research**, v. 64, n. 2, p. 149-159, 2007.

PFLUGMACHER, S.; SANDERMANN, H. Cytochrome P450 monooxygenases for fatty acids and xenobiotics in marine macroalgae. **Plant Physiology**, v. 117, n. 1, p. 123-128, 1998.

PFLUGMACHER, S.; WIENCKE, C.; SANDERMANN, H. Activity of phase I and phase II detoxication enzymes in Antarctic and Arctic macroalgae. **Marine Environmental Research**, v. 48, n. 1, p. 23-36, 1999.

PHILLIPSON, C. E.; IOANNIDES, C.; BARRETT, D. C. A.; PARKE, D. V. The homogeneity of rat-liver microsomal cytochrome-P448 activity and its role in the activation of benzo[a]pyrene to mutagens. **International Journal of Biochemistry**, v. 17, n. 1, p. 37-42, 1985.

PINTO, E.; SIGAUD-KUTNER, T. C. S.; LEITAO, M. A. S.; OKAMOTO, O. K.; MORSE, D.; COLEPICOLO, P. Heavy metal-induced oxidative stress in algae. **Journal of Phycology**, v. 39, n. 6, p. 1008-1018, 2003.

PLASTINO, E. M.; OLIVEIRA, E. C. *Gracilaria birdiae* (Gracilariales, Rhodophyta), a new species from the tropical South American Atlantic with a terete frond and deep spermatangial conceptacles. **Phycologia**, v. 41, n. 4, p. 389-396, 2002.

PLASTINO, E. M.; URSI, S.; FUJII, M. T. Color inheritance, pigment characterization, and growth of a rare light green strain of *Gracilaria birdiae* (Gracilariales, Rhodophyta). **Phycological Research**, v. 52, n. 1, p. 45-52, 2004.

PLATT, T.; GALLEGOS, C. L.; HARRISON, W. G. Photoinhibition of photosynthesis in natural assemblages of marine-phytoplankton. **Journal of Marine Research**, v. 38, n. 4, p. 687-701, 1980.

RAND, G. M.; WELLS, P. G.; MCCARTY, L. S. Introduction to aquatic toxicology. In: RAND, G. M. (Ed.). **Fundamentals of Aquatic Toxicology - Effects, Environmental Fate, and Risk Assessment**. London: Taylor & Francis, 1995. p.3-67.

RAVEN, P.; JOHNSON, G. Photosynthesis. In: RAVEN, P. e JOHNSON, G. (Ed.). **Biology**: McGraw-Hill College, 2001. p.1344.

RIEBESELL, U.; WOLFGLADROW, D. A.; SMETACEK, V. carbon dioxide limitation of marine phytoplankton growth rates. **Nature**, v. 361, n. 6409, p. 249-251, 1993.

RIJSTENBIL, J. W.; HARITONIDIS, S.; MALEA, P.; SEFERLIS, M.; WIJNHOLDS, J. A. 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**, v. 385, p. 171-181, 1998.

ROCHA, L. L.; CORDEIRO, R. D. A.; CAVALCANTE, R. M.; DO NASCIMENTO, R. F.; MARTINS, S. C. S.; SANTAELLA, S. T.; MELO, V. M. M. Isolation and characterization of phenol-degrading yeasts from an oil refinery wastewater in Brazil. **Mycopathologia**, v. 164, n. 4, p. 183-188, 2007.

SANDERMANN, H. Plant-metabolism of xenobiotics. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 17, n. 2, p. 82-84, 1992.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 74, n. 12, p. 5463-5467, 1977.

SEMPLE, K. T.; CAIN, R. B.; SCHMIDT, S. Biodegradation of aromatic compounds by microalgae. **Fems Microbiology Letters**, v. 170, n. 2, p. 291-300, 1999.

SHIMADA, T.; ODA, Y.; GILLAM, E. M. J.; GUENGERICH, F. P.; INOUE, K. Metabolic activation of polycyclic aromatic hydrocarbons and other procarcinogens by cytochromes P450 1A1 and P4501B1 allelic variants and other human cytochromes P450 in *Salmonella typhimurium* NM2009. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 29, n. 9, p. 1176-1182, 2001.

SHIMIZU, T.; TATEISHI, T.; HATANO, M.; FUJIIKURIYAMA, Y. Probing the role of lysines and arginines in the catalytic function of cytochrome-P450d by site-directed mutagenesis - interaction with NADPH-cytochrome-P450 reductase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 266, n. 6, p. 3372-3375, 1991.

