UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Programa de Pós-Graduação em Farmácia
Área de Toxicologia e Análises Toxicológicas

Biomarcadores de exposição em macroalgas *Gracilaria domingensis* expostas a
cádmio e cobre

Tatiana Cristina Stefani Margarido

Tese para obtenção do título de DOUTOR
Orientador: Prof. Dr. Pio Colepicolo Neto

São Paulo

2016

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Programa de Pós-Graduação em Farmácia
Área de Toxicologia e Análises Toxicológicas

Biomarcadores de exposição em macroalgas *Gracilaria domingensis* expostas a
cádmio e cobre

Tatiana Cristina Stefani Margarido

Versão original

Tese para obtenção do título de DOUTOR
Orientador: Prof. Dr. Pio Colepicolo Neto

São Paulo
2016

Ficha Catalográfica

Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

Margarido, Tatiana Cristina Stefani

M327b Biomarcadores de exposição em macroalgas *Gracilaria domingensis*
expostas a cádmio e cobre / Tatiana Cristina Stefani Margarido. --
São Paulo, 2016.
72p.

Tese (doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas da
Universidade de São Paulo. Departamento de Análises Clínicas
e Toxicológicas.

Orientador: Colepicolo Neto, Pio

1. Toxicologia ambiental 2. Biomacadores 3. Macroalgas
4. Metais I. T. II. Colepicolo Neto, Pio, orientador.

615.9 CDD

Tatiana Cristina Stefani Margarido

Biomarcadores de exposição em macroalgas *Gracilaria domingensis*
expostas a cádmio e cobre

Comissão Julgadora
Da
Tese para obtenção do Título de DOUTOR

Prof. Dr. Pio Colepicolo Neto
Orientador/presidente

1º Examinador

2º Examinador

3º Examinador

4º Examinador

São Paulo, ____ de _____ de 2016.

Dedico esse trabalho aos meus pais, minha irmã, e a toda minha família, e ao meu grande companheiro Alex, por sempre acreditarem na minha capacidade, e tornarem os dias mais leves, cheios de amor e sorrisos.

AGRADECIMENTOS

- Ao Prof. Dr. Pio Colepicolo me acolher em seu espaço e me dar chance de desenvolver essa pesquisa, e por toda paciência e ensinamentos para uma vida toda.
- A Prof. Dra. Nair Yokoya por gentilmente ceder amostras de seu banco de algas para que pudesse iniciar o cultivo das minhas. Bem como por me receber em seu laboratório para realização desses cultivos.
- A FAPESP pelo apoio financeiro que tornou o projeto possível. (Projeto 2012/00933-4)
- Aos companheiros de laboratório Luiza, Aline, Érika, Eliezer, Cícero, Daniel (Erechim), Cíntia, Helena, que sempre contribuíram direta ou indiretamente com o projeto com ideias e bate-papos, e foram fundamentais nos momentos de descontração, companhias para o café, e risadas. Sem vocês o laboratório não seria a mesma coisa.
- Aos técnicos do laboratório Leonardo, por toda ajuda com as análises de espectrometria de massas, e piadas, Ednailson e Sandrinha por todo auxílio, carinho e companhia para almoçar.
- Aos amigos Carla, Thaís, Ana, George e Rogério que se tornaram minha família nessa enorme São Paulo e tornaram a jornada mais leve e cheia de felicidade.
- Aos meus pais, minha avó Maria e minha tia Sueli por todo apoio, palavras de carinho, e por sempre dizerem que “vai ficar tudo bem”.

- E por último e não menos importante, ao meu companheiro, amigo, parceiro pra toda vida Alex, que me mostrou que a vida sempre pode ser mais tranquila, e intensa. E que me deu todo amor que era preciso e muito mais, e me faz todo dia sorrir e querer ser melhor.

RESUMO

STEFANI MARGARIDO, T. C. **Biomarcadores de exposição em macroalgas *Gracilaria domingensis* expostas a cádmio e cobre.** 2016. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

Nos últimos anos, os metais vêm ganhando maior atenção em estudos devido aos impactos causados no ambiente, sua persistência e capacidade de bioacumulação e biomagnificação. As zonas costeiras por sua localização sofrem danos maiores, principalmente devido à grande quantidade de efluentes depositada nessa área provenientes de atividades urbanas, industriais, agrícolas e mineiras, dentre outras. As algas são organismos que compõe a base da cadeia alimentar e possuem ainda capacidade de estocar metais tornando-os menos disponíveis para as espécies que habitam a região. Tal característica torna esse organismo uma alternativa economicamente viável e ecológica em processos de biorremediação. As macroalgas pertencentes ao gênero *Gracilaria*, possuem grande importância econômica na produção de ágar, e alguns de seus metabólitos são utilizados no ramo farmacêutico, medicinal e de cosméticos. No entanto, esse gênero pode ser também um bom bioindicador da presença de metais, e os efeitos causados por esses compostos, potenciais biomarcadores. O objetivo presente estudo é verificar os efeitos dos metais cobre (Cu) e cádmio (Cd) em enzimas antioxidantes e de biotransformação na espécie *Gracilaria domingensis*, e os mecanismos de retenção e detoxificação desses metais. A descrição desses mecanismos visa contribuir com a possibilidade de utilização dessas macroalgas para remediação de ambientes impactados. Para tanto foram desenvolvidos experimentos para definição de valores de IC₅₀ que estabeleceram que os valores de IC₅₀ para o cobre e cádmio para espécie *Gracilaria domingensis* são 10,6 e 1,05 mg/L, respectivamente. E foram feitos experimentos utilizando as concentrações de cobre de 5,3 e 10,6 mg/L (½ IC₅₀ e IC₅₀) por períodos de 1, 24 e 48 horas. Experimentos com grupos de recuperação, além de experimentos utilizando as concentrações determinadas pelo CONAMA 357/2005 e experimentos de perfil temporal de formação de fitoquelatinas e resposta de biomarcadores após 24, 48, 72 e 96 horas de exposição. As análises das algas expostas demonstraram aumento na atividade da glutathione peroxidase (GPx), glutathione-S-transferase (GST) e ascorbato peroxidase (APx). No entanto, a catalase (CAT) não apresentou atividade detectável, nem mesmo na presença do metal. As análises teste de fitoquelatinas, GSH e GSSG foram inconclusivas, porém os novos testes realizados com concentrações legisladas e relativas ao IC₅₀ mostraram alterações significativas nos níveis de GSSG e GSH para exposição ao cobre, no entanto, o grupo tratado com cádmio foi o único que apresentou fitoquelatinas detectáveis. A espécie *Gracilaria domingensis* tem demonstrado potencial como organismos bioindicador e os biomarcadores estão fornecendo resultados promissores.

Palavras-chaves: Biomarcadores; macroalgas; metais; *Gracilaria domingensis*;

ABSTRACT

STEFANI MARGARIDO, T. C. **Biomarkers of exposure in macroalgae *Gracilaria domingensis* exposed to cadmium and copper.** 2016. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

In the last years great importance are being dedicated to the research of metals because of their environmental impact, persistence and the possibility of bioaccumulation and biomagnification. The large amount of effluents produced by urban, industrial, agricultural and mining activities among others affect particularly the coastal areas. In this context, the algae which compose the basis of the foodweb, and have the capacity to stock metals decreasing their availability in the environment and therefore to other species inhabiting the area. Such characteristic make the algae a feasibly economic and ecological alternative to be used in bioremediation approaches. Macroalgae belonging to the genus *Gracilaria*, possess already an economical importance in the production of agar and, some of its metabolites are commonly used in the pharmaceutical industry. The organisms of this genus can also be an indicator of the metal presence in the environment and the effects caused by these compounds potential biomarkers. The objective of this project is to assess the effect of copper (Cu) and cadmium (Cd) on antioxidant or biotransformation enzymes in the algae *Gracilaria domingensis* and also the mechanisms of retention and detoxification of these metals. The description of these mechanisms can contribute to further use this macroalgae to bioremediation processes. Experiments established the IC₅₀ of copper and cadmium in *Gracilaria domingensis* at 10.6 and 1.05 mg. L⁻¹, respectively. Experiments using the copper's concentrations 5.3 and 10.6 mg. L⁻¹ (½ IC₅₀ and IC₅₀) for 1, 24 and 48 h of were performed. Besides experiments with recovery groups, experiments using CONAMA 357/2005 concentration and experiment with different times of exposure (24, 48, 72 and 96 hours) to understand better when phytochelatins starts to be produced and a profile of biomarkers. The analysis of exposed algae to copper demonstrated an increased activity of glutathione peroxidase (GPx), glutathione-S-transferase (GST) and ascorbate peroxidase (APx). Interestingly, the catalase (CAT) activity was not detected even though in the presence of metal. Other experiments using concentration determined by CONAMA and IC₅₀ was performed, as well experiments using recovery groups, and a temporal profile, to see the results for 24, 48, 72 e 96 hours of exposure. The analysis of phytochelatine, GSH and GSSG test were inconclusive and new conducted tests with CONAMA's and IC₅₀ concentration showed significant alterations in the levels of GSSG e GSH for the samples exposed to copper, however, only the group treated with cadmium demonstrated detectable levels of phytochelatin. The species *Gracilaria domingensis* has been demonstrating the potential as a bioindicator organism and the biomarkers are producing promising results.

Keywords: Biomarkers; macroalgae; metals; *Gracilaria domingensis*;

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 (1) Reação de Fenton e (2) formação de radical hidroxila a partir de H_2O_2 na presença de íons de cobre (Cu^+).	16
Figura 2: Macroalgas <i>Gracilaria domingensis</i>	24
Figura 3: Reação de decomposição do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em oxigênio (O_2) pela enzima antioxidante catalase.	31
Figura 4: Reação de formação do complexo CDNB na presença de GST.....	31
Figura 5: Reações de oxidação da GSH pela GPx e redução da GSSG pela GR mediante a presença e oxidação de NADPH.	32
Figura 6 Reação geral catalisada pela Ascorbato Peroxidase.	33
Figura 7: Curva de crescimento de macroalgas <i>Gracilaria domingensis</i> ao longo de 1 mês de cultivo com trocas de meio e pesagens semanais.	40
Figura 8: Proteínas totais solúveis quantificadas através do método de Bradford. No gráfico de colunas tem-se A: amostras extraídas de acordo com a metodologia de Collén et al (2003) sem o detergente Triton X-100 e B: amostras extraídas de acordo com a metodologia de Aguilera et al (2002). E no segundo gráfico está demonstrada a curva padrão da análise acompanhada da equação da reta ($y = 1,259 x \pm 0,09523$; $R^2 = 0,9831$).	42
Figura 9: A - Imagem de <i>Gracilaria domingensis</i> do grupo controle. B - Imagem de <i>Gracilaria domingensis</i> pertencente ao grupo IC_{50} após 48 horas de exposição, sofrendo de despigmentação. C - Imagem de <i>Gracilaria domingensis</i> pertencente ao grupo IC_{50} após 48 horas de exposição ilustrando alguns pontos de morte tecidual.	42
Figura 10: O gráfico demonstra a atividade específica da CAT para as amostras de <i>Pyropia spiralis</i> .utilizando 100 e 200 mg de massa fresca para o ensaio enzimático. A atividade para	

as amostras de *Gracilaria tenuistipitata* e *Gracilaria domingensis* não está demonstrada, pois as mesmas não apresentaram valores detectáveis.....44

Figura 11: Atividade específica da GPx em extratos de algas *Gracilaria domingensis* expostas a cobre. Sendo: $\frac{1}{2}$ IC₅₀: grupo exposto a 5,3 mg/L de cobre e IC₅₀: grupo exposto a 10,6 mg/L de cobre; a: diferença significativa em relação ao controle de mesmo tempo de exposição. b: diferença significativa em relação ao outro grupo tratado para o tempo de exposição.45

Figura 12: Atividade específica da APx em extratos de algas *Gracilaria domingensis* expostas a cobre. Sendo $\frac{1}{2}$ IC₅₀: grupo exposto a 5,3 mg/L de cobre e IC₅₀: grupo exposto a 10,6 mg/L de cobre; a: diferença significativa em relação ao controle de mesmo tempo de exposição.47

Figura 13: Ciclo Ascorbato-glutationa em cloroplastos. 1: Ascorbato peroxidase; 2: Dehidroascorbato redutase; 3: Glutationa redutase. Fonte: Traduzido de Free Radicals in Biology and Medicine, seção 6.8.7 p.366.....48

Figura 14: Atividade específica da GST em extratos de algas *Gracilaria domingensis* expostas a cobre. Sendo: $\frac{1}{2}$ IC₅₀: grupo exposto a 5,3 mg/L de cobre e IC₅₀: grupo exposto a 10,6 mg/L de cobre; a: diferença significativa em relação ao controle de mesmo tempo de exposição. b: diferença significativa entre os grupos tratados com mesmo tempo de exposição.49

Figura 15 Quantificação de proteínas totais solúveis pelo método de Bradford (1976) das macroalgas expostas a cobre acompanhada da curva padrão de BSA ($y = 1,2907x + 0,0055$; $R^2 = 0,9911$).....50

