UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Toxicologia e Análises Toxicológicas

Análise dos efeitos tóxicos de cádmio sobre a microalga *Lingulodinium polyedrum* utilizando cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas (LC-MS/MS)

Renato Lahos Romano

Dissertação para obtenção do grau de

MESTRE

Orientador:
Prof. Dr. Pio Colepicolo Neto

São Paulo

2010

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Toxicologia e Análises Toxicológicas

Análise dos efeitos tóxicos de cádmio sobre a microalga *Lingulodinium polyedrum* utilizando cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas (LC-MS/MS)

Renato Lahos Romano

Dissertação para obtenção do grau de

MESTRE

Orientador:
Prof. Dr. Pio Colepicolo Neto

São Paulo

2010

Renato Lahos Romano

Análise dos efeitos tóxicos de cádmio sobre a microalga *Lingulodinium polyedrum* utilizando cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas (LC-MS/MS)

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

_____
Prof. Dr. Pio Colepicolo
orientador/presidente

_____
1°. Examinador

_____
2°. examinador

São Paulo,_____de_____.

À Lillian,

minha companheira de todos os momentos.

Agradecimentos

Agradeço imensamente ao meu orientador Pio Colepícolo por todo o apoio, companheirismo, auxílio e pelas oportunidades que me ofereceu.

Agradeço à professora Maria Terêsa Machini Miranda e ao Cleber W. Liria que me auxiliaram muito ao realizarem a complicada síntese das fitoquelatinas. Sem eles não teria sido possível realizar a parte mais importante de meu trabalho.

Não poderia deixar de mencionar o auxilio que o amigo Diogo me ofereceu, ajudando no desenvolvimento dos métodos de análise e ao seu amplo conhecimento em Química.

Um agradecimento especial à Fabiane e Luiza que me auxiliaram muito na redação da dissertação. Agradeço aos amigos de laboratório Angela, Érika, Dina, Patrícia, Moacir, Karina e Stéphanie, que de uma forma ou de outra me ajudaram a completar meu trabalho.

Não posso esquecer de agradecer aos técnicos Ednailson e Sandra que sempre estiveram ao meu lado quando precisei de ajuda.

Sou muito grato à Universidade de São Paulo, pela oportunidade de trabalhar como técnico de nível superior no programa PROCONTES.

Agradeço à minha família, meus pais e meu irmão, por sempre estarem presentes tanto nos momentos bons quanto nos difíceis.

Agradeço sinceramente à Lillian, a namorada mais que especial, sempre presente e confiando em mim.

“O que somos é consequência do que pensamos.”

Sidarta Gautama

Resumo

ROMANO, R. L. **Análise dos efeitos tóxicos de cádmio sobre a microalga *Lingulodinium polyedrum* utilizando cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas (LC-MS/MS)**. 2010. Dissertação de mestrado - Departamento de toxicologia e análises toxicológicas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, 2010.

Com o aumento de atividades humanas nocivas ao meio ambiente e principalmente ao meio aquático, torna-se importante a elucidação dos mecanismos de defesa que envolvem os organismos expostos. As algas têm particular importância por serem a base da cadeia alimentar do ecossistema marinho. Ao acumular as substâncias tóxicas presentes no ambiente e servirem de alimento para outras espécies, elas podem provocar biomagnificação do agente tóxico ao longo da cadeia. A escolha da microalga *Lingulodinium polyedrum* deve-se à sua ampla distribuição em âmbito nacional e mundial e por ser um organismo modelo para estudos de toxicologia envolvendo metais. Este trabalho tem como objetivos padronizar as condições do meio de cultivo de forma a proporcionar o crescimento ideal da espécie, traçar a curva de crescimento e monitorar os aspectos biológicos que sofrem alterações frente a metais, tais como: taxa fotossintética, atividade da enzima antioxidante superóxido dismutase, balanço entre glutationa reduzida e oxidada, bioacumulação intracelular dos metais a que foram expostas e identificação de substâncias quelantes sintetizadas pelas algas, conhecidas como fitoquelatinas. Para alcançar estes objetivos foram utilizadas técnicas analíticas tais como espectrofotometria, espectrometria de massas e espectrometria de emissão atômica com plasma acoplado indutivamente. Dentre os resultados obtidos estão diminuição

da quantidade de glutationa reduzida e oxidada quando algas são expostas a metais, diminuição da quantidade de cádmio presente no meio, aumento da atividade de superóxido dismutase e síntese de fitoquelatinas. Com os resultados obtidos podemos concluir que as fitoquelatinas podem ser usadas como biomarcadores de exposição ao cádmio e o organismo, por ser capaz de diminuir a quantidade de metais disponíveis no ambiente, tem potencial para biorremediar ambientes poluídos.

Palavras-chave: Toxicologia ambiental, algas, cádmio, fitoquelatinas, glutationa.

Abstract

ROMANO, R. L. **Toxic effects of cadmium on the microalgae *Lingulodinium polyedrum* using high performance liquid chromatography coupled to mass spectrometry (LC-MS/MS).** 2010. Dissertation (Master) - Departamento de Toxicologia e Análises Toxicológicas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, 2010.

Given the increase of environmentally harmful human activities, in particular the ones injurious to the aquatic environment, it is important to elucidate the defense mechanisms utilized by organisms exposed to damaging agents. Those species can later be suggested to be used as pollution bioindicators or bioremediatiors. Algae are of particular importance because they are the basis of the marine ecosystem food chain. Given that these organisms can accumulate toxic substances from the environment and they serve as food for other species, it will cause biomagnification of the toxic agent in the chain. The choice of the microalgae *Lingulodinium polyedrum* was due to its wide national and global distribution and the fact that it is a model organism for toxicology studies involving metals. This work aims to standardize the medium conditions in order to provide the ideal growth of the species; plot the growth curve; and monitor the biological aspects that change in the presence of metals, such as: photosynthetic rate, antioxidant enzyme superoxide dismutase activity, balance between oxidized and reduced glutathione, intracellular accumulation of metals and identification of chelating substances synthesized by the alga, known as phytochelatins. To achieve these objectives there were used analytical techniques such as spectrophotometry, mass spectrometry and inductively coupled plasma atomic emission spectroscopy. Among the obtained results there are the decrease in the amount of reduced and oxidized glutathione when algae are

exposed to the metal; reduction in the quantity of cadmium in the medium; and increase in superoxide dismutase activity and phytochelatin synthesis. Based on the results it can be concluded that phytochelatins can be used as biomarkers of exposure to cadmium and the organism have potential to bioremediate polluted environments.

Keywords: Environmental toxicology, algae, cadmium, phytochelatins, glutathione.

Lista de abreviaturas

CAD - *CAD Gas*

CE - *Collision Energy*

CEP - *Collision Cell Entrance Potential*

Cit c – Citocromo C

Cys - Cisteína

CUR - *Curtain Gas*

CXP - *Collision Cell Exit Potential*

DP – *Declustering potential*

EDTA – Ácido etilenodiaminotetraacético

EP - *Entrance Potential*

Gly – Glicina

Glu – Ácido glutâmico

GPx – Glutationa peroxidase

GR – Glutationa redutase

GS1 - *Gas 1*

GS2 – *Gas 2*

GSH – Glutationa reduzid**a**

GSSG – Glutationa oxidada

GST – Glutationa s-transferase

H^+ - Proton

H_2O_2 – Peróxido de hidrogênio

HPLC – *High performance liquid cromatography*

IR – Índice redox

IS - *IonSpray Voltage*

LC – *Liquid cromatography*

MS – *Mass spectrometry*

N/D – Não detectado

NADPH – Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida

$NADP^+$ – Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidada

NEM – N-etilmaleimida

$O_2^{\bullet-}$ – Radical ânion superóxido

$^{\bullet}OH$ – Radical hidroxila

PAM - Pulso de amplitude modulada

PC - Fitoquelatina

PCS – Fitoquelatina sintase

PMSF – Fluoreto de fenilmetilsulfonila

PSI – Fotossistema I

PSII – Fotossistema II

Q1 – Quadrupolo 1

Q3 – Quadrupolo 3

$R^{\bullet}$ – Radical

RH – Molécula protonada

RPM – rotações por minuto

SOD – Superóxido dismutase

TEM – *Temperature*

TFA – ácido trifluoroacético

Lista de figuras

Figura 1. Microscopia eletrônica de *Lingulodinium polyedrum*. (Coturnix, 2006) 26

Figura 2. Estrutura da glutationa reduzida. 37

Figura 3. Atividades atribuídas à glutationa. (Tausz *et al.*, 2004) 38

Figura 4 Estrutura geral das fitoquelatinas. 39

Figura 5. Foto de cultivo de *L. polyedrum.* 47

Figura 6. Lâmina Nageotte na parte superior e técnica de leitura na parte inferior. 49

Figura 7. Analisador submersível de desempenho fotossintético Diving PAM 50

Figura 8 Cálculo de SOD. 59

Figura 9. Curva de crescimento de *L. polyedrum* obtida por contagem em microscópio óptico durante 30 dias. 67

Figura 10. Medidas de absorbância de *L. polyedrum* em 680 nm para curva de crescimento, durante 30 dias. 68

Figura 11. Taxa de crescimento das algas do cultivo ao longo dos dias, ... 69

Figura 12. Tempo para que o número de algas do cultivo duplique, conhecido como tempo de duplicação. 70

Figura 13. Curva de calibração de proteínas 73

Figura 14. Quantidade de cádmio encontrado no meio, após adição deste metal em cultivos por 24 e 48 horas de exposição. 75

Figura 15. Atividade de SOD em amostras expostas a Cd 2,0 µg/mL 76

Figura 16. Localização dos parâmetros a serem otimizados no espectrômetro de massas. 78

Figura 17. Decaimento da concentração de padrão de GSH com o grupo enxofre desprotegido. 82

Figura 18. Decaimento da concentração de padrão de GSH com o grupo enxofre protegido com NEM. 83

Figura 19. Cromatograma gerado ao ser injetado padrão de GSH e GSSG, no método desenvolvido. 84