SIGAUD-KUTNER, T. C. S.; PINTO, E.; NETO, A. M. P.; COLEPICOLO, P. Changes in antioxidant enzyme activities, malondialdehyde, and glutathione contents in the dinoflagellate *Lingulodinium polyedrum* (Dinophyceae) grown in batch-cultures. **Phycological Research**, v. 53, n. 3, p. 209-214, 2005.

SINGH, R. *et al.* Detection and quantitation of benzo[a]pyrene-derived DNA adducts in mouse liver by liquid chromatography - Tandem mass spectrometry: Comparison with P-32-postlabeling. **Chemical Research in Toxicology**, v. 19, n. 6, p. 868-878, 2006.

MARINHO-SORIANO, E. Filtros vivos para limpar a água. **Ciência Hoje**, v. 37, n. **219**, p. 67-69, 2005.

STEGEMAN, J. J.; HAHN, M. E. Biochemistry and molecular biology of monooxygenase: current perspective on forms, functions, and regulation of cytochrome P450 in aquatic species. In: MALINS, D. C. e OSTRANDER, G. K. (Ed.). **Aquatic Toxicology; Molecular, Biochemical and Cellular Perspectives**. Boca Raton: Lewis Publishers, CRC Press, 1994. p.87-206.

STEPANIYAN, O. V. Effects of crude oil on major functional characteristics of macroalgae of the Barents Sea. **Russian Journal of Marine Biology**, v. 34, n. 2, p. 131-134, 2008.

STRYER, L.; TYMOCZKO, J.; BERG, J. **Biochemistry**. New York: W. H. Freeman and Company, 2002.

SVERDRUP, L. E.; HAGEN, S. B.; KROGH, P. H.; VAN GESTEL, C. A. M. Benzo(a)pyrene shows low toxicity to three species of terrestrial plants, two soil invertebrates, and soil-nitrifying bacteria. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 66, n. 3, p. 362-368, 2007.

SZALAI, G.; KELLOS, T.; GALIBA, G.; KOCSY, G. Glutathione as an antioxidant and regulatory molecule in plants under abiotic stress conditions. **Journal of Plant Growth Regulation**, v. 28, n. 1, p. 66-80, 2009.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. Porto Alegre: Artmed, 2004.

TERUHISA, K.; MASAHIRO, N.; HIROSHI, K.; TOMOKO, Y.; KOUICHI, O.; MARINE LIFE RES GRP, T. Impacts of the Nakhodka heavy-oil spill on an intertidal ecosystem: an approach to impact evaluation using geographical information system. **Marine Pollution Bulletin**, v. 47, n. 1-6, p. 99-104, 2003.

TITATO, G. M.; LANCAS, F. M. Comparison between different extraction (LLE and SPE) and determination (HPLC and capillary-LC) techniques in the analysis of selected PAHs in water samples. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v. 28, n. 19, p. 3045-3056, 2005.

TURNER, A.; RAWLING, M. C. Sorption of benzo[a]pyrene to sediment contaminated by acid mine drainage: contrasting particle concentration-dependencies in river water and seawater. **Water Research**, v. 36, n. 8, p. 2011-2019, 2002.

URSI, S. **Crescimento in vitro de *Gracilaria* sp. (Gracilariales, Rhodophyta): análise da diversidade intraespecífica**. 2000. 84. Dissertação de mestrado, Universidade de São Paulo, São Paulo.

URSI, S.; PLASTINO, E. M. Crescimento *in vitro* de linhagens de coloração vermelha e verde clara de *Gracilaria birdiae* (Gracilariales, Rhodophyta) em dois meios de cultura: análise de diferentes estádios reprodutivos. **Revista Brasileira de Botânica**, v. **24**, n. 4, p. 587-594, 2001.

VAN DER OOST, R.; BEYER, J.; VERMEULEN, N. P. E. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 13, n. 2, p. 57-149, 2003.

VERMEULEN, N. P. E.; DONNÉ-OP DEN KELDER, G.; COMMANDEUR, J. N. M. Formation of and protection against toxic reactive intermediates. In: TESTA, B.; KYBURZ, E.*, et al* (Ed.). **Perspectives in medicinal chemistry**. Basel: Verlag Helvetica Chimica Acta, 1992. p.573-593.

VILLARES, R.; REAL, C.; FERNANDEZ, J. A.; ABOAL, J.; CARBALLEIRA, A. Use of an environmental specimen bank for evaluating the impact of the Prestige oil spill on the levels of trace elements in two species of *Fucus* on the coast of Galicia (NW Spain). **Science of the Total Environment**, v. 374, n. 2-3, p. 379-387, 2007.