Figura 16 Atividade antioxidante não enzimática (GSSG, GSH e fitoquelatinas) de extratos de algas *Gracilaria domingensis* expostas a cobre e cádmio. Sendo: Cu CONAMA: grupo exposto à concentração recomendada pelo CONAMA, 5µg/L, Cu IC₅₀: grupo exposto à

concentração de 10,6 mg/L de cobre, Cd CONAMA: grupo exposto à concentração recomendada pelo CONAMA, 5µg/L, e Cd IC50: grupo exposto à concentração de 1,05 mg/L de cádmio; a: diferença significativa em relação ao controle. b: diferença significativa entre os grupos tratados.....52

Figura 17 Esquema das enzimas antioxidantes e antioxidantes não enzimáticos e sua atuação na presença de espécies reativas. Fonte: Artigo submetido de Zambotti-Villela et al. (2014).54

Figura 18 Macroalgas *Gracilaria domingensis* após 48 horas de exposição a cádmio e cobre. A: Grupo controle; B: Grupo exposto a cobre na concentração equivalente ao IC₅₀; C: Grupo exposto a cádmio na concentração equivalente ao IC₅₀. As setas são indicativas dos principais pontos afetados pela presença dos metais.....55

Figura 19 Atividade antioxidante não enzimática (GSH e GSSG) de extratos de algas *Gracilaria domingensis* expostas a cádmio e cobre. Sendo Cu IC₅₀: grupo exposto a concentração de 10,6 mg/L de cobre, Cd IC₅₀: grupo exposto a concentração de 1,05 mg/L de cádmio, Rec Cu IC₅₀: grupo exposto ao cobre e deixado em recuperação em meio de cultura livre do metal por 96 horas, Rec Cd IC₅₀: grupo exposto ao cádmio e deixado em recuperação em meio de cultura livre do metal por 96 horas. A: diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle.57

Figura 20 Macroalgas expostas a cádmio e cobre por 24 horas. De cima para baixo grupo controle, cobre e cádmio.....59

Figura 21 Macroalgas expostas a cádmio e cobre por 48 horas. De cima para baixo grupo controle, cobre e cádmio.....60

Figura 22 Macroalgas expostas a cádmio e cobre por 72 horas. De cima pra baixo grupo controle, cobre e cádmio.....61

Figura 23 Macroalgas expostas a cádmio e cobre por 96 horas. De cima pra baixo grupo controle, cobre e cádmio.....62

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Solução estoque de von Stosch modificada por Yokoya (1996)	25
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

γ Glu-Glu – gamma-L-glutamil-L-glutamato

APx – Ascorbato peroxidase

BSA – Soro albumina bovina

CAT – Catalase

CONAMA – Conselho Nacional do Meio Ambiente

CDNB – 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno

DGR – Daily growth rate (taxa de crescimento diário)

DNA – Ácido Desoxirribonucleíco

DTPA – Dietileno triamina penta diácido acético

EDTA – Ácido etilenodiamino tetra-acético

ERO – Espécies reativas de oxigênio

G6PDH – Glicose-6-fosfato desidrogenase

GPx – Glutathione peroxidase

GR – Glutathione reductase

GSH – Glutathione reduzida (composição: ácido glutâmico – cisteína – glicina)

GSSG – Glutathione oxidada

GST – Glutathione-S-Transferase

HPLC – High Performance Liquid Chromatography (cromatografia líquida de alta eficiência)

IC₅₀ – Inibição de crescimento em 50%

NADP⁺ - Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato

NADPH – Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato Reduzida

NEM – N-etilmaleimida

PC3 – Fitoquelatina 3 (γ -Glutamil-Cisteína)₃-Glicina)

PC4 – Fitoquelatina4 (γ -Glutamil-Cisteína)₄-Glicina)

PMSF – Fenilmetanosulfonil fluoreto

PVP – Polivinilpirrolidona

-SH – Sulfidril

SOD – Superóxido dismutase

t-BuOOH – terc-butil-hidroperóxido

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	10
LISTA DE TABELAS	14
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	15
INTRODUÇÃO	14
1. Contaminação do ecossistema aquático e a ecotoxicologia	14
3. Macroalgas do gênero <i>Gracilaria</i>	17
4. Biomarcadores de exposição e metabolização de xenobióticos	18
5. Legislação brasileira para metais no compartimento marinho	20
6. Aplicabilidade ambiental	21
OBJETIVO	23
METODOLOGIA	24
1. Cultivo das macroalgas	24
2. Taxa de crescimento	25
3. Protocolo de descontaminação	26
4. Definição do IC ₅₀	27
5. Testes para extração	28

6. Exposição a cobre	29
7. Processamento das amostras	30
8. Análise de biomarcadores e quantificação de proteínas	30
8.1 Catalase (CAT)	30
8.2 Glutathione-S-transferase (GST)	31
8.3 Glutathione Peroxidase (GPx)	32
8.4 Ascorbate Peroxidase (APx)	32
9. Quantificação de Proteínas	33
10. Teste com Fitoquelatinas, GSH e GSSG	33
11. Experimento Fitoquelatinas, GSH e GSSG	35
12. Processamento das amostras	35
13. Experimento de 48 horas com grupo de recuperação	36
14. Exposição a metais – Perfil temporal	37
15. Análises estatísticas	38
 RESULTADOS E DISCUSSÕES	 39
1. Cultivo das macroalgas e taxa de crescimento	39
2. Testes para extração	40
3. Exposição a cobre	42
4. Análise de biomarcadores	43
4.1 Catalase (CAT)	43
4.2 Glutathione Peroxidase (GPx)	45
4.3 Ascorbate Peroxidase (APx)	46
4.4 Glutathione-S-transferase (GST)	48

5. Quantificação de proteínas	49
6. Testes com Fitoquelatinas, GSH e GSSG	50
7. Experimento Fitoquelatinas, GSH e GSSG	51
8. Experimento de 48 horas com grupo de recuperação	54
9. Exposição de 48 horas com grupo de recuperação – Antioxidantes não enzimáticos	56
10. Exposição a metais – Perfil temporal	58
REFERÊNCIAS	64

INTRODUÇÃO

1. Contaminação do ecossistema aquático e a ecotoxicologia

A evolução industrial e tecnológica teve como consequência o aumento na exploração de compostos naturais e produção de compostos químicos. Anualmente, milhares de compostos químicos são produzidos unindo-se aos já existentes, visando suprir a constante demanda populacional, técnica e industrial, e atingem os compartimentos ambientais seja em sua forma original ou como produto de degradação (Foth, 1999; Mozeto e Zagatto, 2006).

A alta densidade populacional, em áreas geográficas próximas aos baixios de rios e regiões litorâneas, e sua crescente demanda contribui para que atividades urbanas, industriais e agrícolas estejam entre os principais responsáveis pela contaminação do ecossistema aquático, devido à quantidade de poluentes que introduzem nesse compartimento (Akcali e Kucuksezgin, 2011).

Compostos químicos atingem o ambiente aquático acidental ou propositalmente (p.ex. escoamento, através das precipitações, descarga de efluentes industriais e esgoto doméstico, derramamentos de petróleo) (Rashed, 2001) gerando efeitos negativos sobre o equilíbrio, e consequente degradação ambiental e ecológica. Além de, causar significantes mudanças no metabolismo de organismos que habitam o ecossistema, uma vez que grande parte dos compostos é considerada tóxica para esses organismos (Mann et al, 2009).

As classes de compostos que atingem o compartimento aquático são diversas, p. ex. hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, fertilizantes, praguicidas, metais, nanopartículas metálicas, e os compostos orgânicos sintéticos denominados ‘compostos emergentes’, dentre outras (Rashed, 2001; Dörr et al., 2014). No entanto, nos últimos anos, as crescentes descargas de efluentes no compartimento aquático contendo metais tem ganhado mais atenção devido à sua capacidade de gerar compostos metálicos persistentes e tóxicos, em alguns casos em quantidades traço, que podem bioacumular nos organismos e se biomagnificar (Zhou et al., 2008; DeForest et al., 2007), representando um risco inclusive para saúde humana, visto que alguns organismos marinhos estão inseridos no plano alimentar da população.

Muitos dos estudos relacionados a essa classe de xenobióticos, considerada a mais importante de origem antropogênica, avaliam os impactos produzidos nas áreas costeiras e

ambiente marinho, compartimentos ambientais mais susceptíveis aos metais, devido a sua proximidade com áreas urbanas (Naser, 2013).

A ecotoxicologia é a ciência que estuda as modalidades de contaminação do ambiente, mecanismos de ação e os efeitos adversos causados pelos compostos químicos nos indivíduos, e conseqüentemente em populações, comunidades e ecossistemas (Ramade, 1977; Walker et al., 2012). E em conjunto com análises químicas e físicas, a ecotoxicologia é uma ótima ferramenta para avaliação e prevenção de risco ambiental.

2. Metais cobre (Cu) e cádmio (Cd)

Alguns metais possuem ocorrência natural no ambiente, para tanto, é importante ser capaz de distinguir entre os níveis naturais e contaminações de origem antropogênica (Akcali e Kucuksezgin, 2011). A mineração e processos industriais envolvendo metais são as principais fontes de contaminação no ambiente aquático. Como consequência o ciclo natural dos metais tem sido afetado e acelerado por esses processos, pois muitas vezes a quantidade de metais proveniente das fontes antropogênicas supera a proveniente de fontes naturais, gerando danos nesse ecossistema (Bjerregaard e Andersen, 2008). Existem também fontes mais difusas de contaminação como a deposição atmosférica (contendo metais provenientes da queima de combustíveis fósseis, incineração do lixo e processo de fundição de metais).

Outras fontes conhecidas de liberação de metal no meio aquático, no caso, de cobre, foram emissões deliberadas do metal usado devido a suas propriedades herbicidas para evitar o crescimento de algas, ou na piscicultura para tratar infecções nas brânquias dos peixes causadas por parasitas (Bjerregaard e Andersen, 2008). Além disso, o metal está presente na composição de tintas anti-incrustantes aplicadas nos cascos das embarcações para evitar que mexilhões e outras espécies fiquem aderidos, evitando assim a redução da vida útil das embarcações e aumento dos custos. O cobre foi adotado como biocida principal, geralmente na forma de tiocianato de cobre (CuCHNS) ou óxido cuproso (Cu_2O), em substituição ao tributilestanho (TBT). Diversos estudos analisam os efeitos e impactos desse metal, devido aos altos níveis detectados em áreas de intensa operação naval, devido à liberação constante de íons do metal (Cu^+) na água que sofrem oxidação tornando-se íons cúpricos (Cu^{2+}), forma prevalente no ambiente marinho (Martins e Vargas, 2013).

A toxicidade de um composto está relacionada à sua capacidade de causar danos ao organismo, no caso dos metais essa toxicidade irá variar de acordo com uma série de fatores, dentre eles a concentração e especiação do metal, ou seja, forma em que ele se encontra no meio e que dependerá de fatores ambientais como pH, quantidade de material particulado, salinidade e temperatura, dentre outros (Sigg, 2014). A especiação tem papel fundamental na biodisponibilidade, organismos como algas e bactérias, por exemplo, são capazes de absorver metais na forma iônica.

Os metais encontrados no ambiente são classificados em dois grupos, os essenciais (p. ex. cobre, zinco, ferro e manganês) e não essenciais (p. ex. cádmio, mercúrio e chumbo) aos organismos. No entanto, mesmo metais essenciais com importantes papéis metabólicos, quando em níveis elevados podem promover danos no organismo (Bjerregaard e Andersen, 2008).

O cobre (Cu) é um micronutriente essencial, componente de várias enzimas, especialmente as envolvidas no transporte de elétrons na fotossíntese, cofator de enzimas como a superóxido dismutase (SOD), amino-oxidase e citocromo *c* oxidase e ainda necessário para o funcionamento de diversas proteínas (Genter et al., 1996; Halliwell e Guttridge, 2007). Porém, também é responsável pela produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) através da reação de Fenton (Figura 1), e em altas concentrações pode ser danoso, se os níveis de ERO superarem a capacidade antioxidante das defesas em algas (Contreras et al, 2009). Quando em excesso, o metal é capaz de interferir na taxa de fotossíntese, perturbar o transporte de elétrons no fotossistema II, reduzir a concentração de pigmentos, induzir a perda de cátions, afetar a permeabilidade da membrana plasmática e restringir a taxa de crescimento de organismos fotossintetizantes. Relata-se ainda que, o metal reduz a taxa de absorção de nitrato e a produção de nitrato redutase, enzima responsável pela redução de nitrato a nitrito, nesses organismos (Connan e Stengel, 2011).

Figura 1 (1) Reação de Fenton e (2) formação de radical hidroxila a partir de H_2O_2 na presença de íons de cobre (Cu^+).

O cádmio (Cd) encontra-se na maior parte dos casos como menor componente em pigmentos, plásticos, soldas, fertilizantes, além de ser um componente natural de rochas, solos e sedimentos. Queima de carvão, fundição de sucata e incineração de lixo também são fontes de cádmio, o mesmo é inserido no compartimento atmosférico, e posteriormente atinge o compartimento aquático por deposição de material particulado (Bjerregaard e Andersen, 2008).

Trata-se de um metal tóxico não essencial que pode deslocar ou substituir metais essenciais, interferindo no bom funcionamento de enzimas e cofatores associados. Assim como o cobre, pode aumentar a produção de ERO e ocasionar danos no sistema antioxidante, e a interrupção no transporte de elétrons na respiração e fotossíntese (Okamoto e Colepicolo, 1998). Sabe-se ainda que o cádmio é um dos mais fortes indutores de fitoquelatinas em algas (Volland et al., 2013).