Figura 20. Curva de calibração de GSH 85

Figura 21. Curva de calibração de GSSG 85

Figura 22 Níveis de GSH 87

Figura 23 Níveis de GSSG.....87

Figura 24 Razão entre GSH e GSSG.....88

Figura 25. PC3 infundida diretamente no espectrômetro de massas no modo *enhanced resolution*. 90

Figura 26. Cromatograma gerado ao serem injetados os padrões de PC3 e PC4 no método desenvolvido por LC-MS/MS.....91

Figura 27. Degradação da PC4 ao longo do tempo em solução ácido fórmico 0,1%. 93

Figura 28. Degradação de PC4 ao longo do tempo em solução de ácido trifluoro acético 0,1 %. 93

Figura 29. Degradação de PC4 ao longo do tempo em solução NEM 1%.....94

Figura 30. Fragmentação da PC3.....95

Figura 31. Fragmentação da PC4.....96

Figura 32. Curva de calibração de PC3 98

Figura 33. Curva de calibração de PC4 99

Figura 34. Níveis de PC3 com aumento de quantidade de Cd a que as algas são exposta. 100

Figura 35. Níveis de PC4 com aumento de quantidade de Cd a que as algas são expostas. 100

Figura 36. Síntese de PC3 em tempos crescentes de exposição a cádmio (2,0 µg/mL) . 102

Figura 37. Síntese de PC4 em tempos crescentes de exposição à cádmio (2,0 µg/mL), 103

Lista de esquemas

Esquema 1. Ciclo de vida do gênero *Lingulodinium*. 28

Esquema 2. Função da superóxido dismutase. 43

Esquema 3. Excitação da clorofila ao receber luz. 52

Esquema 4. Reação monitorada no ensaio de SOD 57

Esquema 5. Cd dentro das células de algas 104

Lista de tabelas

Tabela 1. Gradiente de fase móvel do método de análise de Glutationa. 61

Tabela 2. Parâmetros do espectrômetro de massas otimizados para análise de glutationa. 62

Tabela 3. Parâmetros da fonte de ionização otimizados para análise de glutationa. 62

Tabela 4. Gradiente de fase móvel do método de análise de PC. 64

Tabela 5. Parâmetros do espectrômetro de massas otimizados para análise de PC. 65

Tabela 6. Parâmetros da fonte de ionização otimizados para análise de PC. 65

Tabela 7. Valores de fotossíntese de *L. polyedrum* em amostras expostas e não expostas à Cd. 72

Tabela 8. Transições de PC utilizadas no método de análise por LC-MS. 91

Sumário

1. INTRODUÇÃO 19

1.1 Algas 20

1.1.1. *Lingulodinium polyedrum* 25

1.2. Metais pesados presentes no ambiente 30

1.3. Parâmetros biológicos monitorados no organismo exposto a cádmio 36

1.3.1. Defesa antioxidante não enzimática: glutationa 36

1.3.2. Síntese das substâncias quelantes: fitoquelatinas 39

1.3.3. Defesa antioxidante enzimática: superóxido dismutase (SOD) 41

2. OBJETIVOS 44

3. MATERIAIS E MÉTODOS 46

3.1 Manipulação das culturas 47

3.1.1 Cultivo de microalgas 47

3.1.2 Determinação da curva de crescimento por contagem de células (microscopia) e espectrofotometria 48

3.2 Análise do desempenho fotossintético de *L. polyedrum* 50

3.2.1 Determinação da dose letal 54

3.3 Quantificação de proteínas 55

3.4 Análise de Cd presente na água do mar 55

3.4.2 Método 56

3.5 Análise de superóxido dismutase (SOD) 56

3.5.1 Obtenção dos extratos 56

3.5.2 Método 57

3.6 Análise de glutationa reduzida (GSH) e oxidada (GSSG) 59

3.6.1 Extração 59

3.6.2 Método de análise por LC-MS 60

3.7 Análise de fitoquelatinas 62

3.7.1 Padrões 62

3.7.2 Extração 63

3.7.3 Método de análise por LC-MS 63
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO 66
4.1 Culturas 67
4.2 Análise do desempenho fotossintético de *L. polyedrum* 71
4.2.1 Dose letal 71
4.3 Quantificação de proteínas 73
4.4. Análise de Cd presente na água do mar 74
4.5 Análise de superóxido dismutase (SOD) 76
4.4 Desenvolvimento de métodos em LC-MS/MS 78
4.5 Análise de glutationa reduzida (GSH) e glutationa oxidada (GSSG) 81
4.4.1 Análise de GSH e GSSG em amostras expostas cádmio 86
4.5. Análise de fitoquelatinas 90
4.5.1. Estabilidade 92
4.5.2. Fragmentação de PC3 e PC4 94
4.5.3. Quantificação de PC3 e PC4 em amostras expostas a Cd 97
4.5.4. Quantificação de PC3 e PC4 em concentrações crescentes de Cd 99
4.5.5. Quantificação de PC3 e PC4 em tempos crescentes de exposição a Cd 101
5. CONCLUSÕES 105
6. BIBLIOGRAFIA 107
7. ANEXOS 123

1. INTRODUÇÃO

1.1 Algas

O ambiente aquático é altamente complexo e, por essa razão, apresenta-se como um dos mais distintos e variados ecossistemas, abrangendo tanto os biomas de água doce como os grandes ecossistemas marinhos (Rand, 1995). Os oceanos, responsáveis por 70% da superfície do globo terrestre, abrigam cerca de 200.000 espécies marinhas, entre plantas, animais e microorganismos (Sze, 1998). A investigação de várias espécies deste habitat demonstra que o ambiente marinho é uma fonte rica em compostos bioativos, com diversas ações biológicas como fotoprotetores, anti-inflamatórios, antioxidantes, quelantes, entre outros (De Vries & Beart, 1995; Hay, 1996; Okai *et al.*, 1996; Mundt *et al.*, 2001; Yoon *et al.*, 2003; Asai *et al.*, 2004).

Os primeiros organismos vivos surgiram na Terra há 3,5 bilhões de anos. Esses organismos não possuíam um núcleo bem definido nem outros compartimentos celulares complexos e obtinham energia ora como heterótrofos, consumindo matéria orgânica do ambiente aquático à sua volta, ora como autótrofos, utilizando material inorgânico (Pinto, 2002). Autótrofos incluíam formas quimiossintéticas, similares às bactérias encontradas atualmente próximas a geotermas, nas profundezas dos oceanos, e as sulfobactérias que dispunham de um fotossistema simples na fotossíntese (Sze, 1998).

As primeiras algas (cianobactérias) apareceram há 3,5 bilhões de anos (Schopf, 1993). Estas introduziram a fotossíntese com dois fotossistemas, nos quais a H_2O é consumida e O_2 é gerado como um subproduto que, quando liberado, afeta profundamente a Terra (Pinto, 2002).

O acúmulo de O_2 na atmosfera permitiu a formação da camada de ozônio, a qual protege a superfície terrestre contra a radiação ultravioleta. Além disso, o O_2 permitiu o desenvolvimento da respiração aeróbica nas células, as quais passaram a obter energia com mais eficiência mediante a quebra de matéria orgânica. Sob essas condições, outro tipo de célula, com núcleo e organelas complexas, surgiu há cerca de 2,1 bilhões de anos (Han & Runnegar, 1992). Atualmente, as algas continuam sendo importantes produtoras de O_2 e matéria orgânica nos ambientes oceânico, estuarino e de água doce; ademais algumas adaptaram-se ao ambiente terrestre ou passaram a fazer parte de associações simbióticas com outros organismos (Sze, 1998).

As algas evoluíram para um diverso grupo de organismos fotossintéticos, apresentando uma grande diversidade de formas, desde células microscópicas simples até algas multicelulares com vários metros de comprimento. Seus pigmentos fotossintéticos, suas formas e estruturas celulares apresentam variações, mas a maioria possui seus sistemas fotossintéticos baseados na clorofila-a. O grupo das algas inclui poucas espécies sem cores ou não fotossintéticas, que são relatadas como espécies heterotróficas (Sze, 1998).

A fotossíntese é a rota pela qual quase toda a energia entra na biosfera. Este processo realiza a transformação de energia luminosa, emitida pelo sol, em energia química, que é estocada pelos organismos fotossintetizantes autotróficos na forma de glicose (6 carbonos). A energia armazenada nessas moléculas pode ser utilizada para impulsionar processos celulares na planta e servir como fonte de energia para todas as formas de vida.

O maior constituinte do fitoplâncton marinho é o grupo de algas unicelulares conhecidos como dinoflagelados. Eles são economicamente importantes por produzirem neurotoxinas, cujos efeitos prejudiciais são potencializados durante eventos de maré vermelha (Landsberg, 2002). Esse fenômeno tem sido bastante estudado em razão do aporte de nutrientes em corpos hídricos, provenientes de efluentes domésticos e industriais, fertilizantes agrícolas e outras fontes, que podem propiciar condições ideais para a proliferação dessas microalgas (Cardozo, 2007).

Metade de todas as espécies de dinoflagelados é heterotrófica; algumas produzem toxinas e algumas são bioluminescentes (como a *Lingulodinium polyedrum*), sendo que estas são responsáveis pelo fenômeno de fluorescência no oceano (Okamoto *et al.*, 1999). Dinoflagelados também produzem cistos que funcionam como agentes dispersivos e são importantes para a sobrevivência celular em condições adversas (Anderson *et al.*, 1984).

As algas oferecem importantes contribuições ao meio ambiente, uma vez que constituem a base da cadeia alimentar no ambiente aquático, participando no processo de transferência de nutrientes para crustáceos, peixes e animais de outros níveis tróficos marinhos e terrestres (Moore *et al.*, 2004). Ao acumular as substâncias tóxicas presentes no ambiente e servirem de alimento para outras espécies, elas podem provocar biomagnificação do agente tóxico ao longo da cadeia.