WALKER, C. H.; HOPKIN, S. P.; SIBLY, R. M.; PEAKALL, D. B. Biomarkers. In: WALKER, C. H.; HOPKIN, S. P.*, et al* (Ed.). **Principles of Ecotoxicology**. London: Taylor & Francis, 1996a. p.175-194.

WALKER, C. H.; HOPKIN, S. P.; SIBLY, R. M.; PEAKALL, D. B. The fate of organic pollutants in individuals and in ecosystems. In: WALKER, C. H.; HOPKIN, S. P.*, et al* (Ed.). **Principles of Ecotoxicology**. London: Taylor & Francis, 1996b. p.67-102.

WALKER, C. H.; HOPKIN, S. P.; SIBLY, R. M.; PEAKALL, D. B. Introduction. In: WALKER, C. H.; HOPKIN, S. P.*, et al* (Ed.). **Principles of Ecotoxicology**. London: Taylor & Francis, 1996c. p.xiii-xvii.

WALKER, C. H.; HOPKIN, S. P.; SIBLY, R. M.; PEAKALL, D. B. Major classes of pollutant. In: WALKER, C. H.; HOPKIN, S. P.*, et al* (Ed.). **Principles of Ecotoxicology**. London: Taylor & Francis, 1996d. p.3-25.

WARD, G. S. Saltwater tests. In: RAND, G. M. (Ed.). **Fundamentals of Aquatic Toxicology - Effects, Environmental Fate, and Risk Assessment**. London: Taylor & Francis, 1995. p.103-133.

WARSHAWSKY, D.; CODY, T.; RADIKE, M.; REILMAN, R.; SCHUMANN, B.; LADOW, K.; SCHNEIDER, J. Biotransformation of benzo[a]pyrene and other polycyclic aromatic-hydrocarbons and heterocyclic-analogs by several green-algae and other algal species under gold and white-light. **Chemico-Biological Interactions**, v. 97, n. 2, p. 131-148, 1995.

WARSHAWSKY, D.; LADOW, K.; SCHNEIDER, J. Enhanced degradation of benzo[a]pyrene by *Mycobacterium* sp in conjunction with green alga. **Chemosphere**, v. 69, n. 3, p. 500-506, 2007.

WOLFE, M. F.; SCHLOSSER, J. A.; SCHWARTZ, G. J. B.; SINGARAM, S.; MIELBRECHT, E. E.; TJEERDEMA, R. S.; SOWBY, M. L. Influence of dispersants on the bioavailability and trophic transfer of petroleum hydrocarbons to primary levels of a marine food chain. **Aquatic Toxicology**, v. 42, n. 3, p. 211-227, 1998.

YANG, H.; ZHOU, L. C.; WANG, Z. F.; ROBERTS, L. J.; LIN, X. H.; ZHAO, Y. F.; GUO, Z. M. Overexpression of antioxidant enzymes in apoE-deficient mice suppresses benzo(a) pyrene-accelerated atherosclerosis. **Atherosclerosis**, v. 207, n. 1, p. 51-58, 2009.

YANG, H. S.; ZHOU, Y.; MAO, Y. Z.; LI, X. X.; LIU, Y.; ZHANG, F. S. Growth characters and photosynthetic capacity of *Gracilaria lemaneiformis* as a biofilter in a shellfish farming area in Sanggou Bay, China. **Journal of Applied Phycology**, v. 17, n. 3, p. 199-206, 2005.

YOKOYA, N. S.; NECCHI, O.; MARTINS, A. P.; GONZALEZ, S. F.; PLASTINO, E. M. Growth responses and photosynthetic characteristics of wild and phycoerythrin-deficient strains of Hypnea musciformis (Rhodophyta). **Journal of Applied Phycology**, v. 19, n. 3, p. 197-205, 2007.

ZUBIA, M.; ROBLEDO, D.; FREILE-PELEGRIN, Y. Antioxidant activities in tropical marine macroalgae from the Yucatan Peninsula, Mexico. **Journal of Applied Phycology**, v. 19, p. 449-458, 2007.

8. Súmula Curricular

DADOS PESSOAIS

Nome: João Vasconcellos de Almeida
Local e data de nascimento: São Paulo – SP, 02/05/1983
Email: jvdealmeida.bio@gmail.com
Idiomas: inglês fluente e conhecimentos de língua espanhola

EDUCAÇÃO - Nível Superior

Graduação

-Bacharel em Ciências Biológicas pelo Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, São Paulo. De 14/02/2002 a 01/07/2006.

-Licenciatura em Ciências Biológicas pelo Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, São Paulo. Início em 17/12/2004; em fase de conclusão.