3. Macroalgas do gênero *Gracilaria*

Brasil possui extensa área costeira, que abriga uma variedade enorme de espécies, incluindo macroalgas, organismos de interesse desse estudo. As macroalgas desempenham papel fundamental no ciclo biogeoquímico através da transformação de energia e ciclagem de nutrientes, são responsáveis pela oxigenação do meio aquático, e servem de alimento e habitat para algumas espécies (Gressler et al, 2011). Além do papel ecológico, esses organismos também possuem importante papel econômico, sendo responsáveis por sintetizar uma série de compostos utilizados nas indústrias farmacêutica (p. ex. produção de antimicrobianos, antitumorais), alimentícia (ricas em proteínas, ácidos graxos, vitaminas e minerais) e de cosmético (p. ex. produção de filtros solares), dentre outros setores. E atualmente, uma série de pesquisas está voltada para o metabolismo desses organismos visando novas aplicações econômicas, de caráter bionergético inclusive (Cardozo et al, 2007).

Esses organismos estão sujeitos a uma série de danos causados pela proximidade com os centros urbanos, uma vez que as áreas costeiras devido a sua localização recebem aporte maior de contaminantes (Akcali e Kucuksezgin, 2011).

As macroalgas são divididas em três classes: verdes, pardas e vermelhas. O estudo em questão possui como foco a espécie *Gracilaria domingensis*, uma macroalga vermelha

(família Rodófitas) do gênero *Gracilaria*. Esse gênero está distribuído amplamente pelo mundo, sendo a maior parte das espécies encontrada em regiões tropicais e temperadas. Dentro dele algumas espécies (inclusive a *Gracilaria domingensis*) se destacam por seu alto valor comercial como fonte de ágar, e sua utilização no ramo alimentício. Além disso, as espécies desse gênero durante o metabolismo secundário produzem compostos que tem sido isolados e aplicados como antimicrobianos, antitumorais e antioxidantes (Tonon et al, 2011). Pode-se concluir, portanto, que o potencial desse gênero é imenso, havendo muito ainda a ser pesquisado. E as aplicabilidades não se restringem apenas a práticas econômicas, esse gênero pode ser utilizado também para fins ambientais, p. ex. biorremediação.

Macroalgas são capazes de absorver metais presentes no meio aquático quando os mesmos encontram-se na forma iônica, através da mobilização deles em seus vacúolos, tornando-os menos biodisponíveis e tóxicos ao ecossistema. Devido a essa característica, as algas podem conter em seu organismo concentrações de metais milhares de vezes maiores do que encontradas no ambiente. No entanto, apesar do potencial das macroalgas na área ambiental, é necessário estar atento ao fenômeno de biomagnificação, uma vez que as mesmas encontram-se inseridas na cadeia alimentar, e podem afetar inclusive os seres humanos, já que estão envolvidas em outros fins.

A presença dos metais no organismo pode desencadear uma série de reações no sistema antioxidante e nas enzimas responsáveis pela metabolização de xenobióticos (Contreras et al, 2009). E essas alterações podem ser observadas através de análises e quantificação das atividades enzimáticas e dos antioxidantes envolvidos no metabolismo.

4. Biomarcadores de exposição e metabolização de xenobióticos

Inúmeras estratégias podem ser utilizadas para avaliar o nível de contaminação do ambiente aquático, dentre elas análises químicas e identificação dos contaminantes presentes no sedimento, água e nos organismos. No entanto, as análises químicas apresentam algumas desvantagens como o uso de padrões analíticos de alto custo, análises demoradas e que são capazes de mostrar apenas os efeitos dos contaminantes no compartimento ambiental e não nos organismos aquáticos. Outro recurso é a utilização de biomarcadores de contaminação que são capazes de mostrar os efeitos da presença dos contaminantes no organismo.

Biomarcadores podem ser definidos como qualquer resposta biológica correspondente a uma exposição, efeito ou susceptibilidade dos indivíduos aos agentes químicos e/ou estressores ambientais (Azevedo e Chasin, 2003).

De acordo com Walker (1996), a análise de biomarcadores de contaminação é o estudo das alterações biológicas a nível molecular, celular ou fisiológico em organismos que residem em áreas com suspeita de contaminação, e que expressam a exposição e os efeitos tóxicos causados pelos poluentes presentes no ambiente. Devido à característica de absorção das macroalgas, esses organismos têm sido considerados potenciais bioindicadores de contaminação por metais, e suas respostas metabólicas à presença dos contaminantes possíveis biomarcadores.

O processo de metabolização de xenobióticos ocorre em três fases: a primeira consiste na transformação, e é realizada principalmente pelas mono-oxigenases do citocromo P450; a segunda é a fase de conjugação, realizada principalmente pela glutathione-S-transferase e glicosiltransferases; e a terceira é a fase de compartimentação (Pflugmacher et al., 1999).

O metabolismo de xenobióticos é composto por uma série de reações superprodutoras de espécies reativas de oxigênio (p. ex. o radical hidroxila, $\cdot\text{OH}$; radical ânion superóxido, $\text{O}_2^{\cdot-}$; e o peróxido de hidrogênio, H_2O_2).

Considerando que dentre os biomarcadores de contaminação, os que mais se destacam são aqueles que geram uma situação de estresse oxidativo no organismo, a avaliação das enzimas responsáveis pela biotransformação dos xenobióticos e defesas antioxidantes é capaz de fornecer valiosas informações sobre os efeitos causados pela presença do contaminante no organismo (López-Barea e Pueyo, 1998; López-Barea, 2000).

Ao longo da metabolização de xenobióticos, a ação do complexo multienzimático P450, das reações ciclo-redox e de diversas mono-oxigenases geram ERO como subprodutos. Essas espécies podem reagir com distintos alvos celulares ocasionando lesões oxidativas nas macromoléculas, como DNA, proteínas e membranas (Rodríguez-Ariza et al., 1993; Almeida et al., 2003).

O organismo para se proteger contra essas ERO e minimizar ou impedir os efeitos do estresse oxidativo, possui em suas células sistemas de defesa antioxidante, como a catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx) e a ascorbato peroxidase (APx) que são responsáveis pela detoxificação do H_2O_2 e peróxidos orgânicos, e a superóxido dismutase (SOD) que reduz o $\text{O}_2^{\cdot-}$ a H_2O_2 (Almeida et al., 2006). Considerando que, o aumento na produção de ERO pode causar alterações nos níveis e atividades dos sistemas de defesa antioxidante, ao ocorrerem

alterações nos organismos provenientes de áreas com suspeita de contaminação, tem-se um possível indicativo da presença de contaminantes no ambiente.

A glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH) é considerada uma enzima antioxidante coadjuvante, responsável pelo fornecimento de equivalentes redutores (NADPH) através da transferência de um íon hidreto ao NADP^+ , que posteriormente será utilizado pela glutathione redutase (GR) para a restauração dos níveis adequados de glutathione reduzida (GSH).

Produtos lipofílicos da biotransformação de alguns xenobióticos podem ser conjugados com a GSH pela enzima de fase II glutathione-S-transferase (GST), formando compostos mais solúveis e de fácil excreção (Trídico et al., 2010). É uma vez que a GSH é uma importante doadora de elétrons para várias enzimas, as concentrações intracelulares da mesma devem ser mantidas em níveis adequados para evitar prejuízos celulares. A GR auxilia na manutenção do estado redox intracelular evitando a depleção da GSH e o aumento da glutathione oxidada (GSSG) (Sies e Moss, 1978; Halliwell e Gutteridge, 2007).

As macroalgas, como mencionado anteriormente, são capazes de ligar-se a metais, e na presença dos mesmos a GSH atua contra espécies pró-oxidantes, e é um ligante intracelular de metais, causando possíveis alterações em seus níveis e por consequência de outros parâmetros (Malea et al., 2006).

Outro parâmetro indicativo de estresse oxidativo devido à presença de metais, e que caracterizam bons biomarcadores em algas são as fitoquelatinas, uma família de pequenas proteínas ricas em cisteína enzimaticamente envolvidas no acúmulo e detoxificação de cádmio, zinco, cobre e outros metais. Elas consistem em repetições de unidades de γ -glutamilcisteína e são sintetizadas a partir da GSH (Halliwell e Gutteridge, 2007). Elas são responsáveis pelo sequestro e quelação de metais, essenciais ou não essenciais, através de ligantes e mecanismos particulares, promovendo assim a detoxificação dos mesmos (Cobbet e Goldsbrough, 2002). A presença de metais ou ERO promove aumento na síntese de fitoquelatinas visando evitar ou minimizar os danos no organismo.

5. Legislação brasileira para metais no compartimento marinho

O Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) é um órgão consultivo e deliberativo do Sistema Nacional do Meio Ambiente (SISNAMA), cujos principais

instrumentos são suas Resoluções. Através de tais resoluções são estabelecidas normas, critérios e padrões que visam controle e manutenção da qualidade do ambiente, considerando o uso racional de recursos ambientais (Ministério do Meio Ambiente, 2016).

A Resolução CONAMA 357/2005 “Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências”. E no que diz respeito às águas salinas, ela as classifica de acordo com quatro classes, sendo essas especial, classe 1, classe 2 e classe 3. A classe especial é destinada às águas para preservação dos ambientes aquáticos em unidades de conservação de proteção integral e preservação do equilíbrio natural das comunidades aquáticas. A classe 1 é destinada às águas que podem ser utilizadas para recreação de contato primário, proteção das comunidades aquáticas e aquicultura e atividade de pesca. A classe 2 é destinada às águas para pesca amadora e recreação de contato secundário. E por fim, a classe 3 é destinada somente às águas para navegação e harmonia paisagística.

De acordo com a Resolução CONAMA 357/2005 as concentrações permitidas para os metais cobre e cádmio, de acordo com a classificação das águas são:

- Classe 1: 0,005 mg/L de cobre dissolvido e 0,005 mg/L de cádmio total;
- Classe 2: 7,8 µg/L de cobre dissolvido e 0,04 mg/L de cádmio total;

E no que diz respeito ao lançamento de efluentes contendo tais metais, a Resolução CONAMA 430/2011 que dispõe sobre as condições e padrões de lançamento de efluentes, e complementa e altera o que consta na Resolução CONAMA 347/2005 nesse quesito, determina que a concentração máxima permitida para cádmio total é de 0,2 mg/L e para cobre dissolvido é de 1,0 mg/L. Podendo as fontes poluidoras lançarem seus efluentes diretamente no corpo receptor, desde que a cumpra com sua responsabilidade de tratar os efluentes previamente para que os mesmos obedeçam as condições e padrões previstos nas Resoluções CONAMA mencionadas.

6. Aplicabilidade ambiental

Considerando a importância econômica das macroalgas do gênero *Gracilaria*, e sua ocorrência nas zonas costeiras, as áreas mais afetadas pela industrialização, agricultura, e

urbanização, a avaliação dos impactos causados pela presença de metais nesse ambiente é de extrema necessidade. No entanto, a literatura apresenta poucos estudos de avaliação de biomarcadores realizados com macroalgas da espécie *Gracilaria domingensis*, sendo o presente estudo, uma tentativa de definir melhor os processos de biotransformação e detoxificação dos metais de interesse nesses organismos. E fazer com que os mesmos além de serem considerados importantes para o mercado alimentício, sejam vistos como bons bioindicadores da presença de metais, e contribuam posteriormente como biorremediadores em áreas impactadas pela presença de metais.

Como mencionado anteriormente, a espécie de macroalga selecionada para esse estudo foi a *Gracilaria domingensis* (Kützinger) Sonder ex Dickie, uma das espécies mais comuns e amplamente distribuídas na costa brasileira, desde a região nordeste a sul. Destacando sua presença principalmente na região Nordeste do Brasil, onde há ocorrência de fazendas de cultivo de algas do gênero *Gracilaria*, que contribuem para economia local. Portanto, analisando através da perspectiva de distribuição geográfica a espécie é ótima candidata para futuros processos de biorremediação.

OBJETIVO

Objetivo principal

O presente estudo tem como objetivo principal avaliar os efeitos dos metais cobre e cádmio em macroalgas da espécie *Gracilaria domingensis* após exposições por períodos variados através da análise de biomarcadores, e definição de mecanismos de detoxificação e estocagem de metais nesses organismos.

Objetivos específicos

- Cultivo das macroalgas da espécie;
- Otimização do processo de extração para biomassa algal fresca;
- Padronização dos ensaios enzimáticos para a espécie de estudo;
- Determinação do IC₅₀ para os metais Cu e Cd *Gracilaria domingensis* cultivada em água do mar enriquecida com solução de *von Stosch*;
- Quantificação dos metais na macroalga;
- Avaliação de parâmetros antioxidantes;
- Determinação de um perfil temporal para produção de fitoquelatinas.

METODOLOGIA

1. Cultivo das macroalgas

Para realização dos experimentos propostos nesse estudo foram utilizadas macroalgas vermelhas da espécie *Gracilaria domingensis* (Figura 2). As amostras para o início do cultivo foram gentilmente cedidas pelo Grupo de Pesquisa em Ficologia do Instituto de Botânica de São Paulo. As amostragens foram realizadas ao longo da costa brasileira (Santa Catarina e Espírito Santo), e as algas foram identificadas morfológicamente e foram feitas exsiccatas para depósito no herbário do Instituto de Botânica de São Paulo, SP.