Também são responsáveis por aproximadamente 50% da produção de oxigênio molecular, metade da atividade fotossintética global, e pela produção da maior parte de dimetilsulfeto que, ao ser lançado para a atmosfera, induz a formação de nuvens (Gibson *et al.*, 1990). Desta forma, as algas colaboram para o

estabelecimento do chamado “balanço ecológico” no ambiente aquático, promovendo maior biodiversidade no meio onde se encontram (Rocha, 1992).

O estudo de algas em um país com costa extensa como o Brasil é muito interessante, já que elas são a base do ecossistema marinho e sua presença está diretamente relacionada com a economia das populações que retiram do mar seu sustento.

Em todo o planeta, mais de 3 bilhões de pessoas vivem nas proximidades litorâneas, movidos pela expansão das atividades econômicas e/ou pelas características físicas e condições de vida locais (Torres *et al.*, 2008). Essa situação faz com que os dejetos produzidos (tanto de origem industrial como doméstica) e a destruição de hábitats naturais tenham impactos substanciais nos ambientes costeiros (Moore *et al.*, 2004).

Com o passar do tempo, o cultivo contínuo de algas sob condições controladas tornou-se um campo economicamente importante. Nas últimas décadas, notou-se um grande passo na produção e utilização de algas graças aos esforços de muitos pesquisadores em diferentes países (Becker, 1994). Técnicas de cultivo de algas em larga escala e desenvolvimento de processos para sua utilização foram realizados com sucesso em muitos países e tentativas nesta direção mostram-se interessantes para países em desenvolvimento (Venkataraman & Becker, 1985).

Pesquisas em aplicação da ficologia foram realizadas e demonstram que a biomassa algal ter várias aplicações, como ração animal, biofertilizantes, condicionador de solos e como nutrientes em aquicultura podendo ainda resolver problemas de saúde pública por purificar água descartada em sociedades em rápido

desenvolvimento (Becker, 1994). Isso sem esquecer do fato de as próprias algas serem usadas como biorremediadores.

Pesquisas mais recentes demonstram o potencial das algas na produção de diversos compostos, como polissacarídeos, lipídeos, proteínas, carotenóides, pigmentos, vitaminas, esteróis, enzimas, antibióticos, fármacos e outros produtos de química fina como hidrogênio, hidrocarbonetos e outros biocombustíveis (metanol e etanol) (Armisen, 1995; Vidotti & Rollemberg, 2004).

Além das algas, uma grande variedade de microorganismos (como bactérias, leveduras, protozoários e fungos) é encontrada em águas que recebem efluentes industriais. Muitos dos microorganismos mostram adaptação aos materiais tóxicos liberados constantemente em seu ambiente (Rehman *et al.*, 2007). Eles desenvolveram estratégias para resistir, tolerar, metabolizar e destoxificar as substâncias tóxicas (Parsek *et al.*, 1995). Vários mecanismos de tolerância a metais pesados têm sido relatados em diferentes tipos de célula, tais como alteração na parede celular, redução da permeabilidade da membrana celular, extrusão ativa, absorção por vacúolos ou organelas e complexação com agentes quelantes, tais como proteínas (por exemplo, metalotioneína e fitoquelatina) (Gekeler *et al.*, 1988; Rauser, 1990).

Microorganismos com a capacidade de crescer na presença de metais pesados têm potencial em biorremediação de águas poluídas (Rehman *et al.*, 2007). Algas resistentes a metais têm sido relatadas em vários estudos (Haq & Shakoori, 1998; Nishikawa & Tominaga, 2001; Rehman & Shakoori, 2001).

1.1.1. *Lingulodinium polyedrum*

A importância da *Lingulodinium polyedrum* deve-se ao fato de ser uma espécie de dinoflagelado amplamente distribuída em águas quentes temperadas e subtropicais das zonas costeiras (Dodge, 1989). Ela é responsável por dois terços das marés vermelhas e está associada com eventos de mortalidade de peixes e mariscos (Torrey, 1902).

Lingulodinium polyedrum é um dinoflagelado marinho de aproximadamente 40 μm (figura 1), fotossintetizante que possui um relógio circadiano endógeno, que controla o horário do dia ou da noite à medida em que diferentes processos ocorrem (Sweeney, 1987). Este controle é amplamente encontrado em sistemas biológicos, ocorrendo em procariotos e eucariotos (Hastings *et al.*, 1991; Johnson *et al.*, 1996). Numerosos estudos revelaram um comportamento rítmico em sua bioluminescência (Hastings & Sweeney, 1958), divisão celular e agregação (Sweeney & Hastings, 1958; Roenneberg & Taylor, 2000), capacidade fotossintética (Hastings *et al.*, 1961), formação de cistos (Behrmann & Hardeland, 1995), assimilação de nitrogênio (Ramalho *et al.*, 1995) e controle intracelular de espécies reativas de oxigênio (Hollnagel *et al.*, 1996). A divisão celular ocorre na transição entre a noite e o dia (Roenneberg, 1993).

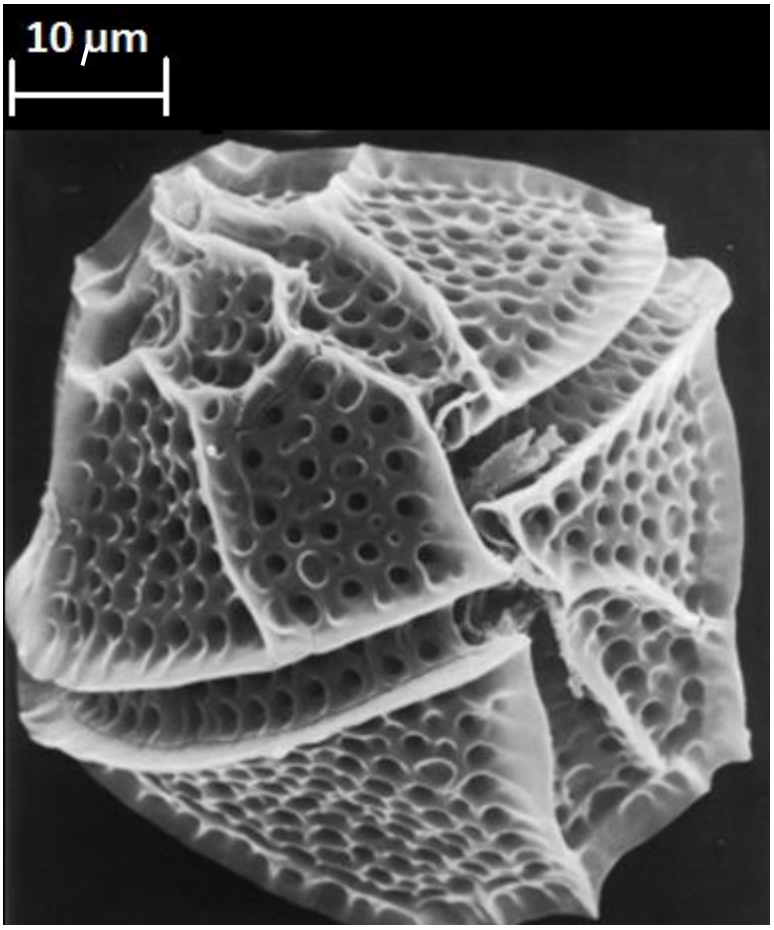
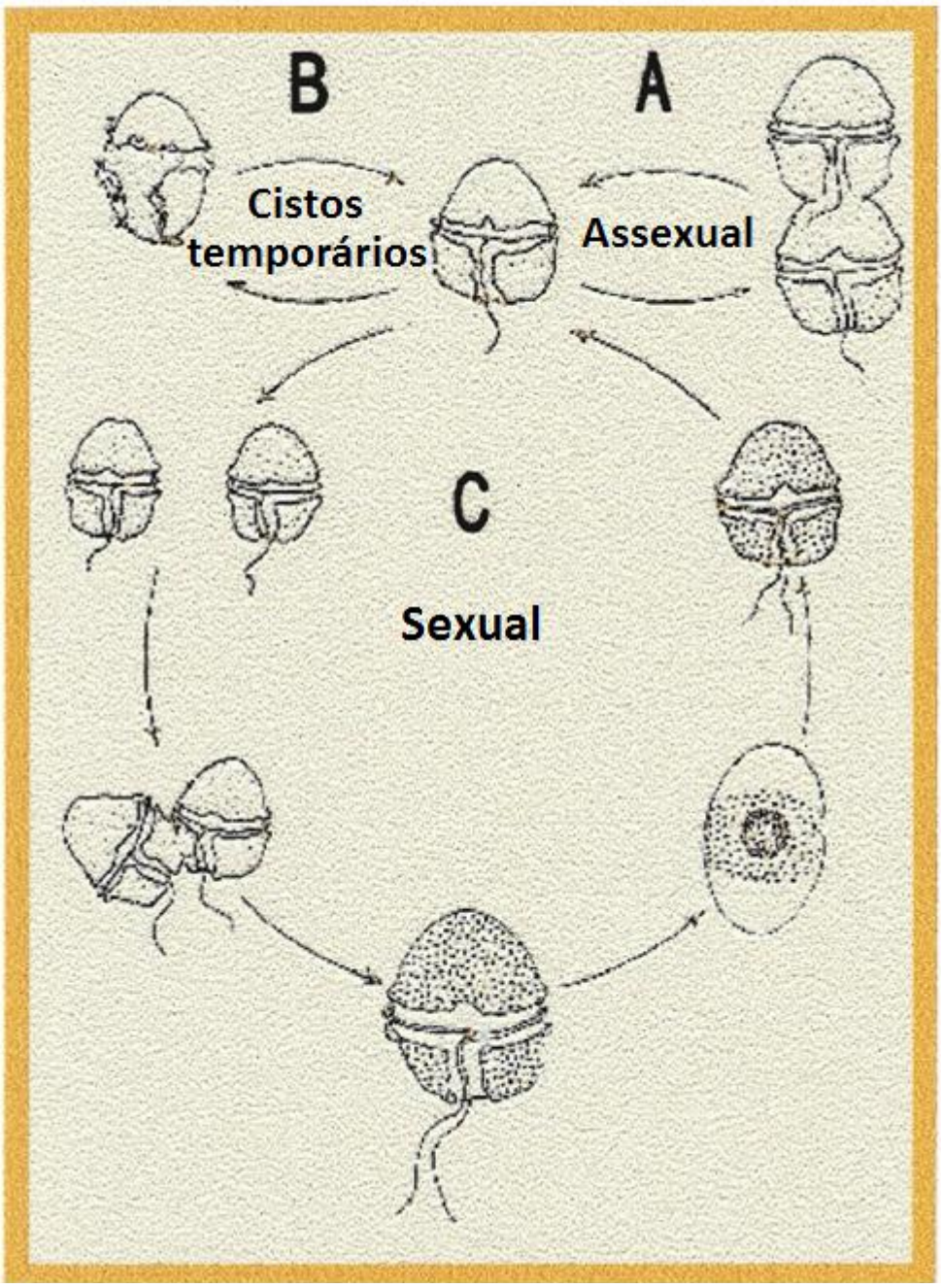


Figura 1. Microscopia eletrônica de varredura de *Lingulodinium polyedrum* retirado de Coturnix (2006).