FORMAÇÃO COMPLEMENTAR

Cultura Inglesa, São Paulo. Do curso KIDS ao CPE 2.

OCUPAÇÃO

Bolsista de Mestrado entre 04/2007 a 03/2009:
- financiamento CNPq de 04/2007 a 08/2007;
- financiamento FAPESP de 01/09/2007 a 31/03/2009.

PUBLICAÇÕES

Artigos

ALMEIDA, J. V.; OLIVEIRA-SILVA, D.; ROMANO, R. L.; PLASTINO, E. M.; MARINHO-SORIANO, E.; COLEPICOLO, P. Extraction, separation and detection of benzo(a)pyrene and the impact on the photosynthetic parameters of *Gracilaria birdiae*. **Comparative Biochemistry and Physiology A-Molecular & Integrative Physiology**. v. 151, n. 1, p. S-25, 2008.

TAKAMI, R.; ALMEIDA, J.V.; VARDARIS, C.V.; COLEPICOLO, P.; E BARROS, M.P. Toxicity of chromium (VI) forms to freshwater chlorophyta *Monoraphidium convolutum*: the performance of the photosynthesis-oxidative stress duet is under thiol orchestration. **Aquatic Toxicology** (em preparação).

Resumos em Congressos

II Workshop – Novos Bioativos de Macroalgas: Manejo e Cultivo, Conservação, Biotecnologia e Técnicas de Bioatividade. Medidas de Fotossíntese: Teoria e prática na fisiologia de macroalgas (Minicurso - Responsável). 2009. (Workshop).

II Workshop – Novos Bioativos de Macroalgas: Manejo e Cultivo, Conservação, Biotecnologia e Técnicas de Bioatividade. Avaliação dos efeitos tóxicos decorrentes da exposição ao hidrocarboneto policíclico aromático benzo(a)pireno sobre a macroalga vermelha *Gracilaria birdiae* (Apresentação Oral). 2009. (Workshop).

II Workshop – Novos Bioativos de Macroalgas: Manejo e Cultivo, Conservação, Biotecnologia e Técnicas de Bioatividade. Estudo dos efeitos tóxicos do fenol sobre a macroalga *Gracilaria birdiae* e a microalga *Lingulodinium polyedrum*. 2009. (Pôster) (Workshop).

II Workshop – Novos Bioativos de Macroalgas: Manejo e Cultivo, Conservação, Biotecnologia e Técnicas de Bioatividade. Uso de *Gracilaria birdiae* (Gracilariales) e *Jania crassa* (Corallinales) como bioindicadores de estresse por benzo(a)pireno. 2009. (Pôster) (Workshop).

II Workshop – Novos Bioativos de Macroalgas: Manejo e Cultivo, Conservação, Biotecnologia e Técnicas de Bioatividade. Determinação de alterações biológicas e síntese de substâncias quelantes provenientes de algas expostas a metais pesados. 2009. (Pôster) (Workshop).

II Workshop – Novos Bioativos de Macroalgas: Manejo e Cultivo, Conservação, Biotecnologia e Técnicas de Bioatividade. Ecofisiologia do rodolito *Lithothamnion superpositum* (Corallinales, Rhodophyta) – conhecimento necessário para sua utilização sustentável e conservação. 2009. (Pôster) (Workshop).

25th Congress of the European Society of Comparative Physiology and Biochemistry (XXV ESCPB Congress). Extração, separação e detecção de benzo(a)pireno e seus impactos sobre os parâmetros fotossintéticos de *Gracilaria birdiae*. 2008. (Pôster) (Congresso).

XXXVII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular (SBBq). Extração, separação e detecção de benzo(a)pireno e seus impactos sobre os parâmetros fotossintéticos de *Gracilaria birdiae*. 2008. (Pôster) (Congresso).

XXXV Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular (SBBq). 2006. (Pôster) (Congresso).

X Encontro Anual do Grupo Arthromint. Propriedades de Amilases de Insetos. 2006. (Encontro).

XXXIV Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular (SBBq). Expression, purification and recovery of a recombinant annexin from *Spodoptera frugiperda*. 2005. (Pôster) (Congresso).

13º Simpósio Internacional de Iniciação Científica da Universidade de São Paulo (SIICUSP). Sequencing and expression of a *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera) annexin associated with the midgut microvillar membrane. 2005. (Pôster) (Simpósio).

XXXIII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular (SBBq). Sequencing and expression of a *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera) annexin associated with the midgut microvillar membrane. 2004. (Pôster) (Congresso).