Figura 2: Macroalgas *Gracilaria domingensis*

O cultivo foi iniciado com alguns ápices de aproximadamente 1 a 1,5 cm com biomassa total de 300 mg mantidos em 150 mL de água do mar enriquecida com *von Stosch*. A solução de *von Stosch* foi preparada de acordo com Edwards (1970) com modificações segundo Yokoya (1996), e utilizou-se 4 mL de solução para 1 L de água do mar (Tabela 1). As algas foram mantidas na sala de cultivo da Seção de Ficologia do Instituto de Botânica sob condições controladas (temperatura de 23 ± 2 °C, fotoperíodo 14 horas, 60 a 90 mmol de fótons. $\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) até atingir biomassa suficiente para realização dos experimentos.

Tabela 1 Solução estoque de von Stosch modificada por Yokoya (1996)

Sais	Diluição (água deionizada)	Concentração final
NaNO ₃	5,3125 g/ 100 mL	0,50 mM
Na ₂ HPO ₄ . 12H ₂ O	1,3438/100 mL ou 0,532 g Na ₂ HPO ₄	30 µM
MnCl ₂ .4H ₂ O	0,00248 g/ 100 mL	0,1 µM
Na ₂ EDTA.2H ₂ O FeSO ₄ .7H ₂ O	0,4650g 0,0348g Juntar os dois e diluir em 100 mL	10 µM 1 µM
Vitaminas	Concentração da solução estoque	
Tiamina	0,0195g/100 mL (Final 100µg)	0,59 µM *
Biotina	0,000625 g (Final 0,5 µg)	4,10 nM *
Cianocobalina	0,000625 g (Final 0,5 µg)	1,0 nM *

*Concentração equivalente a 50% em relação à composição original proposta por Edwards (1970).

Para manter o cultivo e crescimento da biomassa o meio com os nutrientes necessários foram trocados semanalmente e durante um mês foi avaliada a taxa de crescimento dos organismos.

2. Taxa de crescimento

A taxa de crescimento diário (DGR) foi avaliada a partir da proporção entre a variação de biomassa e o tempo em dias. Portanto a DGR em porcentagem foi estimada a partir da

diferença entre o logaritmo natural da medida final e inicial de massa fresca (em g) dividida pelo intervalo de dias entre as medidas, e multiplicada por 100, de acordo com Raikar et al. (2001)

No cultivo em questão, durante cinco semanas a taxa de crescimento das algas foi monitorada, através do registro da biomassa semanal e calculada através da equação, a seguir:

$$\text{DGR (\%)} = \frac{\log n (\text{biomassa final}) - \log n (\text{biomassa inicial})}{\text{Tempo em dias} \times 100}$$

3. Protocolo de descontaminação

Anteriormente ao cultivo na Seção de Ficologia do Instituto de Botânica, foi iniciado cultivo nas dependências do Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular de Algas. No entanto, ao atingir a biomassa de aproximadamente 9 g, a cultura desenvolveu uma contaminação por microalgas. Trata-se de um fenômeno comum, ao realizar coletas de ambientes marinhos, mesmo após triagem, as macroalgas ainda podem conter microalgas junto a sua biomassa, e tais microalgas possuem períodos de afloramento ao longo do ano.

Inicialmente tentou-se a inserção de dióxido de germânio e ampicilina no meio. No entanto, a presença dos compostos não provocou modificações, permanecendo assim a contaminação. A solução encontrada foi um processo físico, que consistiu na remoção de toda biomassa contaminada, mantendo apenas os ápices saudáveis. A partir desses ápices saudáveis deu-se início a uma série de procedimentos.

Frascos autoclavados foram selecionados, e preenchidos com um volume bem baixo, cerca de 30 mL, de água do mar. Cada frasco continha apenas 5 ápices previamente limpos com o auxílio de um pincel e uma lupa. Diariamente, foi realizada a troca do meio (contendo apenas água do mar) e o procedimento de limpeza com lupa e pincel, sendo sempre removidos os ápices mortos e pedaços contaminados com auxílio de um bisturi. Todo material utilizado durante o processo de descontaminação foi esterilizado em álcool e chama da lamparina (p. ex. pinças, bisturis, lâminas de bisturi).

Trata-se de um processo extenso, tendo levado alguns meses para que a cultura assumisse caráter estável, no entanto muitos dos ápices não sobreviveram.

Com o desaparecimento da contaminação as algas voltaram a ser mantidas em água do mar enriquecida com *von Stosch*. Durante o período de descontaminação e recuperação das algas não houve geração eficaz de biomassa, devido à baixa taxa de crescimento diário. Sendo assim, optou-se por manter as algas em recuperação no banco de algas e realizar um novo cultivo nas dependências do Instituto de Botânica a partir de algas que eram mantidas no banco de algas do Setor de Ficologia. O início do novo cultivo nas dependências do Instituto de Botânica fez com que as algas em recuperação presentes nas dependências do Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular de Algas se recuperassem completamente e fossem mantidas no banco do laboratório.

4. Definição do IC₅₀

A concentração definida para realização dos experimentos de exposição ao cobre e cádmio foi relativa ao IC₅₀ e a concentração recomendada pelo CONAMA na Resolução CONAMA 357/2005 para águas salinas de classe 1 para os metais em questão (5µg/L para cobre e cádmio).

Anteriormente a realização dos experimentos fez-se necessário então definir dos valores de IC₅₀ (concentração capaz de inibir em 50% o crescimento da alga) do cobre e cádmio para espécie *Gracilaria domingensis*. Os valores utilizados como referência para construção da curva de IC₅₀ inicial foram retirados do estudo realizado por Mendes et al (2013) que prevê a toxicidade dos metais para algas da mesma espécie, no entanto cultivadas em meio sintético. Os metais cobre e cádmio foram obtidos a partir dos sais CuSO₄ . 5 H₂O e 3 CdSO₄ . 8 H₂O. Seguintes concentrações do metal foram utilizadas:

- Para cobre: 20; 40; 60; 80 mg/L;
- Para cádmio: 1,0; 3,0; 3,6; 4,0; 7,0 mg/L.

Aproximadamente 20 mg de algas (preferencialmente os ápices) foram selecionados e colocados em frascos contendo 34 mL de água do mar enriquecida com *von Stosch* para aclimação por cinco dias. Após o período de aclimação as algas foram novamente pesadas e tiveram sua massa registrada, o meio foi trocado, e o pH foi medido antes da inserção dos

metais nas concentrações mencionadas, e posteriormente foi realizada a exposição por 48 horas das triplicatas.

Paralelamente ao experimento com IC_{50} as concentrações utilizadas na curva foram adicionadas nas mesmas condições em outros frascos com água do mar enriquecida com *von Stosch*, porém sem a presença das algas e enviadas para Central Analítica para quantificação do metal na água por Espectrometria de Emissão Ótica com Plasma Indutivamente Acoplado (ICP-OES). O objetivo desse procedimento foi confirmar se a concentração nominal do metal era equivalente à concentração real do metal no meio.

Os resultados enviados pela Central Analítica proporcionaram o ajuste dos cálculos do IC_{50} de acordo com as concentrações reais do metal na água. E em conjunto com os resultados obtidos a partir da primeira curva de IC_{50} , foi possível definir os novos pontos (concentrações) para confecção da curva de IC_{50} a serem utilizados nos outros experimentos. Sendo as concentrações reais utilizadas:

- Para o cobre: 4,73; 5,00; 9,46; 10,00; 12,30; 18,92; 20,00; 37,84, 40,00 mg/L.
- Para o cádmio: 0,70; 1,39; 2,09; 2,50; 2,78; 4,87 mg/L.

A confecção da curva final de IC_{50} foi realizada a partir de um total de 46 experimentos com duração de sete dias (sendo cinco dias de aclimação e dois dias (48 horas) de exposição aos metais). O objetivo do alto número de experimentos foi reduzir os erros provenientes da utilização de um meio de cultivo semiconhecido (água do mar), aumentando a quantidade de réplicas biológicas e experimentais. A partir de todos os experimentos realizados foi possível calcular os valores estatisticamente mais significativos dentro de um intervalo de confiança de 95%.

5. Testes para extração

Para realização dos testes foram selecionadas duas metodologias de extração, a primeira de acordo com Collén et al (2003) e a segunda de acordo com Aguilera et al (2002). As macroalgas utilizadas no procedimento foram amostras armazenadas anteriormente à temperatura de - 80 °C.

Inicialmente as macroalgas foram pesadas e separadas em microtubos contendo 100 mg em cada e posteriormente foram trituradas em nitrogênio líquido com o auxílio de um

almofariz e pistilo. As amostras trituradas foram dissolvidas em duas soluções diferentes, uma contendo tampão fosfato 50 mM pH 7,0 e kit completo inibidor de protease com diluição de 1:10 (comprimido/v). E outra contendo tampão fosfato 50 mM pH 7,0, fenilmetanosulfonil fluoreto (PMSF) 1 mM e polivinilpirrolidona (PVP) 1%, a metodologia de Collén et al. utiliza ainda Triton X-100, no entanto o mesmo foi retirado deste protocolo pois pode haver influência do mesmo durante a determinação proteica pelo método de Bradford (1976). Posteriormente foram centrifugadas por 20 minutos a 4 °C e 14.000 rpm, o sobrenadante foi coletado e armazenado a - 20 °C para posteriores análises enzimáticas e quantificação proteica. O mesmo método de extração foi feito para biomassas de 200 e 300 mg dissolvidos em 1 mL de meio, respectivamente.

6. Exposição a cobre

Definidos os valores de IC_{50} para os metais. Estabeleceu-se que as exposições posteriores seriam realizadas com os valores equivalentes ao IC_{50} e a metade do valor de IC_{50} de cada metal. Sendo os valores de IC_{50} para o cobre 10,6 mg/L e $\frac{1}{2} IC_{50}$ 5,3 mg/L, e os valores de IC_{50} para o cádmio 1,05 mg/L e $\frac{1}{2} IC_{50}$ 0,525 mg/L. Inicialmente selecionou-se o cobre para o primeiro experimento e os períodos de exposição definidos foram: 1, 24 e 48 horas. Um dos objetivos desse experimento foi verificar quão responsivo os antioxidantes do organismo eram na presença do metal

A utilização de metade do valor de IC_{50} visa observar os efeitos causados pelos metais em uma concentração na qual ainda não é visualizada uma redução tão pronunciada na taxa de crescimento diário da espécie.

As exposições foram realizadas em triplicada, com frascos contendo aproximadamente 100 mg de biomassa em 170 mL de água do mar enriquecida com *von Stosch* (manteve-se a proporção de biomassa/mL utilizada nos experimentos de determinação do IC_{50}). As algas para o experimento tiveram como critério de seleção a heterogeneidade (talos, ápices e ápices bifurcados), após a seleção as mesmas foram pesadas e passaram por um período de aclimação de cinco dias. Após esse período o meio foi trocado, as algas passaram por nova pesagem. O pH do meio foi medido antes da inserção dos metais, e a temperatura foi monitorada diariamente durante o experimento mantendo-se em 25 °C. Após a coleta as algas

foram pesadas e congeladas em nitrogênio líquido, e armazenadas a - 20 °C até seu processamento.

7. Processamento das amostras

O processamento das amostras foi feito através da trituração da massa fresca em nitrogênio líquido com o auxílio de um pistilo e almofariz, e posterior adição do meio de extração e centrifugação.

A metodologia de extração utilizada foi a de Collén et al (2003) modificada com o meio de extração contendo tampão fosfato 50 mM pH 7,0, PMSF 1 mM e 1% de PVP. Sendo utilizado 1 mL para cada 100 mg de massa fresca triturada.

Após a adição do meio de extração à biomassa, as amostras foram vortexadas por alguns segundos para homogeneização. E centrifugadas a 14.000 rpm por 20 minutos a 4 °C, e o sobrenadante foi coletado e armazenado a - 20 °C para análises futuras.

8. Análise de biomarcadores e quantificação de proteínas

8.1 Catalase (CAT)

A atividade da CAT foi medida através do método de Aebi (1984), quantificando a velocidade de decomposição do H_2O_2 pela enzima através do decréscimo de absorbância em 240 nm durante cinco minutos, a 25 °C, como demonstrado na reação geral (Figura 3).

Foram diluídos 30 μ L de H_2O_2 (30%) para cada 10 mL de solução de tampão fosfato 50 mM pH 7,0 e essa solução foi utilizada como meio de reação. O volume final do meio de reação foi 2 mL, e a quantidade de amostra variou de 20 a 50 μ L de amostra por mL de meio. O espectrofotômetro foi calibrado com a solução tampão presente no meio.

Inicialmente realizou-se uma medida com um controle positivo contendo uma solução padrão de catalase e posteriormente todas as medidas foram feitas na presença de um controle negativo contendo solução tampão e amostra, e eventualmente solução tampão com substrato para verificar se o mesmo estava sendo degradado com o passar do tempo.

Figura 3: Reação de decomposição do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em oxigênio (O_2) pela enzima antioxidante catalase.

8.2 Glutathione-S-transferase (GST)

A atividade da GST foi realizada de acordo com a metodologia de Habig et al (1974), quantificando a formação do conjugado de 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) com glutathione reduzida (GSH) catalisados pela GST presente nas amostras (Figura 4). O aumento da absorbância foi acompanhado durante 3 minutos a 340 nm e 25 °C.