As características ultraestruturais típicas de *L. polyedrum* são: núcleo em forma de “C” contendo os cromossomos condensados; presença de tricocistos (agregados protéicos); corpos multivesiculares; “scintillons” (organelas que emitem luz); grande parte da célula ocupada por cloroplastos; e uma teca elaborada (Hollnagel, 2000). Os cloroplastos possuem uma forma reticular e ainda não foi elucidado se são constituídos por várias organelas que se comunicam ou por um único cloroplasto com várias ramificações (Behrmann & Hardeland, 1995).

Behrmann e Hardeland (1995) descreveram as mudanças ultraestruturais que ocorrem em formas císticas de *L. polyedrum*. Os cistos deste dinoflagelado apresentam cloroplastos compactados, perda de parte dos “scintillons”, redução no número de tricocistos e presença de grânulos de amido e vacúolos lipídicos.

Fritz e colaboradores (1989), empregando microscopia eletrônica, descreveram com detalhes o ciclo de vida de *L. polyedrum* (esquema 1). Estes autores concluíram que, apesar da maior parte da reprodução em dinoflagelados ocorrer através da divisão mitótica de células vegetativas, a reprodução sexual que ocorre eventualmente é de extrema importância (Hollnagel, 2000). Além dos benefícios conhecidos da recombinação gênica, ela propicia a formação de cistos, os quais podem auxiliar na dispersão da espécie, iniciar a floração em casos favoráveis e garantir a sobrevivência em situações desfavoráveis. O período de encistamento pode variar de 12 horas até meses.



Esquema 1. Ciclo de vida do gênero *Lingulodinium*. Da célula vegetativa central (forma mastigota) podem ser visualizados três ciclos possíveis. Ciclo A: divisão mitótica; ciclo B: formação de cistos temporários; ciclo C: reprodução sexual com a formação de gametas móveis, sua fusão e a produção de um zigoto com quatro flagelos, e em sequência a formação de um zigoto imóvel (cisto) e o encistamento, regenerando um zigoto móvel. Divisões deste zigoto, produzem células vegetativas. extraído de Fritz e colaboradores 1989).

O processo de encistamento em dinoflagelados representa uma condição adaptativa para escapar de condições adversas. Em *L. polyedrum*, este pode ser desencadeado por vários sinais, tais como: dias curtos (Balzer & Hardeland, 1991; Balzer, 1992), baixas temperaturas (Hardeland, 1994) e estresse mecânico ou químico (Wolf *et al.*, 1994; Okamoto & Colepicolo, 1998).

Segundo Hastings e Dunlap (1986), a bioluminescência ocorre de dois modos ("flash" e "glow"), ambos exibindo ritmicidade diária. Estes pesquisadores observaram que a emissão de luz que se segue após estimulação mecânica ("flash") é máxima na metade da noite e mínima durante o dia (Hollnagel, 2000). O outro tipo de emissão, denominado "glow", consiste na emissão espontânea que ocorre no final do período de escuro.

Em *L. polyedrum* a capacidade fotossintética varia ao longo do dia, sendo máxima no meio da fase de claro e mínima no meio da fase escura (Hastings *et al.*, 1961; Prezelin & Sweeney, 1977). A capacidade fotossintética de *L. polyedrum* está sob o controle do oscilador circadiano, cujo período e fase podem ser alterados por inibidores de fotossíntese (Roenneberg, 1993). O fluxo de elétrons através dos dois fotossistemas em *L. polyedrum* é rítmico (Lonergan, 1984). Isto indica que a coordenação dos dois fotossistemas e a cadeia de transporte de elétrons interconectada, envolvida no fluxo não-cíclico de elétrons, são controladas em parte, pelo relógio biológico (Lonergan, 1984).

Foram descritas duas enzimas em *L. polyedrum* cuja atividade máxima ocorre durante o dia, próxima do máximo de atividade fotossintética: a enzima superóxido

dismutase (SOD) (Colepicolo *et al.*, 1992; Asano *et al.*, 1996), e a nitrato redutase (Ramalho *et al.*, 1995). Estes dados sugerem uma interação dos mecanismos metabólicos com a maior atividade celular diurna e, portanto, à regulação pelo relógio biológico.

Apesar de sua importância ecológica, relativamente pouco é conhecido sobre o papel de *L. polyedrum* nas cadeias alimentares planctônicas (Moorthi *et al.*, 2006) como, fatores específicos que controlam floração ou dinâmica do impacto das florações sobre relações tróficas no plâncton.

A capacidade de fitoplânctons marinhos (incluindo a *L. polyedrum)* de manter o balanço natural de pró-oxidantes e antioxidantes nas células durante o crescimento foi avaliado por Sigaud-Kutner e colaboradores (2002), baseando-se nas mudanças de atividade de SOD e quantidade de pigmentos fotossintéticos.

1.2. Metais pesados presentes no ambiente

Os oceanos foram considerados, apor anos, um grande reservatório para a eliminação segura de poluentes. Muitos contaminantes químicos, incluindo compostos organoclorados, herbicidas, resíduos domésticos e municipais, produtos de petróleo e metais pesados, são reconhecidos por gerarem efeitos adversos nos oceanos, mesmo quando liberados em níveis baixos (Haynes & Johnson, 2000).

Metais estão presentes naturalmente no ambiente e vários deles são componentes essenciais dos ecossistemas globais. Alguns metais, em baixa quantidade (traços) são utilizados pelos organismos vivos para estabilizar as

estruturas protéicas, facilitar a transferência de elétrons e catalisar reações enzimáticas (Ash & Stone, 2003). Por exemplo, cobre (Cu), zinco (Zn) e ferro (Fe) são essenciais para a constituição dos sítios catalíticos de diversas enzimas (Allan, 1997).

Outros metais, no entanto, como chumbo (Pb), mercúrio (Hg) e cádmio (Cd), além de não possuírem funções conhecidas nos organismos vivos, podem deslocar ou substituir metais-traço essenciais e interferir no funcionamento de enzimas e cofatores associados (Torres *et al.*, 2008). Os metais estão presentes no ambiente em diferentes estados de oxidação e números de coordenação, e essas diferenças estão relacionadas à sua toxicidade (Pinto *et al.*, 2003).

A poluição ambiental por metais intensificou-se a partir do século 19, por conta do aumento da mineração e das atividades industriais (Okamoto *et al.*, 1999). Desde então, vem aumentando a quantidade de metais extraídos e produzidos. Em 2007 a produção anual de Cu, Cd, Pb e Hg foi, respectivamente, de $1,5 \times 10^7$; $2,0 \times 10^4$; $8,2 \times 10^6$ e $1,2 \times 10^3$ toneladas (Index Mundi, 2009).

Entretanto, o problema da poluição foi negligenciado até aproximadamente dois séculos atrás (Swaminathan, 2003), quando os efeitos decorrentes da ocupação urbana ou mesmo turística (da industrialização, da agricultura intensiva e da exploração dos estuários), atingiram limiares com graves reflexos e consequências adversas para todos os ecossistemas, particularmente ao bioma marinho; gerando, dessa forma, uma ameaça direta ao futuro da humanidade (Islam & Tanaka, 2004).

Em ambientes marinhos, a sedimentação de microalgas durante sua proliferação tem sido associada com uma redução substancial (20 - 75%) dos níveis de metais pesados suspensos, assim como sua deposição (Luoma *et al.*, 1998). Da mesma forma, para muitos xenobióticos orgânicos, as algas desempenham um papel importante na dispersão (Wang *et al.*, 1998; Kowalewska, 1999), transformação química e bioacumulação (Murray *et al.*, 2003; Bopp & Lettleri, 2007; Lei *et al.*, 2007)

Muitos poluentes tóxicos e bioacumuláveis são encontrados apenas em quantidades baixas na água, e muitas vezes em níveis elevados nos sedimentos (Torres *et al.*, 2008).

A disponibilidade de um determinado metal no meio é dependente da salinidade do meio, pH, estado de oxirredução, presença de microorganismos e de compostos aos quais o metal pode se ligar (sulfetos, hidróxidos, carbonatos e alguns compostos orgânicos, como ácidos fúlvico e húmico), distribuição da matéria orgânica e proporção de argila e areia no solo (Oga *et al.*, 2008). Grosseiramente pode-se afirmar que a ligação dos metais pesados aos constituintes do solo cresce no seguinte sentido: Cd<Zn<Pb<Cu (Oga *et al.*, 2008).

A produção da mineração mundial de Cu, Cd, Pb e Hg, como mostrado anteriormente é considerável. Esses poluentes, derivados de um número crescente de diferentes fontes antrópicas (efluentes industriais e resíduos, esgoto urbano, estações de tratamento de esgotos, escoamento de fungicidas agrícolas, depósitos de lixo doméstico e operações de mineração), têm afetado cada vez mais diferentes ecossistemas (Macfarlane & Burchett, 2001).