Foram dissolvidos 0,1 M de CDNB em etanol, e 0,1 M de GSH em tampão fosfato 0,1 M pH 6,5. O volume final do meio de reação foi 1 mL, sendo 960 µL de tampão fosfato 0,1 M pH 6,5 com DTPA 5 mM, 10 µL de CDNB, 10 µL de GSH e 20 µL de amostra.

O espectrofotômetro foi calibrado com a solução tampão presente no meio. E todas as medidas foram feitas na presença de um branco contendo todos os componentes exceto a amostra.

Figura 4: Reação de formação do complexo CDNB na presença de GST.

8.3 Glutationa Peroxidase (GPx)

A atividade da GPx foi avaliada de acordo com a metodologia de Flohé (1984), durante a reação é monitorado o consumo de NADPH durante 5 minutos a 340 nm. Trata-se de uma medida indireta, na qual a GPx presente na amostra irá oxidar a GSH a GSSG ao reduzir o terc-butil hidroperóxido (t-BuOOH) presente no meio, e em seguida o NADPH será consumido para a produção de GSH (Figura 5).

A GSH 10 mM foi dissolvida em água destilada, o NADPH 1,5 mM foi dissolvido em NaHCO₃ 0,1% e a GR 2,4 U/mL foi dissolvida em tampão.

O espectrofotômetro foi calibrado utilizando tampão fosfato 0,1 M pH 7,0. O meio de reação foi composto por 100 µL de GSH 10 mM, 100 µL NADPH 1,5 mM, 100 µL de glutathiona redutase (GR) na concentração de 2,4 U/mL, 30 µL de amostra, em 570 µL de tampão fosfato 0,1 M, pH 7,0 com EDTA 1 mM totalizando em 1 mL.

Figura 5: Reações de oxidação da GSH pela GPx e redução da GSSG pela GR mediante a presença e oxidação de NADPH.

8.4 Ascorbato Peroxidase (APx)

A atividade da APx foi avaliada através da metodologia de Nakano e Asada (1981). Durante a reação avalia-se o consumo de H₂O₂ na presença de ascorbato através do decaimento no valor da absorbância (Figura 6). A atividade da antioxidante foi monitorada por 3 minutos a 340 nm e 25 °C.

Foram dissolvidos 0,5 mM de ascorbato de sódio em 100 mL de tampão fosfato 50 mM pH 7,0, e 30 mM de H₂O₂ em outros 100 mL de tampão fosfato. O espectrofotômetro foi

calibrado com o tampão utilizado no meio. A quantidade de meio reacional totalizou em 2 mL sendo um para cada mistura de tampão para o branco, e 960 µL de tampão com ascorbato, 1 mL de tampão com H₂O₂ e 40 µL de amostra.

Figura 6 Reação geral catalisada pela Ascorbato Peroxidase.

9. Quantificação de Proteínas

A quantificação de proteínas foi feita pelo método de Bradford (1976). O reagente de Bradford contém o corante *Coomassie Brilliant Blue G-250*, em solução ácida, este ao se ligar às proteínas, tem sua absorbância alterada de 465 nm para 595 nm devido à mudança de coloração de castanho para tons de azul de acordo com a concentração da proteína, consequência da interação entre a proteína e corante que estabiliza a forma aniônica do corante.

O valor de absorbância é determinado por espectrofotometria em 595 nm e a comparação dos resultados com a curva analítica, com valores de concentração conhecidos, fornecem a concentração da proteína em estudo. A curva padrão foi feita com soro albumina bovina (BSA) preparada através de diluições seriadas (Concentrações de 0,031; 0,062; 0,125; 0,250; 0,5 mg/L). E as amostras e curva padrão tiveram sua absorbância quantificada com o auxílio de uma leitora de microplacas.

10. Teste com Fitoquelatinas, GSH e GSSG

Um experimento piloto foi promovido utilizando o valor inicial de IC₅₀ encontrado para o cobre sem os ajustes de cálculos fornecidos pelos resultados da Central Analítica, ou seja, na concentração de 14 mg/L de cobre. Esse experimento teve como objetivo quantificar as fitoquelatinas, GSH e GSSG após uma exposição ao metal de 48 horas.

Inicialmente foram cortados talos de aproximadamente 1 cm e pesados contendo cerca de 20 mg de algas por frasco (triplicatas de grupo controle e IC₅₀) e adicionados 34 mL de água do mar enriquecida com *von Stosch*. As algas passaram por um período de aclimação de cinco dias, e antes de serem submetidas ao experimento foram pesadas novamente e tiveram sua massa registrada. A temperatura da incubadora foi monitorada ao longo do experimento e permaneceu em 25 °C.

Após as 48 horas de exposição, as algas foram coletadas, pesadas novamente e congeladas em nitrogênio líquido. Posteriormente as amostras foram trituradas com o auxílio de um moinho de bolas.

Ao pó obtido como resultado da trituração de cada amostra houve adição de metanol, N-etilmaleimida (NEM) 1M (responsável por impedir a oxidação da GSH, trata-se de um inibidor irreversível de todas as cisteínas peptidases) e da solução padrão γ Glu-Glu (25 μ g/mL) e houve mais uma trituração com auxílio de um pistilo. Posteriormente as amostras foram sonicadas por 5 minutos, foi adicionado ao meio clorofórmio e água, vortexado por 15 segundos, e centrifugado a 14.000 rpm durante 3 minutos a 4 °C.

O sobrenadante da centrifugação foi coletado, 50 μ L do extrato foi reservado para quantificação de proteína, e 300 μ L foram utilizados para quantificação de fitoquelatinas, GSH e GSSH.

As análises de fitoquelatinas, GSSG e GSH foram efetuadas em um HPLC acoplado em um espectrômetro de massas com detector triplo quadrupolo. A coluna utilizada foi uma C18 com gradiente, iniciando em 100% de solvente A (água, ácido fórmico e acetato de amônio) e aumentando até os 14% de solvente B (acetonitrila).

As amostras reservadas para quantificação proteica foram submetidas à 40 minutos no speed-vac para evaporação do metanol, e posteriormente resuspendidas em 50 μ L de água deionizada.

11. Experimento Fitoquelatinas, GSH e GSSG

O experimento foi realizado utilizando as concentrações equivalentes ao IC₅₀ para os metais cobre e cádmio, ou seja, 10,6 e 1,05 mg/L, respectivamente. E as concentrações recomendadas pela Resolução CONAMA 357/2005 para águas salinas de classe 1, ou seja, 5 µg/L para o cádmio e cobre.

Os grupos do experimento foram divididos, portanto: em controle, Cu CONAMA, Cu IC₅₀, Cd CONAMA e Cd IC₅₀. Sendo cada grupo composto de triplicatas, no qual cada réplica da triplicata foi representada por um pool de dois frascos, contendo 10 mg cada frasco em 150 mL de água do mar enriquecida com *von Stosch*. As algas foram selecionadas de forma heterogênea (ápices, talos e ápices bifurcados), pesadas, e aclimatadas por cinco dias. Antes da exposição, as algas foram pesadas novamente e tiveram seu meio de cultivo trocado. Os metais foram adicionados ao meio e as mesmas ficaram expostas durante um período de 48 horas. Finalizado esse período as algas foram pesadas, e em seguida foram congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas à - 80 °C para posterior processamento das amostras.

12. Processamento das amostras

O processamento das amostras do experimento foi semelhante ao efetuado nos testes de quantificação de fitoquelatinas, GSH e GSSG, no entanto foram realizadas algumas modificações no protocolo, a fim de melhorar a extração.

As amostras foram trituradas manualmente em nitrogênio líquido com o auxílio de um pistilo e almofariz, e o pó resultante foi pesado. Adicionou-se a cada uma das amostras metanol, N-etilmaleimida (NEM) 1M, e solução padrão γ Glu-Glu (25 µg/mL) e houve mais uma trituração com auxílio de um pistilo. Posteriormente as amostras foram sonicadas por 5 minutos, e centrifugadas a 4 °C e 14.000 rpm durante 3 minutos. O sobrenadante foi coletado e passado para um novo tubo, e o pellet foi armazenado para ser resuspendido.

O pellet passou por um novo processo de extração apenas com metanol, foi centrifugado, e foi retirada novamente a fração sobrenadante e colocada com a coletada anteriormente. A amostra (união das frações sobrenadantes) permaneceu no speed-vac por

1h30 para secar e foi resuspendida em 300 μ L de metanol, adicionou-se a mesma 500 μ L de clorofórmio e 300 μ L de água ultrapura, vortexou-se por 15 segundos, e centrifugou-se a 14.000 rpm durante 3 minutos a 4 °C. A fração sobrenadante foi coletada e armazenada a - 80 °C, para análises futuras.

Uma alíquota de 300 μ L foi retirada do sobrenadante armazenado e utilizada para quantificação de fitoquelatinas, GSH e GSSH.

13. Experimento de 48 horas com grupo de recuperação

O intuito de realizar um experimento com um grupo de recuperação incluso é verificar a taxa de recuperação da espécie após a exposição, seguida de um protocolo de lavagem com uma solução de EDTA e sua reinserção na água do mar, livre da presença de metais, e verificar se a mesma é capaz de recuperar em longo prazo sua taxa de crescimento diário.

O experimento foi dividido em cinco grupos: controle (Ctrl); cobre e cádmio nas concentrações equivalentes ao IC₅₀ (Cu IC₅₀ e Cd IC₅₀, respectivamente); e grupo de recuperação dos metais cobre e cádmio (Rec Cu IC₅₀ e Rec Cd IC₅₀, respectivamente). Sendo cada grupo composto de triplicatas, no qual cada réplica da triplicata foi representada por um pool de dois frascos, contendo 10 mg cada frasco em 150 mL de água do mar enriquecida com *von Stosch*. As algas foram selecionadas de forma heterogênea (ápices, talos e ápices bifurcados), pesadas, e aclimatadas por cinco dias. Exatamente como no teste anterior.

A fim de complementar os resultados, coletou-se 10 mL no início e final da exposição aos metais para quantificação dos metais na água, e medida indireta da quantidade de metal absorvida pela alga.

Após a aclimação as algas foram expostas aos metais por 48 horas, retiradas do meio, pesadas novamente, e parte das algas foram congeladas em nitrogênio líquido e posteriormente armazenadas a - 80°C e os grupos de recuperação foram lavados com uma solução de EDTA 0,01 M pH 8,0 contendo 23, 5 g/L de NaCl; 0,7 g/L de KCl e 0,2 g/L de NaHCO₃.

O protocolo de lavagem foi realizado de acordo com a metodologia de Sánchez-Marín et al. (2012). Contendo quatro tubos, sendo os dois primeiros preenchidos com água do mar e os dois últimos com a solução de EDTA. O tempo de permanência para cada amostra na água

do mar foi de 7 minutos em cada tubo e para a solução de EDTA foi de 10 minutos em cada tubo. Posteriormente as amostras lavadas foram inseridas em um meio contendo água enriquecida com *von Stosch* onde ficariam por 96 horas em recuperação.

As amostras congeladas foram trituradas em nitrogênio líquido com auxílio de um almofariz e pistilo e passaram pelo mesmo processo de extração dupla realizados nos testes anteriores.

14. Exposição a metais – Perfil temporal

Durante essa exposição a cádmio e cobre nas concentrações equivalentes ao IC₅₀ dos metais, o objetivo maior foi avaliar o perfil temporal de formação das fitoquelatinas, para tanto foram utilizados quatro tempos de exposição: 24, 48, 72 e 96 horas.

Cada tempo de exposição foi dividido em três grupos, controle (Ctrl), cobre (Cu IC₅₀) e cádmio (Cd IC₅₀). Sendo cada grupo composto de triplicatas, no qual cada réplica da triplicata foi representada por um pool de dois frascos, contendo 150 mg cada frasco em 450 mL de água do mar enriquecida com *von Stosch*. Cada tempo de exposição teve um período de aclimação de 5 dias, posteriormente as algas foram pesadas novamente, adicionadas a um novo meio contendo os metais. Após o período de exposição, as algas foram pesadas, separadas para posteriores análises, congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas a – 80 °C.

Previamente as análises todas as amostras foram trituradas em nitrogênio líquido com auxílio de um almofariz e pistilo, e armazenadas para análises de fitoquelatinas, biomarcadores, e parte foi direcionada para análises moleculares.

Ao longo do experimento, foram coletados 10 mL de água no início e final de cada período de exposição para quantificação dos metais na água do mar, e medida indireta de biosorção dos íons do metal pela alga (q), através da equação de Sheng et al. (2004) abaixo:

$$q = \frac{V.(C_i - C_e)}{w}$$

Onde: v – volume da solução; w – biomassa total em gramas; C_i – concentração inicial do metal no meio; C_e – concentração final do metal no meio.

15. Análises estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas com o auxílio do programa GraphPad Prism 5, e foram testadas as diferenças estatísticas entre o grupo controle e as concentrações escolhidas, e entre as concentrações, bem como as diferenças entre os tempos de exposição no caso de experimentos que as possuíam.

Nos experimentos envolvendo concentrações e tempos de exposição variados utilizou-se o teste ANOVA Two-Way. Os dados que apresentaram $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos, tendo sido aplicado em seguida Bonferroni.