A atividade humana está muitas vezes ligada à poluição. Em um estudo (Pospelova *et al.*, 2002) comparando a baía marinha de uma região desenvolvida, com a de uma região subdesenvolvida em Massachusetts, verificou-se que a poluição na área desenvolvida causou um declínio drástico na riqueza de espécies de fitoplâncton, determinada a partir de análises de cistos de dinoflagelados no sedimento.

Curiosamente, o aumento da disponibilidade de nutrientes (em especial, de nitrogênio) aumenta drasticamente a capacidade das algas de acumular metais pesados (Wang & Dei, 2001b; Wang & Dei, 2001a), sugerindo que o escoamento agrícola em água doce e nas zonas costeiras irá aumentar consideravelmente a entrada de metais pesados na cadeia alimentar (Pinto *et al.*, 2003).

O Cd é um metal pesado não essencial, naturalmente distribuído no ambiente ou por atividades humanas. Ele pode ser acumulado no organismo humano com meia-vida acima de dez anos, causando disfunção renal e enfisema pulmonar, além de ser um suspeito carcinógeno (Buchet *et al.*, 1990). É estimado que pelo menos 70% do Cd absorvido pelos humanos tem origem de plantas utilizadas como alimento (Wagner & Donald, 1993).

Baterias recarregáveis são ainda hoje importante fonte de contaminação de solos e águas por Cd. Elas utilizam reações eletroquímicas reversíveis, utilizando hidróxido de Ni e Cd metálico como eletrodos (Solucorp, 2006). Durante muitos anos foram utilizadas em grande escala em todo o mundo, mas devido ao impacto ambiental que causam, foram banidas em muitos países e, na União Européia está proibida desde 2004, sendo substituída pelas baterias de níquel metal hidreto, menos tóxicas (Buchmann, 2005). Além disso, o Cd também é utilizado numa série

de aplicações industriais, como galvanoplastia, proteção contra a corrosão e estabilizador de plástico (Rehman *et al.*, 2007).

O acúmulo de Cd ocorre em vários tecidos e órgãos, sendo que o acumulo é maior no córtex renal (Ipcs, 1992; Jarup *et al.*, 1998). A concentração renal de Cd está relacionada à idade e, normalmente, atinge um patamar em 50 anos de idade, em consonância com uma degeneração da função renal de reabsorção associada à idade. Cerca de 0,001% de Cd no organismo é excretado por dia, principalmente na urina. Essa taxa de excreção extremamente lenta do Cd é devida à falta de um mecanismo bioquímico ativo para a eliminação e graças à reabsorção renal (Satarug & Moore, 2004).

A manifestação de nefrotoxicidade causada pelo Cd, (incluindo proteinúria, calciúria, aminoacidúria, glicosúria e necrose tubular) é detectada quando a concentração renal de cádmio é maior ou igual a 50 µg por grama de peso tecidual. Um aumento no risco de mortalidade de 40% a 100% foi observado em indivíduos com sinais de nefropatia (Jarup *et al.*, 1998; Arisawa *et al.*, 2001).

Além de sua conhecida nefrotoxicidade, a exposição crônica a baixo nível de Cd tem sido associada a uma série de patologias, tais como o estágio final de falência renal, início precoce de complicações renais em diabéticos, osteoporose, alteração na pressão arterial e aumento do risco de câncer (Ipcs, 1992; Nakagawa & Nishijo, 1996; Iarc, 1997; Jarup *et al.*, 1998).

O armazenamento de metais por mecanismos de desintoxicação celular, como a síntese de metalotioneínas (Mt) e fitoquelatinas (PC), torna-os disponíveis

para assimilação pela biota e biomagnificação ao longo da cadeia alimentar aquática, com potencial para produzir efeitos negativos em todo o ambiente marinho.

As Mt são proteínas citosólicas cuja função biológica está relacionada à regulação de metais essenciais e à destoxificação de metais tóxicos. As Mt constituem uma classe de proteínas citosólicas de baixo peso molecular, apresentando em torno de 6 – 7 kDa, e sua estrutura molecular é composta de uma única cadeia de aminoácidos dos quais 20 são cisteínas, as quais representam em torno de 30% do total de aminoácidos (Inácio, 2006).

A abundância de ligantes tiol das cisteínas presentes na estrutura das Mt e das PC confere às moléculas uma alta afinidade por íons metálicos livres, o que faz destas substâncias importantes quelantes e de grande interesse sob o ponto de vista bioquímico.

O mecanismo de toxicidade dos metais pesados ainda não foi completamente elucidado. No entanto, grande parte de sua toxicidade está relacionada ao estresse oxidativo induzido nos sistemas vivos (Robinson *et al.*, 1994; Okamoto & Colepicolo, 1998; Adonaylo & Oteiza, 1999; Livingstone, 2001; Wang & Shi, 2001). Metais pesados podem provocar dano oxidativo tanto por aumentar diretamente a concentração celular de espécies reativas de oxigênio (ROS) (Halliwell, 1982) quanto por diminuir a capacidade antioxidante celular (Sies, 1999).

Embora cada metal tenha seus próprios mecanismos de ação, a geração de ROS por metais e os efeitos resultantes sobre a sinalização celular parecem resultar de um mecanismo comum (Wang & Shi, 2001; Qian *et al.*, 2003; Leonard *et al.*, 2004). Um dos membros importantes da família ROS é o ânion radical superóxido

(O_2^-), que pode ser dismutado para formar peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o altamente reativo radical hidroxila (-OH), na presença de alguns íons metálicos de transição (Chen & Shi, 2002).

A geração excessiva de ROS pode levar à estimulação do processo inflamatório envolvendo a secreção de fatores quimiotáticos, fatores de crescimento, enzimas proteolíticas, lipoxigenases, enzima ciclooxigenase, inativação de enzimas antiproteolíticas, e a liberação de proteínas sinalizadoras (Wang & Shi, 2001; Qian *et al.*, 2003; Leonard *et al.*, 2004).Células tentam neutralizar estas cascatas de ROS com antioxidantes, já que existe um equilíbrio entre oxidantes e defesas antioxidantes (Ho *et al.*, 1998).

1.3. Parâmetros biológicos monitorados no organismo exposto a cádmio

1.3.1. Defesa antioxidante não enzimática: glutationa

O tripeptídeo L-γ-glutamil-L-cisteína-glicina (GSH, figura 2) é a principal molécula tiólica de baixo peso molecular encontrada em organismos vivos, atuando como um tampão redox mantendo o potencial redox tiol/dissulfeto. A glutationa dissulfeto também conhecida como glutationa oxidada (GSSG) é formada a partir da oxidação de GSH.

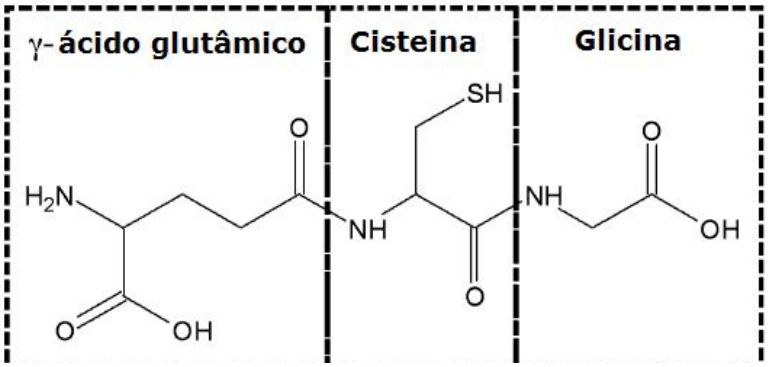


Figura 2. Estrutura da glutationa reduzida, formada pelos aminoácidos glicina, cisteína e ácido glutâmico.

A GSH é amplamente utilizada como marcador de estresse oxidativo para diversos organismos, dentre eles plantas e algas (Grill *et al.*, 2002). Ela está relacionada com o sequestro de xenobióticos e metais pesados, além de ser um componente essencial no sistema de defesa antioxidante celular (figura 3), que mantém as ROS sob controle (Noctor & Foyer, 1998).

A GSH tem desempenhado papel antioxidante em diferentes compartimentos celulares além dos cloroplastos, como nas mitocôndrias, no citosol e peroxissomos (Noctor *et al.*, 2002), além de estar presente em altas concentrações no núcleo (Muller *et al.*, 2002). Atualmente, se discute a possibilidade de utilizá-la como um modelo universal redox e de sinalização no nível celular (Noctor *et al.*, 2002). Recentes resultados sugerem a existência de sistemas de transporte de GSH em membranas com rápidas taxas de transporte, como, por exemplo, entre cloroplastos e citosol (Noctor *et al.*, 2002).

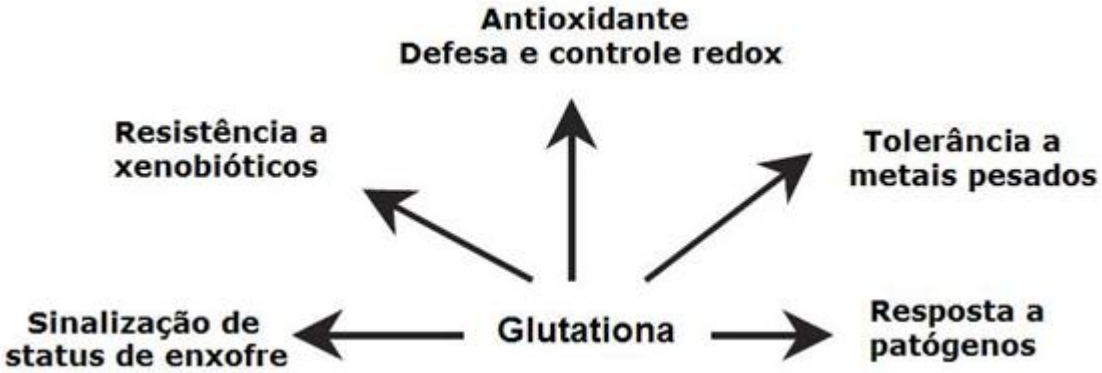


Figura 3. Atividades atribuídas à glutationa. Adaptado de Tausz et al, (2004).

A GSH é também um importante constituinte fisiológico envolvido em reações de fase 2 de biotransformação. As reações de fase 2 são caracterizadas pela incorporação de cofatores endógenos às moléculas que entram no organismo (fármacos, agentes tóxicos, etc.). A conjugação com GSH é catalisada, na sua fase inicial, pela glutationa S-transferase. Qualquer fator que reduza a concentração de GSH (como ROS) pode aumentar a toxicidade de substâncias que originam metabólitos reativos (Oga *et al.*, 2008).

Existem muitos métodos para análise de GSH e GSSG. Entre eles, tem-se a análise por espectrofotometria (Nubel *et al.*, 2000; Rossi *et al.*, 2002), eletroforese capilar (Lee & Britz-Mckibbin, 2009), HPLC com detecção eletroquímica (Stejskal *et al.*, 2008; Torres, 2008; James *et al.*, 2009; Manini *et al.*, 2009) e HPLC com detecção por espectrometria de massas (Brautigam *et al.*, 2009; Harwood *et al.*, 2009; Jin *et al.*, 2009).

A escolha de HPLC-MS deu-se pelo maior limite de detecção e pela alta especificidade da técnica. Estes fatores são deveras importantes, uma vez que se

optou por uma extração simples e rápida, sem longas etapas de limpeza das amostras.

1.3.2. Síntese das substâncias quelantes: fitoquelatinas

Uma grande variedade de plantas superiores, bem como algumas algas e fungos, é capaz de sintetizar peptídeos ricos em sulfidrilas, conhecidos como fitoquelatinas (Phytochelatins - PC) (Gekeler *et al.*, 1989; Rauser, 1990). A síntese desses compostos é induzida por estresse gerado por metais e sua estrutura geral é (γ-Glu-Cys)n-Gly, sendo n de 2 a 11 (Rauser, 1995), conforme mostra a figura 4.

Por serem ricas em aminoácido cisteína, as PC contêm grupos tióis ricos em elétrons, que possuem capacidade quelante de vários íons metálicos (Zenk, 1996). Esses grupos tióis também tornam as PC sensíveis à oxidação espontânea, que pode causar a formação de agregados peptídicos ou de radicais orgânicos (Bagiyan *et al.*, 2003; Cardey *et al.*, 2007).

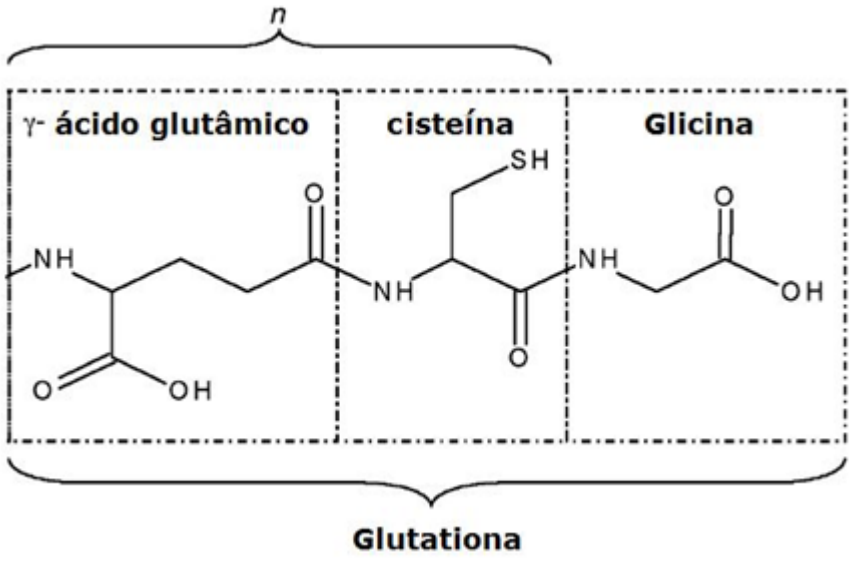


Figura 4. Estrutura geral das fitoquelatinas, sendo n de 2 a 11.

As PC quelam metais formando complexos amorfos, pois elas são sintetizadas com tamanho de cadeias γ-Glu-Cis diferentes (Hirata *et al.*, 2005). Isso é importante porque cadeias maiores possuem mais ligações estáveis com metais (Mehra *et al.*, 1995). A quelação de metais é sempre feita pelos átomos de enxofre e, nos casos em que a planta é exposta à apenas um metal contaminante, pode-se calcular a relação de grupos tióis (moles) ligados a metais que estão presentes no organismo exposto (Rauser, 1990).

Muitos estudos indicam que o Cd é capaz de induzir e se ligar a PC em plantas (Huang *et al.*, 1987; Jackson *et al.*, 1988; Maitani *et al.*, 1996) e alguns estudos mostram que organismos Cd-tolerantes têm maior quantidade de PC que aqueles não tolerantes (Rauser, 1990; Deknecht, 1994; Deknecht *et al.*, 1995). Além disso, Howden e colaboradores (1995), verificaram que os organismos mutantes deficientes em PC são hipersensíveis a exposições de Cd (Howden *et al.*, 1995). Indicando que, as PC estão relacionadas tanto com a homeostase quanto com a destoxificação de metais.

PC são sintetizadas a partir de GSH pela enzima constitutiva fitoquelatina sintase, ativada por vários íons metálicos, dos quais o Cd é o mais efetivo (Zenk, 1996; Cobbett, 2000). Por ser um íon metálico tiofílico, o Cd tem uma forte tendência de se complexar com as PC (Pearson, 1963), o que reduz significativamente a toxicidade do Cd livre nos tecidos vegetais (Zenk, 1996).

Acredita-se que o complexo Cd-PC esteja localizado preferencialmente nos vacúolos das células vegetais e que pelo menos 97% do Cd presente nestas células, esteja acumulado na forma de complexos Cd-PC (Vogeli-Lange & Wagner, 1990; Kneer *et al.*, 1992).

Uma vez que as PC são sintetizadas pela fitoquelatina sintase, sua concentração no organismo é limitada pela síntese da enzima (Zenk, 1996; Hirata *et al.*, 2005). Como o próprio nome já diz, esta enzima catalisa a hidrólise da porção γ-Glu-Cis de GSH, para que possa se ligar a outra molécula de GSH ou à uma molécula de PC já existente. Essa enzima é ativada pela presença de altas concentrações de metais, incluindo, por ordem de força: Cd>PC^{+2}>Zn^{+2} (Grill *et al.*, 1987; Grill *et al.*, 1989).

Diversas técnicas já foram utilizadas na análise de PC. Entre elas pode-se citar: espectrofotometria (Mokgalaka-Matlala *et al.*, 2009), HPLC com detecção por fluorescência (Morelli *et al.*, 2009; Zabludowska *et al.*, 2009), HPLC com detecção UV/VIS (Grill *et al.*, 1986; Brautigam *et al.*, 2009; Vetterlein *et al.*, 2009; Wojcik *et al.*, 2009) e HPLC com detecção por espectrometria de massas (Hughes *et al.*, 2009; Karimi *et al.*, 2009; Zabludowska *et al.*, 2009).

1.3.3. Defesa antioxidante enzimática: superóxido dismutase (SOD)

Alguns dos efeitos tóxicos provenientes de exposição a metais são decorrentes do aumento intracelular de ROS (Halliwell & Gutteridge, 1999). Altos níveis de ROS podem causar dano em estruturas celulares por peroxidação dos lipídeos de membrana e desnaturações protéicas e ácidos nucleicos (Halliwell & Gutteridge, 1999). Assim como ocorre dano aos sistemas antioxidantes em animais (Rodriguez-Ariza *et al.*, 1994; Holovsk· *et al.*, 2005), as algas também são afetadas (Okamoto *et al.*, 1996; Okamoto & Colepicolo, 1998).

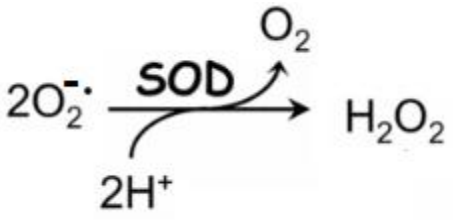
Embora o oxigênio molecular seja essencial para a sobrevivência dos organismos aeróbicos através da fosforilação oxidativa, na qual o oxigênio é

reduzido à água por quatro elétrons, os subprodutos formados decorrentes do metabolismo aeróbico são tóxicos. Estas espécies semirreduzidas e altamente reativas compreendem, entre outros, o radical superóxido ($O_2^{-\bullet}$), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o radical hidroxila ($OH^\bullet$), o oxigênio singlete [$O_2(^1\Delta g)$] e os radicais alcoxila ($HRO^\bullet$) e peroxila ($HROO^\bullet$).

Em organismos fotossintetizantes, tanto a mitocôndria como o cloroplasto produzem ROS. No caso das mitocôndrias, foi sugerido que 1 a 3% do oxigênio reduzido pode gerar ânion superóxido ($O_2^{-\bullet}$) pela perda de elétrons durante a fosforilação oxidativa (Tahara *et al.*, 2009). Nos cloroplastos, a presença de íons metálicos e altas concentrações de oxigênio podem aumentar a geração de ROS, particularmente $O_2^{-\bullet}$ e $^1O_2$ durante o fluxo de elétrons (Okamoto & Colepicolo, 1998).

Em virtude da sua alta reatividade, as ROS são conhecidas pelos seus efeitos deletérios sobre os tecidos celulares, por sua capacidade de reagir com e oxidar biomoléculas fundamentais, como lipídios de membrana, proteínas, clorofila e DNA, provocando a perda de suas funções biológicas. Para contornar este problema, os seres vivos desenvolveram mecanismos de proteção contra as ROS, que podem ser via reações enzimáticas ou por compostos de baixo peso molecular, como a GSH, vitamina E e os carotenóides.

A superóxido dismutase (SOD), enzima considerada a primeira frente de defesa no sistema de anulação de ROS (esquema 2), age sobre O_2-• proveniente de fontes como: fotorredução de O_2 durante estresse foto-oxidativo, respiração celular, ação de enzimas desintoxicantes e processos de infestação por fitopatógenos (Torres, 2008).