Nos experimentos envolvendo apenas variação de concentração do metal, aplicou-se como teste estatístico ANOVA One-Way para comparação entre as concentrações, e como teste posterior Tukey, um teste para múltiplas comparações, esses testes foram utilizados para GSH e GSSG. Sendo considerados estatisticamente significativos os dados que apresentaram $p < 0,05$.

No caso das fitoquelatinas, no experimento as mesmas foram observadas em apenas um grupo tratado, aplicou-se o teste T para comparação entre o grupo controle e o grupo tratado.

Resultados e discussões

1. Cultivo das macroalgas e taxa de crescimento

Um dos grandes problemas enfrentados ao longo do estudo foi o cultivo de grandes quantidades de biomassa, devido à facilidade com que essas macroalgas podem ser acometidas por qualquer tipo de contaminação em ambiente laboratorial, seja por fungos, bactérias ou até mesmo microalgas em épocas de afloramento. Esse estudo exigiu grande quantidade de biomassa durante as padronizações, e experimentos. Sendo possível a redução dessa quantidade apenas após a padronização dos protocolos através de leituras espectrofotométricas.

Como mencionado, durante o período de cultivo, a cultura desenvolveu uma contaminação por microalgas, que exigiu descarte de praticamente toda biomassa. E embora o tratamento aplicado tenha sido efetivo, as macroalgas permaneceram debilitadas por alguns meses, sendo sua taxa de crescimento diário abaixo do necessário para reiniciar o cultivo. Iniciou-se, portanto um novo cultivo nas dependências da Seção de Ficologia do Instituto Botânico, para que houvesse melhor recuperação das algas recém descontaminadas e geração de biomassa em menor tempo.

O novo cultivo partiu de uma biomassa de aproximadamente 300 mg, e após alguns meses de cultivo com trocas semanais de meio de cultura, a cultura atingiu uma biomassa de aproximadamente 25 g divididos em diversos recipientes. Ao atingir essa biomassa, a taxa de crescimento das algas foi avaliada através de pesagens semanais durante o período de 1 mês (5 semanas), para determinar se as algas estavam entrando em senescência, através da curva de crescimento. Com o resultado dos cálculos, traçou-se a curva de crescimento para esse período (Figura 7).

Figura 7: Curva de crescimento de macroalgas *Gracilaria domingensis* ao longo de 1 mês de cultivo com trocas de meio e pesagens semanais.

Ao longo do mês observado, viu-se que houve um aumento de biomassa relativo ao inoculo inicial (aproximadamente 25g) de 85%. Sendo a taxa de crescimento diário, na maioria dos casos, entre 1 e 3%, uma taxa bem semelhante a obtida para macroalgas da mesma espécie quando cultivadas em biorreatores com condições controladas e sistema de oxigenação. Sendo esse intervalo de valores o em torno do esperado para cultivo em laboratório. Esse resultado demonstrou que as algas ainda não estavam no período de senescência, havendo crescimento contínuo sem estagnação, e que a biomassa necessária para os experimentos havia sido alcançada.

Um comparativo interessante são os dados obtidos a partir de experimentos realizados para otimização no cultivo de *Gracilaria domingensis* em meio sintético que geraram em alguns casos taxas de crescimento diário de 5 a 6%, valores bem relevantes e altos quando considerado o cultivo em laboratório.

2. Testes para extração

Obtida a biomassa necessária para realização dos experimentos, partiu-se então para otimização do processo de extração. Os protocolos existentes na literatura para extração em macroalgas são bem variados nos quesitos concentrações de tampão, pH, e inibidores de

proteases, detergentes (p. ex. Triton X-100) e quelantes utilizados, dentre outros compostos com finalidade de extrair da maneira mais efetiva possível as proteínas.

Nesse estudo, foram testadas duas metodologias de extração, uma de acordo com Collén et al (2003) e outra de acordo com Aguilera et al (2002). Inicialmente a quantidade de biomassa fresca para 1 mL de ambas soluções de extração foi variada, tendo sido utilizados 100, 200 e 300 mg de biomassa fresca. Como resultado, a primeira quantidade a ser descartada foram os 300 mg, visto que a quantidade de biomassa foi muito elevada para o volume de solução desejado. Houve problemas na centrifugação, não ocorrendo formação do precipitado e separação do sobrenadante, possivelmente devido a grande quantidade de ágar existente na espécie.

Os 100 e 200 mg de biomassa fresca em 1 mL apresentaram resultados semelhantes em termos de separação durante a centrifugação e coleta do sobrenadante, não havendo diferença significativa entre as duas biomassas nos aspectos avaliados. Portanto optou-se pela utilização de 100 mg de biomassa, possibilitando melhor aproveitamento da biomassa.

Definida a quantidade de biomassa, partiu-se para quantificação de proteínas a fim de avaliar qual dos dois métodos mostrou melhor extração. E de acordo com a quantificação de proteínas totais solúveis por Bradford (1976), não houve diferença significativa na extração dos dois meios como demonstrado no gráfico da Figura 8. Sendo assim, a metodologia de extração utilizada foi a de Collén et al (2003) modificada, ou seja, sem a presença do detergente Triton X-100 causador de interferência na metodologia de Bradford. A metodologia em questão já havia sido utilizada em outros estudos realizados pelo grupo laboratorial com macroalgas do mesmo gênero.

Figura 8: Proteínas totais solúveis quantificadas através do método de Bradford. No gráfico de colunas tem-se A: amostras extraídas de acordo com a metodologia de Collén et al (2003) sem o detergente Triton X-100 e B: amostras extraídas de acordo com a metodologia de Aguilera et al (2002). E no segundo gráfico está demonstrada a curva padrão da análise acompanhada da equação da reta ($y = 1,259 x \pm 0,09523$; $R^2 = 0,9831$).

3. Exposição a cobre

Por questões de logística optou-se pela divisão do experimento em partes. Para iniciar a etapa das exposições o metal cobre, na forma $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ foi escolhido. Como mencionado, as algas foram expostas ao metal por períodos de 1, 24 e 48 horas.

Após 1 hora de exposição não foram vistas variações no crescimento e das algas e nem sinais de morte tecidual, ou despigmentação. No entanto, como será abordado a seguir, houve alterações nos níveis enzimáticos.

Após 24 horas de exposição, observou-se que parte do cobre encontrava-se precipitado no meio, e as algas começavam a apresentar uma leve despigmentação, principalmente no grupo IC_{50} . No entanto, não foi registrada perda de biomassa e nem redução na taxa de crescimento.

Após 48 horas de exposição, as algas apresentavam morte tecidual no grupo IC_{50} (Figura 9) e despigmentação nos grupos IC_{50} e $\frac{1}{2} \text{IC}_{50}$. Porém, mesmo com esses sinais de morte tecidual e despigmentação, os grupos afetados não tiveram redução da biomassa, e continuaram a crescer. Demonstrando que a espécie em questão pode possuir grande tolerância à presença do cobre.

Figura 9: **A** - Imagem de *Gracilaria domingensis* do grupo controle. **B** - Imagem de *Gracilaria domingensis* pertencente ao grupo IC_{50} após 48 horas de exposição, sofrendo de

despigmentação. C - Imagem de *Gracilaria domingensis* pertencente ao grupo IC₅₀ após 48 horas de exposição ilustrando alguns pontos de morte tecidual.

4. Análise de biomarcadores

4.1 Catalase (CAT)

Durante a análise dos biomarcadores bioquímicos, a CAT apresentou um resultado inesperado, tendo em vista que se trata de um dos antioxidantes mais responsivos em diversas espécies, inclusive macroalgas expostas a xenobióticos, incluindo metais. No entanto, durante as padronizações do ensaio, não foi possível detectar e quantificar a CAT. Um estudo realizado por Mellado (2012) identificou um resultado semelhante em *Ulva compressa* retiradas de ambientes impactados pela presença de cobre, não houve detecção de CAT e nem GPx.

Inicialmente a hipótese era de que havia algum problema relacionado à metodologia de extração, e para confirmar essa teoria, as análises foram feitas em outras espécies de macroalgas, sendo uma do mesmo gênero *Gracilaria tenuistipitata* e outra de um gênero diferente *Pyropia spiralis*, o resultado das análises pode ser observado no gráfico da Figura 10, abaixo.

Figura 10: O gráfico demonstra a atividade específica da CAT para as amostras de *Pyropia spiralis*, utilizando 100 e 200 mg de massa fresca para o ensaio enzimático. A atividade para as amostras de *Gracilaria tenuistipitata* e *Gracilaria domingensis* não está demonstrada, pois as mesmas não apresentaram valores detectáveis.

No gráfico não há demonstração da atividade específica da CAT para as duas espécies do gênero *Gracilaria* utilizadas, pois as mesmas não apresentaram atividade detectável, mesmo quando variada a quantidade de amostra no meio de reação. No entanto, os resultados vistos para *Pyropia spiralis* são suficientes para afirmar que não há problemas com o método de extração das amostras.

A segunda hipótese foi que a CAT poderia estar presente no precipitado que fora descartado após a centrifugação da amostra. Para confirmá-la, novas amostras foram processadas, centrifugadas e o precipitado foi resuspenso em tampão sendo utilizado como extrato na reação. O resultado manteve-se, não houve níveis detectáveis de CAT, e a hipótese foi descartada.

A terceira hipótese elaborada foi de que amostras controle, livres de exposição talvez não estivessem produzindo CAT suficiente para detecção, e que em amostras expostas a contaminantes, a enzima antioxidante sofreria indução tornando possível medir sua atividade específica. Visando a confirmação da hipótese, amostras expostas a cobre nas concentrações 5,3 e 10,6 mg/L foram utilizadas. No entanto, não houve detecção do consumo do H_2O_2 presente no meio, e consequentemente não foi possível medir a atividade da enzima.

Uma possível explicação para esse fenômeno, é que na espécie *Gracilaria domingensis* a via da CAT não seja uma via preferencial no combate as ERO geradas pela presença do metal. Essa hipótese é sustentada pelos resultados encontrados para GPx e APx, que serão discutidos a seguir. Porém, mesmo mediante a essa hipótese não é possível afirmar que a espécie não possui o antioxidante, sendo assim, novos experimentos serão desenvolvidos utilizando como ferramenta a biologia molecular para constatar se a CAT está ou não sendo transcrita pela espécie.

4.2 Glutationa Peroxidase (GPx)

A GPx assim como a CAT e a APx possui a função de combater as ERO do meio. Nas análises das amostras de *Gracilaria domingensis* expostas a cobre nas concentrações 5,3 mg ($\frac{1}{2}$ IC₅₀) e 10,6 mg (IC₅₀) após 1, 24 e 48 h, pode-se observar que houve indução na atividade da enzima (Figura 11) para as duas concentrações em todos os tempos de exposição em relação ao controle, exceto para a concentração $\frac{1}{2}$ IC₅₀ no tempo de 24 horas de exposição.

Figura 11: Atividade específica da GPx em extratos de algas *Gracilaria domingensis* expostas a cobre. Sendo: $\frac{1}{2}$ IC₅₀: grupo exposto a 5,3 mg/L de cobre e IC₅₀: grupo exposto a 10,6 mg/L de cobre; **a**: diferença significativa em relação ao controle de mesmo tempo de exposição. **b**: diferença significativa em relação ao outro grupo tratado para o tempo de exposição.

O gráfico compara a atividade específica da GPx determinada nos grupos expostos a cobre em relação ao grupo controle considerando o mesmo tempo de exposição. Através de testes estatísticos pode-se constatar que a concentração utilizada do metal, o tempo de exposição e a interação entre essas duas variáveis apresentam caráter significativo como fonte de variação na atividade da enzima.

O comportamento observado na atividade da GPx é semelhante ao de outras espécies de macroalgas estudadas, de mesmo gênero ou outros gêneros. Contreras et al (2005) demonstrou resultados semelhantes para a espécie *Scytosiphon lomentaria* (alga parda) durante um estudo com ambientes impactados pela presença de cobre.

A indução na atividade da enzima pode ser explicada por um aumento na quantidade de ERO presentes no organismo, devido à situação de estresse causada pela presença do metal cobre, que mesmo se tratando de um micronutriente, encontra-se em alta concentração para o organismo, e possui caráter pró-oxidante. Como defesa o organismo aumenta a produção da enzima visando minimizar ou eliminar os danos causados pela presença das espécies reativas.

Os resultados corroboram ainda com os observados em outro experimento de exposição durante 48 horas para quantificação de fitoquelatinas, GSH e GSSG, que serão discutidos adiante.

4.3 Ascorbato Peroxidase (APx)

Um dos alvos do H_2O_2 quando a macroalga encontra-se na presença do metal são os cloroplastos, uma das organelas das algas na qual se encontra APx, e, além dos cloroplastos a APx também atua no citosol e mitocondria. Essa enzima, e sua indução é um dos mecanismos de defesa, possivelmente o mais eficiente no controle dos danos causados pelas ERO a essas organelas (Collén et al, 2003).

O comportamento descrito pode ser observado na Figura 12, em que é observada indução da atividade da APx após a exposição a cobre. No gráfico, o grupo controle não apresenta atividade, pois a mesma não foi detectada possivelmente por ser muito reduzida. No entanto, após as exposições, vê-se aumento na produção da enzima ainda na primeira hora.

Figura 12: Atividade específica da APx em extratos de algas *Gracilaria domingensis* expostas a cobre. Sendo $\frac{1}{2}$ IC50: grupo exposto a 5,3 mg/L de cobre e IC50: grupo exposto a 10,6 mg/L de cobre; **a:** diferença significativa em relação ao controle de mesmo tempo de exposição.

Mellado et al (2012) descreve em seu trabalho indução da atividade de APx em *Ulva compressa* (algas verdes) de ambientes com excesso de cobre devido a presença de efluentes provenientes da mineração. E o mesmo comportamento também é visto em diversos outros estudos com espécies variadas de macro e microalgas, comprovando a importância dessa enzima na defesa de organismos fotossintetizantes.

Uma hipótese é que devido as alterações na atividade específica da APx, seja possível observar também alterações nos níveis de ascorbato e de outros componentes do ciclo Ascorbato-Glutationa (Figura 13), e que esse comportamento é observado principalmente durante a exposição ao cobre. No entanto, outros experimentos e mais estudos são necessários para confirmar essa hipótese para espécie.

Figura 13: Ciclo Ascorbato-glutationa em cloroplastos. **1:** Ascorbato peroxidase; **2:** Dehidroascorbato redutase; **3:** Glutationa redutase. Fonte: Traduzido de Free Radicals in Biology and Medicine, seção 6.8.7 p.366.

A atividade da APx semelhantemente da GPx, foi alterada de maneira significativa tanto pela variação da concentração quanto do tempo de exposição ao metal, bem como a interação de ambos fatores.

4.4 Glutationa-S-transferase (GST)

A GST está envolvida no processo de detoxificação, contribuindo durante a fase II de biotransformação de xenobióticos através da conjugação de xenobióticos lipofílicos com GSH formando produtos mais solúveis e fáceis de serem excretados. Ela também é comumente utilizada em programas de monitoramento ambiental de xenobióticos, principalmente de compostos orgânicos e metais.

Na presença do metal o efeito que ocorrerá na enzima é variável, em alguns casos ela pode ser inibida e em outros, induzida, variando de acordo com a concentração do metal, dentre outros fatores. Em concentrações muito elevadas a presença de cobre pode levar a desestabilização da membrana lisossômica, liberando inúmeros radicais e íons ácidos para o meio prejudicando o funcionamento normal da enzima (Regoli et al., 1998).

Ao contrário do efeito descrito anteriormente por Regoli et al., e como observado na GPx e APx também houve indução na atividade da GST (Figura 14) durante a exposição a cobre nas concentrações 5,3 e 10,6 mg/L, mostrando que a alga está tentando combater as espécies reativas geradas, e as ERO existentes não estão superando a capacidade antioxidante do organismo.

Ao observar o gráfico é possível concluir que o aumento da atividade só não foi estatisticamente significativo para exposição de 24 horas na concentração 5,3 mg/L. A variação da concentração e do tempo de exposição são responsáveis por mudanças estatisticamente significativas na atividade da enzima. No entanto, a interação de ambos os fatores não foi relevante.

O resultado observado para exposição de 48 horas na concentração referente ao IC₅₀ do cobre reforça a hipótese formulada com base nos resultados de quantificação da GSH e GSSG que serão discutidos a seguir.

Figura 14: Atividade específica da GST em extratos de algas *Gracilaria domingensis* expostas a cobre. Sendo: ½ IC₅₀: grupo exposto a 5,3 mg/L de cobre e IC₅₀: grupo exposto a 10,6 mg/L de cobre; **a**: diferença significativa em relação ao controle de mesmo tempo de exposição. **b**: diferença significativa entre os grupos tratados com mesmo tempo de exposição.

5. Quantificação de proteínas

Como demonstrado na figura 15, não houve alterações significantes nas concentrações de proteínas totais solúveis para as amostras do grupo ½ IC₅₀ e IC₅₀ após 1 e 24 horas de exposição. Porém, após 48 horas de exposição observa-se o início da redução da quantidade proteica, levando a acreditar que exposições mais prolongadas a concentrações acima das requeridas para o crescimento ótimo das algas podem causar alterações maiores na quantidade de proteína.

O cobre possui grande afinidade por grupos sulfidril (-SH) que são essenciais para atividade enzimática e estrutura das proteínas. Após o transporte do cobre para o citosol, ele é capaz de reagir com os grupamentos -SH das enzimas ou tióis livres (p. ex. GSH) quebrando

a ligação sítio ativo – enzima, e causando danos a uma série de processos fisiológicos importantes.

Figura 15 Quantificação de proteínas totais solúveis pelo método de Bradford (1976) das macroalgas expostas a cobre acompanhada da curva padrão de BSA ($y = 1,2907x + 0,0055$; $R^2 = 0,9911$).

6. Testes com Fitoquelatinas, GSH e GSSG

Os testes iniciais realizados utilizaram amostras de *Gracilaria domingensis* expostas a cobre por 48 horas na concentração de 10,6 mg/L. Como resultado foi visto-se que a concentração da glutatona oxidada (GSSG) ficou abaixo do limite de detecção.

Como não foi encontrada GSH na forma livre, a primeira hipótese para esse resultado é que a presença do cobre fez com que a mesma fosse consumida para síntese de fitoquelatinas. No entanto, não houve detecção de fitoquelatinas.

A segunda hipótese, é a utilização da GSH como substrato da GPx e da GST, ou ainda no ciclo da APx, para auxiliar no combate à ERO, uma vez que todos os papéis desempenhados pela GSH auxiliam na diminuição da toxicidade do cobre (Chen et al, 2012). Essa hipótese é mais coerente quando considerada capacidade do cobre de aumentar a quantidade de ERO presentes no meio através das reações de Fenton e Haber-Weiss.

Além disso, houve grandes diferenças nos valores do padrão interno, possivelmente o processo de extração tenha apresentado baixa eficiência, necessitando assim de alguns ajustes. Visando melhorar a eficiência da extração novos testes foram realizados e mais etapas de extração com metanol foram inseridas no método.

7. Experimento Fitoquelatinas, GSH e GSSG

O experimento realizado para quantificação de fitoquelatinas, GSH e GSSG passou por algumas alterações em relação ao experimento relatado anteriormente. Partiu-se de duas concentrações sendo uma equivalente ao IC₅₀ e outra equivalente a concentração recomendada para águas salinas de classe 1 pela Resolução CONAMA 357/2005.

Ao utilizar tais concentrações o objetivo foi confirmar que os valores legislados realmente são seguros para a espécie *Gracilaria domingensis*. Uma vez que não há testes ecotoxicológicos realizados para todas as espécies, e o CONAMA não considera efeitos subletais, apenas a taxa de mortalidade dos organismos ao definir os valores máximos permitidos. E ainda utilizar uma concentração mais elevada, como o IC₅₀ para garantir que seriam observadas alterações nos níveis de GSH, GSSG e fitoquelatinas devido à presença do metal. E por fim, utilizar essas alterações como ferramentas para compreender melhor o que ocorre com o metabolismo da alga na presença do metal, e quais vias foram priorizadas na presença de cada um deles.

O tempo de exposição escolhido para realização do experimento foi 48 horas. Essa determinação foi baseada no tempo de exposição utilizado para confecção da curva de IC₅₀ dos metais de interesse, e nos resultados de experimentos anteriores realizados com cobre, nos quais os efeitos mais pronunciados foram vistos para esse tempo de exposição.

Mesmo na concentração mais alta não houve alterações significativas na taxa de crescimento diário da espécie. As algas apresentaram apenas uma leve despigmentação tanto nos grupos expostos a cádmio quanto nos grupos expostos a cobre nas concentrações 1,05 e 10,6 mg/L, respectivamente.

As fitoquelatinas estão entre os principais parâmetros a serem avaliados durante uma exposição aos metais. Elas são proteínas ricas em cisteínas com função de acúmulo e detoxificação de metais como zinco, cádmio e cobre, dentre outros.

Através de análises estatísticas constatou-se que a variação da concentração, tempo e a interação desses dois fatores causam mudanças significativas nos níveis de GSH, GSSG e fitoquelatinas.

Figura 16 Atividade antioxidante não enzimática (GSSG, GSH e fitoquelatinas) de extratos de algas *Gracilaria domingensis* expostas a cobre e cádmio. Sendo: **Cu CONAMA**: grupo exposto à concentração recomendada pelo CONAMA, 5µg/L, **Cu IC50**: grupo exposto à concentração de 10,6 mg/L de cobre, **Cd CONAMA**: grupo exposto à concentração recomendada pelo CONAMA, 5µg/L, e **Cd IC50**: grupo exposto à concentração de 1,05 mg/L de cádmio; **a**: diferença significativa em relação ao controle. **b**: diferença significativa entre os grupos tratados.

O grupo tratado com cádmio na concentração de 1,05 mg/L foi o único que apresentou síntese de fitoquelatinas, sendo essas fitoquelatinas 3 (PC3), as que são produzidas inicialmente como resposta a presença do metal. A hipótese é que durante exposições mais longas seria possível visualizar a síntese de fitoquelatinas 4 (PC4).

Os resultados de quantificação da GSH e GSSG não sofreram alterações significativas em relação ao controle. Na exposição a cádmio na concentração CONAMA houve aumento significativo em relação ao controle para a GSH, a hipótese que explica esse comportamento, é que a presença do metal favorece a formação de GSH a partir da redução da GSSG pela

glutathione redutase (GR) visando à síntese das fitoquelatinas, que pode vir a ser necessária no caso de exposições mais prolongadas ou concentrações mais elevadas.

Ao contrário do cádmio, o cobre atua em outras vias. O gráfico demonstra que ocorreu aumento significativo nos níveis de GSSG e diminuição nos níveis de GSH para a concentração de cobre de 10,6 mg/L. Há duas hipóteses que explicam a diminuição nos níveis de GSH, a primeira é a indução na atividade da GPx, como observado no experimento descrito anteriormente, devido ao aumento na produção de ERO pela presença do cobre. A GPx catalisa a oxidação da glutathione reduzida. A segunda hipótese é a utilização da GSH para conjugação com o metal, sendo essa reação catalisada pela GST, essa hipótese é sustentada pelos resultados obtidos durante a quantificação da atividade da GST, cujos níveis formam mais elevados na presença do cobre, principalmente após 48 horas de exposição.

A exposição ao cobre não levou a síntese de fitoquelatinas, fato observado durante exposição a cádmio. Portanto, considerando que os metais atuam de formas diferentes no organismo da espécie, os mesmos e seus dados não serão comparados. Para um estudo mais completo foi realizado um perfil temporal da síntese de fitoquelatinas, que teve como objetivo compreender após quanto tempo de exposição ao cádmio elas passaram a serem sintetizadas e a partir de quanto tempo de exposição ao cobre as fitoquelatinas começam a serem sintetizadas. Para isso propôs-se a realização de um novo experimento contemplando outros tempos de exposição aos metais, sendo estes 24, 36, 72 e 96 horas.

Há uma hipótese de que a exposição a cobre está afetando outras vias, como o ciclo ascorbato-glutathione, para comprovar se a hipótese está correta, outros experimentos devem ser realizados, visando à quantificação do ascorbato, dentre outros componentes do ciclo, em estudos posteriores.

Os resultados fornecidos pela avaliação da GSSG, GSH e fitoquelatinas foram fundamentais para o desenvolvimento de novas hipóteses, além de contribuírem para o entendimento de outros resultados obtidos, foi possível ampliar o grau de conhecimento em relação ao comportamento dos metais na espécie *Gracilaria domingensis*. A figura 17 mostra um esquema de como as enzimas e antioxidantes estão relacionados, proporcionando uma visão geral de tudo que foi discutido.

Figura 17 Esquema das enzimas antioxidantes e antioxidantes não enzimáticos e sua atuação na presença de espécies reativas. Fonte: Artigo submetido de Zambotti-Villela et al. (2014).

Para o desenvolvimento das hipóteses usou-se os pontos principais do esquema apresentado, que são as vias que possivelmente sofrem alteração na presença do cádmio e do cobre. Sendo o ponto central do esquema a redução da glutatona oxidada pela glutatona redutase e a oxidação da glutatona reduzida pela glutatona peroxidase.

8. Experimento de 48 horas com grupo de recuperação

Figura 18 Macroalgas *Gracilaria domingensis* após 48 horas de exposição a cádmio e cobre. **A:** Grupo controle; **B:** Grupo exposto a cobre na concentração equivalente ao IC_{50} ; **C:** Grupo exposto a cádmio na concentração equivalente ao IC_{50} . As setas são indicativas dos principais pontos afetados pela presença dos metais.

Sobre a taxa de crescimento diário e pigmentação das algas após 48 horas de exposição aos metais, viu-se que as algas expostas ao cobre sofreram despigmentação como

demonstrado a seguir, ficando com coloração esverdeada. Ao contrário das algas expostas ao cobre, as algas expostas a cádmio começaram coloração levemente esbranquiçada, indicativo de morte tecidual em alguns pontos (Figura 18). A exposição acarretou na perda de biomassa para ambos os metais, sendo maior no grupo exposto a cobre. No grupo exposto a cádmio apesar do princípio de morte tecidual, a perda de biomassa foi inferior a 2%.

Connan e Stengel, (2011) afirmam que a presença de cobre em excesso é capaz de interferir na taxa de fotossíntese, perturbar o transporte de elétrons no fotossistema II e reduzir a concentração de pigmentos, como mencionado anteriormente. E os resultados observados para exposição a cobre na concentração equivalente ao IC₅₀ estão em acordo com esses conceitos.