Esquema 2. Função da superóxido dismutase: dismutar $O^{2-\bullet}$ a H_2O_2 e O_2.

A enzima SOD está agrupada em classes, de acordo com os metais presentes no sitio ativo. Asano e colaboradores (1995) mostraram que existem três isoformas da enzima SOD em *L. polyedrum*: MnSOD, FeSOD e CuZnSOD, e que os níveis protéicos das isoformas MnSOD e FeSOD e a atividade específica total variam circadianamente com período de aproximadamente 22 h. Estes autores observaram que o ápice de atividade de SOD coincide com o ápice da capacidade fotossintética (meio da fase clara), corroborando a hipótese da função de fotoproteção exercida pela FeSOD (presente nos cloroplastos) nos tilacóides durante os horários de maior produção de O_2.

2. OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho é estudar as diferentes frentes de defesa e mecanismos de desintoxicação utilizados pela microalga *Lingulodinium polyedrum* quando exposta ao metal Cd.

Para se atingir este objetivo central, as seguintes etapas foram abordadas:

1. Cultivo da microalga *L. polyedrum* em incubadoras sob condições controladas e determinação da curva de crescimento de *L. polyedrum* por microscopia óptica e espectrofotometria.

2. Desenvolvimento de método de análise dos níveis e razão de GSH/GSSG através da técnica de HPLC com detecção por espectrometria de massas.

3. Análise do desempenho fotossintético da alga em condições de exposição e não exposição ao metal pesado para determinação da dose letal para 50% da população (DL_{50}).

4. Desenvolvimento de método de análise de PC através da técnica de HPLC com detecção por espectrometria de massas. Estudar a possibilidade de se utilizar PC como biomarcadores de exposição a cádmio.

5. Análise da atividade da enzima SOD, considerada a primeira frente de defesa no sistema de anulação de ROS.

6. Análise da capacidade de *L. polyedrum* de biorremediar metais de ambientes aquáticos.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Manipulação das culturas

3.1.1 Cultivo de microalgas

As culturas-mãe da *L. polyedrum* (figura 5) foram manipuladas sob condições assépticas em fluxo laminar e mantidas em água do mar. A água do mar foi previamente esterilizada em autoclave durante 30 minutos a 121 ºC com 1,5 $kgf.cm^{-2}$ de pressão e, posteriormente, enriquecida com meio de cultura Guillard f/2 (água do mar enriquecida com vitaminas, nitrato, fosfato e metais essenciais) (Guillard & Ryther, 1962). As culturas desenvolveram-se em incubadoras a 20°C com fotoperíodos de 12 horas de luz, com lâmpada fluorescente fria (intensidade luminosa de 150 $\mu E.m^{-2}.s^{-1}$) (Hollnagel, 2000; Okamoto, 2000; Pinto, 2002; Cardozo, 2007; Torres, 2008).

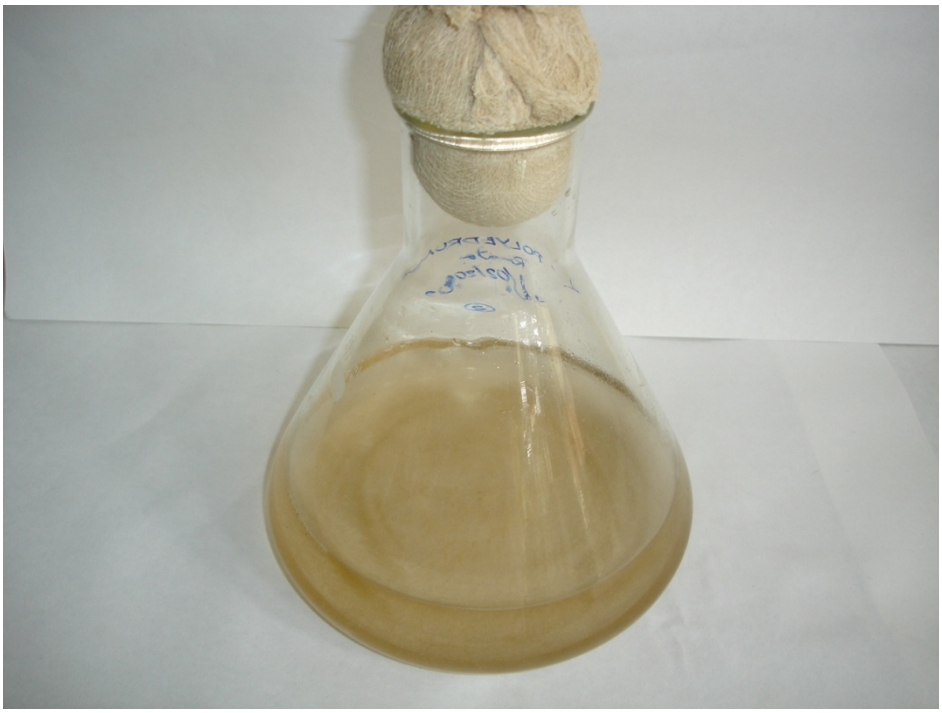


Figura 5. Foto de cultivo de *L. polyedrum.*As células de *L. polyedrum* são mantidas em frascos Fenback em condições controladas de luz e temperatura até atingirem população de 10^4 células/mL.

3.1.2 Determinação da curva de crescimento por contagem de células (microscopia) e espectrofotometria

Sob as condições de cultivo (ítem 3.1.1), células de *L. polyedrum* em um volume de 1,5 L (em triplicatas) foram inoculadas com uma concentração $1x10^3$ células/mL. A determinação da curva de crescimento foi feita por contagem em microscópio óptico e por absorbância em 680 nm em espectrofotômetro, durante 30 dias de crescimento.

A contagem desta espécie é realizada por microscopia utilizando o hemacitômetro Nageotte (Okamoto, 2000) (figura 6). Três alíquotas de 1 mL cada foram retiradas do meio de cultivo e receberam 10 μL de solução de Lugol para corar as células. Foram contadas em microscópio óptico (Nikon, modelo Diaphot-TMD) todas as 40 linhas da placa (conforme ilustra a figura 6) e então multiplicado o resultado por 40 (fator de correção), chegando-se ao numero de células por mililitro.

A medição por absorbância por espectrofotometria foi realizada em comprimento de onda de 680 nm, no espectrofotômetro U-2000 (Hitachi).

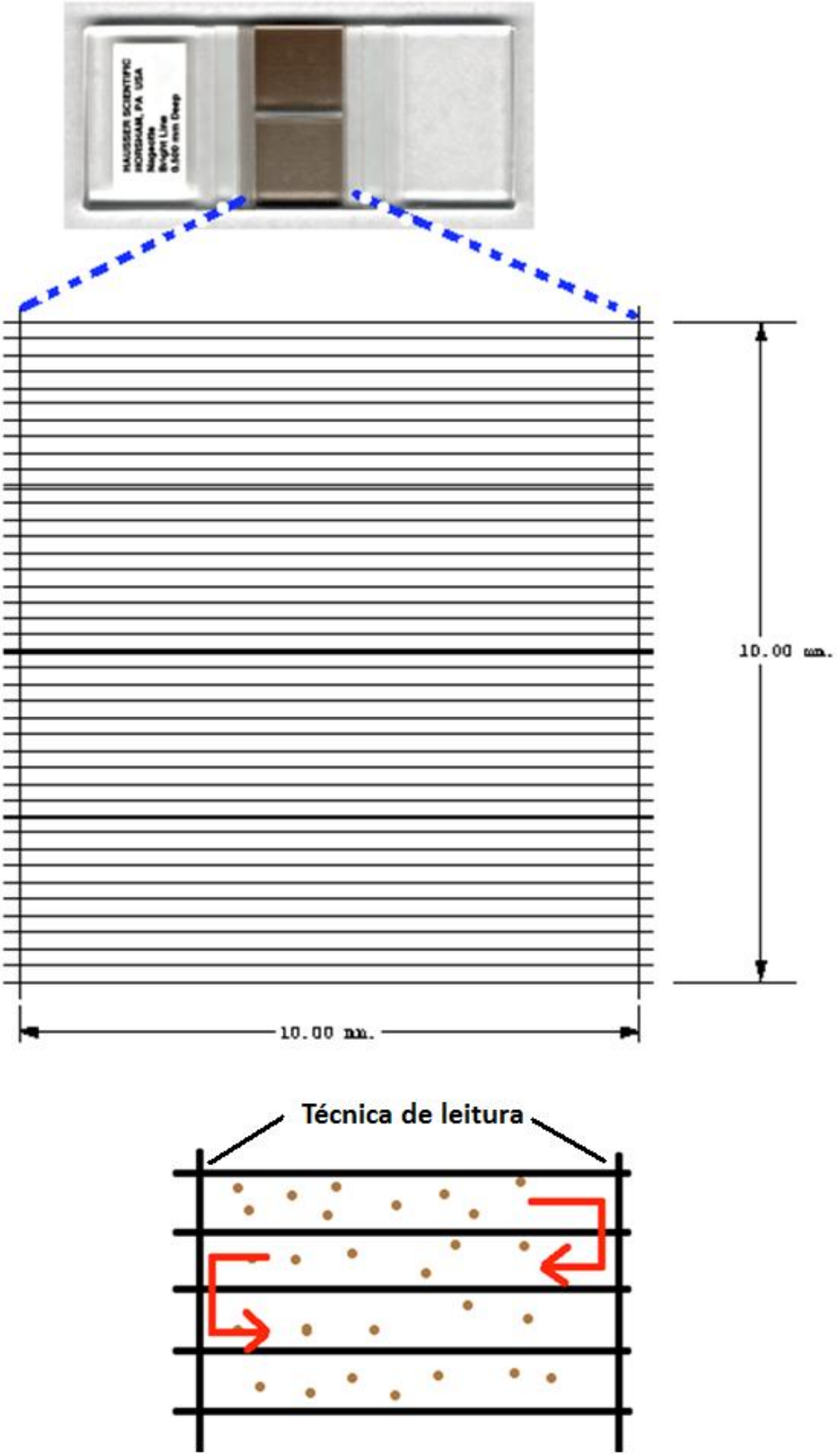


Figura 6. Lâmina Nageotte na parte superior e técnica de leitura na parte inferior.