No que diz respeito ao grupo de recuperação, após 96 horas no novo meio de cultivo livre de metais as algas, expostas a cádmio, continuaram sofrendo de morte tecidual mesmo após a lavagem efetuada com EDTA para remoção do metal aderido a superfície, e dão sinais de que não serão capazes de se recuperar da exposição ao cádmio. No entanto, as algas expostas ao cobre, permanecem esverdeadas, e aos poucos começam a recobrar sua coloração demonstrando serem mais passíveis de recuperação.

9. Exposição de 48 horas com grupo de recuperação – Antioxidantes não enzimáticos

A figura 19 apresenta os resultados das análises de GSH, GSSG e fitoquelatinas para o experimento de 48 horas de exposição com grupo de recuperação. Através do gráfico é possível observar que não houve diferença significativa em relação ao grupo controle na quantidade de GSH e GSSG para os grupos Cu IC₅₀ e Cd IC₅₀. Além disso, não houve quantidade detectável de fitoquelatinas.

Não foi possível a quantificação de GSH para o grupo Rec Cu IC₅₀, e houve diminuição na quantidade para o grupo Rec Cd IC₅₀ em relação ao controle, no entanto a mesma não foi estatisticamente significativa. A hipóteses para a redução da quantidade de GSH para o grupo Rec Cu IC₅₀ é de que a glutathiona reduzida está sendo utilizada pela via da

GPx, devido ao estresse oxidativo causado pela presença do metal, visto que a alga não apresenta atividade de catalase, mas tem atividade de GPx e APx bem pronunciadas em casos de estresse oxidativo.

A GSSG assim como a GSH não apresentou diferenças significativas em relação ao controle para os grupos Cu IC₅₀ e Cd IC₅₀. No entanto, foi observada diminuição em sua quantidade para o grupo Rec Cu IC₅₀. A diminuição do parâmetro pode ter ocorrido durante o período de recuperação, em que a GSH encontra-se ausente no grupo de recuperação exposto a cobre, não havendo favorecimento da formação de GSSG.

Nota-se principalmente que os níveis de GSH e GSSG estão muito baixos se comparados com o experimento realizado com concentrações CONAMA e IC₅₀ do experimento anterior, a hipótese de que houve alguma falha na extração durante o processo, ou então as amostras sofreram algum dano. Sendo necessário posteriormente repetir o ensaio para confirmar se a atividade estava realmente muito baixa em relação ao outro experimento ou se houve alguma falha no novo protocolo.

Figura 19 Atividade antioxidante não enzimática (GSH e GSSG) de extratos de algas *Gracilaria domingensis* expostas a cádmio e cobre. Sendo **Cu IC₅₀**: grupo exposto a concentração de 10,6 mg/L de cobre, **Cd IC₅₀**: grupo exposto a concentração de 1,05 mg/L de cádmio, **Rec Cu IC₅₀**:

grupo exposto ao cobre e deixado em recuperação em meio de cultura livre do metal por 96 horas, **Rec Cd IC50**: grupo exposto ao cádmio e deixado em recuperação em meio de cultura livre do metal por 96 horas. **A**: diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle.

10. Exposição a metais – Perfil temporal

Ao longo dessa exposição analisou-se o efeito dos metais durante quatro períodos de exposição (24, 48, 72 e 96 h). Todas as coletas feitas após as exposições foram documentadas, e abaixo nas figuras de 20 a 23 é possível observar o efeito do tempo sobre a coloração das algas, e em alguns casos a morte tecidual das mesmas.

Nos últimos tempos de exposição, 72 e 96 horas, observou-se perda de biomassa.

Além disso, as fitoquelatinas, GSH e GSSG foram analisadas para todos os períodos de exposição, no entanto não houve resultados, ou seja, o espectrômetro não foi capaz de quantificar as amostras, uma das hipóteses é que um dos equipamentos, o sonicador mais precisamente, possivelmente estava descalibrado, destruindo as amostras e impossibilitando a quantificação. Uma vez que não a metodologia já havia sido bem estabelecida.

Apesar da morte tecidual e inibição do crescimento das mesmas após longas exposições (acima de 48 horas), esse comportamento não desqualifica o organismo como possível biorremediadora, pois o ambiente marinho é muito mais complexo que o ambiente laboratorial, e uma série de outros fatores como ampla disponibilidade de luz e nutrientes podem auxiliar na recuperação da alga mais rapidamente.

Figura 20 Macroalgas expostas a cádmio e cobre por 24 horas. De cima para baixo grupo controle, cobre e cádmio.

Figura 21 Macroalgas expostas a cádmio e cobre por 48 horas. De cima para baixo grupo controle, cobre e cádmio

Figura 22 Macroalgas expostas a cádmio e cobre por 72 horas. De cima pra baixo grupo controle, cobre e cádmio.

Figura 23 Macroalgas expostas a cádmio e cobre por 96 horas. De cima pra baixo grupo controle, cobre e cádmio.

Conclusões e Perspectivas

- Os testes de metodologias de extração foram bem sucedidos, e demonstraram que não há diferença entre a utilização de comprimidos com coquetel inibidor de protease, ou tampão com PMSF e PVP.
- A CAT não apresentou atividade enzimática detectável nem mesmo na presença de cobre, esse resultado necessita de outros estudos para mais conclusões, sendo a biologia molecular uma ferramenta interessante para responder as dúvidas que permaneceram.
- As enzimas GST, GPx e APx reagiram a presença do cobre sofrendo indução para minimizar e/ou eliminar os danos causados pelas espécies reativas. O que torna essas enzimas boas biomarcadoras da presença de metais.
- A exposição a cobre durante 1, 24 e 48 h não causou alterações no crescimento das algas, no entanto, após 24 h as algas começaram a apresentar despigmentação acentuada na maior concentração de cobre. E morte tecidual após 48 horas de exposição.
- A macroalga *Gracilaria domingensis* demonstrou alta tolerância à presença dos metais nas primeiras horas de exposição ao metal, no entanto após 48 horas, mesmo com a lavagem feita com a solução de EDTA a mesma não foi capaz de recuperar-se da exposição aos metais. No entanto, isso não a desqualifica como biorremediadora, uma vez que o ambiente marinho possui uma complexidade mais elevada, e pode possuir fatores que favoreçam sua recuperação no caso de um aporte de metais.
- O cádmio induziu a síntese de fitoquelatinas na concentração relativa ao IC₅₀ após 48 horas de exposição. No entanto, a exposição ao cobre, mesmo em concentrações mais elevadas não ocasionou tal síntese, necessitando provavelmente de maior tempo de exposição ao metal para que a mesma seja observada.
- A macroalga *Gracilaria domingensis* demonstrou grande potencial para fins ambientais, e mais estudos serão necessários para explorar outras variáveis e aproximar mais os resultados do que poderá ser observado em ambiente marinho e replicar melhor esse compartimento.

REFERÊNCIAS

AEBI, H. Catalase in vitro. *Meth. Enzymol.*, v. 105, p. 121, 1984.

AGUILERA, J. et al. Enzymatic defences against photooxidative stress induced by ultraviolet radiation in Arctic marine macroalgae. *Polar Biol*, v. 25, p. 432-441, 2002.

AKCALI, I.; KUCUKSEZGIN, F. A biomonitoring study: Heavy metals in macroalgae from eastern Aegean coastal areas. *Marine Pollution Bulletin*, v. 62, p. 637-645, 2011.

ALMEIDA, E.A. et al. DNA damage levels in the digestive gland and mantle tissue of the mussel *Perna perna*. *Comparative BiochemPhysiol C*, v. 135, p. 295-303, 2003.

ALMEIDA, E.A. et al. Oxidative stress in *Perna perna* and other bivalves as indicators of environmental stress in the Brazilian marine environment: Antioxidants, lipid peroxidation and DNA damage. *Comparative Biochem Physiol A*, v. 146, p. 588-600, 2006.

AZEVEDO, F. A.; CHASIN, A. A. M. (coord.) As bases toxicológicas da ecotoxicologia. RiMa Editora e InterTox, 2003. 340p.

BJERREGAARD, P.; ANDERSEN, O. *Ecotoxicology of Metals—Sources, Transport, and Effects in the Ecosystem*. 2008.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, v. 72, p. 248-254, 1976.

CARDOZO, K. H. M. et al. Metabolites from algae with economical impact. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C*, v. 146, p. 60-78, 2007.

CHEN, H. Evaluation of the role of the glutathione redox cycle in Cu(II) toxicity to green algae by a chiral perturbation approach. *Aquatic toxicology*, v. 120-121, p. 19-26, 2012.

COLLÉN, J. et al. Induction of oxidative stress in the red macroalga *Gracilaria tenuistipitata* by pollutant metals. *Environmental Contamination and Toxicology*, v. 45, p. 337-342, 2003.

CONNAN, S.; STENGEL, D. B. Impacts of ambient salinity and copper on brown algae: 1. Interactive effects on photosynthesis, growth, and copper accumulation. *Aquatic Toxicology*, v. 104, p. 94-107, 2011.

CONTRERAS, L. et al. Antioxidant responses in *Scytosiphon lomentaria* (Phaeophyceae). *Journal of Phycology*, v. 41, p. 1184-1195, 2005.
Inhabiting copper-enriched coastal environments

CONTRERAS, L. et al. Differential responses to copper-induced oxidative stress in the marine macroalgae *Lessonia nigrescens* and *Scytosiphon lomentaria* (Phaeophyceae). *Aquatic Toxicology*, v. 94, p. 94-102, 2009.

EDWARDS, P. Illustrated guide to the seaweeds and sea grasses in the vicinity of Porto Aransas, Texas. *Contributions in Marine Science* v. 15, p.1-228, 1970.

FLOHÉ, L.; GÜNZLER, W. A. Assays of glutathione peroxidase. *Methods Enzymol.*, v. 105, p. 114, 1984.

GRESSLER, V. et al. Biochemical composition of two seaweed species grown on the Brazilian coast. *J. Sci. Food Agric.*, v.91, p. 1687-1692, 2011.

HABIG, W. H. et al. Glutathione S-transferases. *The journal of Biol. Chem.*, v.246 (22), p. 7130, 1974.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. *Free Radicals in Biology and Medicine*. Nova York: Oxford University Press, v.1, 2007. 851p.

LÓPEZ-BAREA, J. Biomarcadores moleculares de estrés oxidativo y contaminación ambiental. *Rev. Toxicol.*, v. 17, p. 12-18, 2000.

LÓPEZ-BAREA, J.; PUEYO, C. Mutagen content and metabolic activation of promutagens by molluscs as biomarkers of marine pollution. *Mutat. Res.*, v. 399, p. 3-15, 1998.

MALEA, P. et al. Effects of cadmium, zinc and nitrogen status on non-protein thiols in the macroalgae *Enteromorpha* spp. from the Scheldt Estuary (SW Netherlands, Belgium) and Thermaikos Gulf (N Aegean Sea, Greece). *Marine Environmental Research*, v. 62, p. 45-60, 2006.

MELLADO, M. et al. Copper-induced synthesis of ascorbate, glutathione and phytochelatins in the marine alga *Ulva compressa* (Chlorophyta). *Plant Physiology and Biochemistry*, v. 51, p. 102-108, 2012.

MELEGARI, S.P. et al. Evaluation of toxicity and oxidative stress induced by copper oxide nanoparticles in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Aquatic Toxicology*, v. 142-143, p. 431-440, 2013.

NAKANO, Y.; ASADA, K. Hydrogen Peroxide is Scavenged by Ascorbate-specific Peroxidase in Spinach Chloroplasts. *Plant & Cell Physiol.*, v. 22, p. 867-880, 1981.

OKAMOTO, O. K.; COLEPICOLO, P. Response of superoxide dismutase to pollutant metal stress in the marine dinoflagellate *Gonyaulax polyedra*. *Comp. Biochem. Physiol.*, v. 119C, p. 67-73, 1998.

PFLUGMACHER, S. et al. Activity of phase I and phase II detoxification enzymes in Antarctic and Arctic macroalgae. *Marine Environmental Research*, v. 48, p. 23-36, 1999.

RASHED, M.N.; Monitoring of environmental heavy metals in fish from Nasser lake. *Environment International*, v. 27 p. 27-33, 2001.

RODRÍGUEZ-ARIZA, A. et al. Biochemical indicators of oxidative stress in fish from polluted littoral areas. *Can J Fish Aquat Sci.*, v. 50, p. 2568-2573, 1993.

SIES, H.; MOSS, K.M. A role of mitochondrial glutathione peroxidase in modulating mitochondrial oxidations in liver. *Eur J Biochem*, v.84, n.2, p.377-383, 1978.

TONON, A. P. et al. Absorption of metals and characterization of chemical elements present in three species of Gracilaria (Gracilariaceae) Greville: a genus of economical importance. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, v. 21 (2), p. 355-360, 2011.

TRÍDICO, C.P. et al. Biochemical biomarkers in *Oreochromis niloticus* exposed to benzo[a]pyrene and diazinon. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v.73, p. 858-863, 2010.

WALKER, C.H. et al. *Principles of Ecotoxicology*. Taylor & Francis, Londres, 1996, 321p.

YOKOYA, N.S. Controle do desenvolvimento e da morfogênese por auxinas e citocininas em três espécies de rodofíceas: *Gracilariopsis tenuifrons*, *Grateloupia dichotoma* e *Solieria filiformis*. Tese de Doutorado, Universidade de São Paulo, São Paulo, 202p, 1996.