3.2 Análise do desempenho fotossintético de *L. polyedrum*

Alternativamente, foi escolhida a taxa de fotossíntese da alga como parâmetro para medir viabilidade celular.

O desempenho fotossintético da alga foi determinado por meio de leituras da fluorescência da clorofila-a do fotossistema II dos cloroplastos de *L. polyedrum*. Para tal, utilizou-se o aparelho Diving PAM (marca Walz, figura 7), analisador submersível de desempenho fotossintético, que apresenta funcionamento baseado em pulso de amplitude modulada (PAM) e no método de pulso saturante.

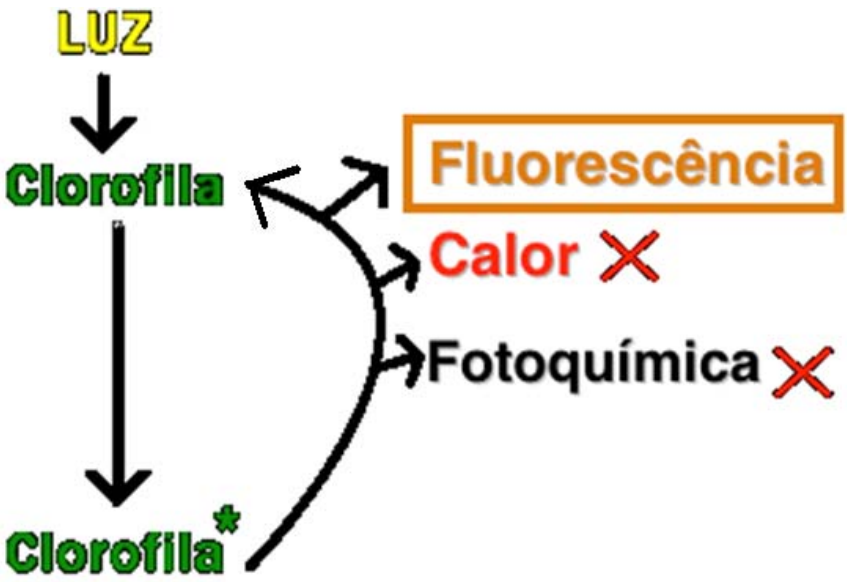
Figura 7. Analisador submersível de desempenho fotossintético Diving PAM.

Basicamente, a energia luminosa que é absorvida pelos fotossistemas pode seguir por 3 diferentes vias: (i) via fotoquímica, que pode ser entendida como a transferência da energia dos fótons da luz, chamada de quantum, em transporte de elétrons da fase "clara" da fotossíntese; (ii) via não-fotoquímica, que é a perda de parte da energia absorvida na forma de calor; e (iii) fluorescência, que é a capacidade que os elétrons possuem de excitar-se ao receberem a energia trazida

pela luz. Durante a fluorescência, os elétrons absorvem energia, excitando-se e, em seguida, retornam ao estado fundamental (de maior estabilidade) ao emitirem a energia absorvida na forma de luz de menor frequência e maior comprimento de onda.

Durante a aplicação de pulsos de luz saturante (SP), a iluminação incidente no organismo analisado é aplicada em frequência, o que permite à fotocélula do fluorímetro diferenciar o sinal da fluorescência da clorofila do sinal de luz do ambiente. Assim, os parâmetros fotossintéticos podem ser determinados com alta reprodutibilidade e confiabilidade, mesmo quando são consideradas análises feitas em campo.

A aplicação do SP suprime a zero a dispersão da energia luminosa pela via fotoquímica. Além disso, como o SP é muito curto (milissegundos), ele não permite que haja variação da dispersão da energia por calor (ou seja, a via não-fotoquímica não apresenta variação). Ainda, o SP, como se configura como luz contendo energia em excesso, culmina por induzir máximo rendimento da fluorescência (Fm). Das 3 diferentes vias que a luz absorvida pode seguir, apenas a fluorescência permanece possível durante o SP e esta é a única variável que resta, justamente aquela que é analisada pelo PAM, como ilustra o esquema 3.



Esquema 3. Excitação da clorofila ao receber luz. Esta energia pode seguir 3 vias: fluorescência, via fotoquímica, dissipação por calor. Estas duas ultimas são inibidas pelo Diving Pam, sobrando apenas a fluorescência que é medida pelo equipamento.

É fundamentalmente a partir deste valor de fluorescência que os demais parâmetros fotossintéticos são determinados. Assim, efetivamente, apenas as reações luminosas da fotossíntese (fase “clara”), mais especificamente as que ocorrem no PS II, é que são avaliadas pelo equipamento.

Padronizou-se a quantidade de clorofila que foi lida por amostra por meio dos valores de fluorescência transitória (Ft), que devem estar entre 0,2 e 0,4 unidades antes do início das leituras.

A forma escolhida para se fazer a análise de taxa fotossintética foi através da ETR (taxa de transporte de elétrons relativa) máxima medida na condição de radiação fotossinteticamente ativa (PAR) correspondente. Ou seja, foi fixada a iluminação incidente que gera a taxa de fotossíntese máxima da alga, e mediu-se a ETR correspondente.

A ETR é um parâmetro derivado do rendimento quântico efetivo (RQE), que mede a taxa de transporte de elétrons entre o PSII e PSI, dando uma indicação da fotossíntese global. O RQE é o parâmetro mais utilizado, o qual mede a proporção de luz absorvida pela clorofila associada ao PSII que é usada na via fotoquímica. Uma vez que não há adaptação da planta ao escuro, é possível obter a performance fotossintética real que a planta apresenta no momento da medida. Esse parâmetro deve ser avaliado em condição "steady-state" e com iluminação abaixo da condição de saturação. Para calculá-lo utiliza-se a razão: ΔF/Fm' , onde ΔF é a fluorescência total da alga e Fm' a fluorescência máxima.

Para o cálculo da ETR, é usada a equação: ΔF/Fm' x PAR x coeficiente de absorção x 0,5, em que:

ΔF/ Fm' = RQE;

PAR = luz actínica (μmol fótons m^{-2} s^{-1}) = fluxo de fótons fotossinteticamente ativo (FFFA);

coeficiente de absorção = % de quanta absorvida pela planta; e

0,5 = fator que corrige a divisão de energia entre PSII e PSI.

Foi retirado 1 mL de cada frasco de cultivo ($1x10^3$ células) para a realização da análise fotossintética dos organismos. Este volume foi colocado em frasco do tipo *eppendorf* envolto por papel alumínio e então foi colocada a ponta do cabo de leitura do equipamento, de forma a deixar em torno de 1 mm de distância entre esta e a solução de cultivo.

3.2.1 Determinação da dose letal

Para determinação de dose de Cd letal às células, foram adicionadas quantidades crescentes do metal até o momento em que se identificou morte celular. A estimativa de viabilidade celular é difícil de identificar utilizando apenas a técnica de microscopia, uma vez que algumas células não se rompem e a estrutura se mantém intacta.

Devido às dificuldades de provar-se a morte celular de forma inequívoca, utilizou-se a taxa de fotossíntese das algas como parâmetro extra de identificação da viabilidade celular. Vale relembrar que a taxa de transporte de elétrons (ETR) é um parâmetro derivado do rendimento quântico efetivo (RQE), que mede a taxa de transporte de elétrons entre o PSII e PSI, dando uma indicação da fotossíntese global.

3.3 Quantificação de proteínas

A quantificação de proteínas foi feita através do método de Bradford (Bradford, 1976), no qual se mede a absorbância do complexo proteínas-reagente no comprimento de onda de 595 nm, após adicionar-se o reagente Coomassie Blue (Bio-Rad).

A absorbância foi medida no leitor de microplacas de 96 poços da marca Tecan, modelo Infinite 200 e a curva de calibração feita com BSA (albumina sérica bovina – Sigma Aldrich) de 1 a 10 µg/mL.

As amostras foram preparadas adicionando 50 µL da amostra a 350 µL de água e 100 µL do reagente de Bradford. Depois dos 10 minutos necessários para que a reação entre as proteínas e o reagente de Bradford aconteça, as soluções foram transferidas para microplacas de 96 poços e tiveram sua absorbância medida no comprimento de onda de 595 nm. O equipamento foi previamente calibrado com o branco.

3.4 Análise de Cd presente na água do mar

3.4.1 Preparo das amostras

A análise de espectrometria de emissão atômica com plasma acoplado indutivamente (ICP-AES - modelo Genesis, marca Spectro), foi realizada na Central Analítica, no Instituto de Química da Universidade de São Paulo.

Adicionou-se ácido nítrico nas amostras de água do mar (contendo células em concentração de 1 x 10^4 células/mililitro expostas à Cd) para solubilizar o cádmio, que deve estar em solução. Para a eliminação dos compostos orgânicos também

utiliza-se ácido nítrico e, quando este não é suficiente (quando mesmo após a adição, persiste matéria orgânica), adiciona-se ácido clorídrico concentrado.

Adiciona-se então água MilliQ para fazer a diluição da amostra, sendo então filtrada a solução e injetada no equipamento.

3.4.2 Método

A cinética de absorção de Cd por *L. polyedrum* foi acompanhado por absorção atômica. Adicionou-se a concentração final de 2,0 µg/mL de cádmio a uma cultura com 1,0 x 10^4 células por mililitro e foi verificada a quantidade do metal extracelular depois de 24 e 48 horas de exposição. A análise foi comparada com o meio de cultura sem alga (considerado o controle positivo) nas mesmas condições.

O método utilizado pela Central Analítica possui limite de detecção de 0,01 µg/mL e as concentrações utilizadas para a realização da curva de calibração foram de 1, 2, 5 e 10 µg/mL de Cd.

3.5 Análise de superóxido dismutase (SOD)

3.5.1 Obtenção dos extratos

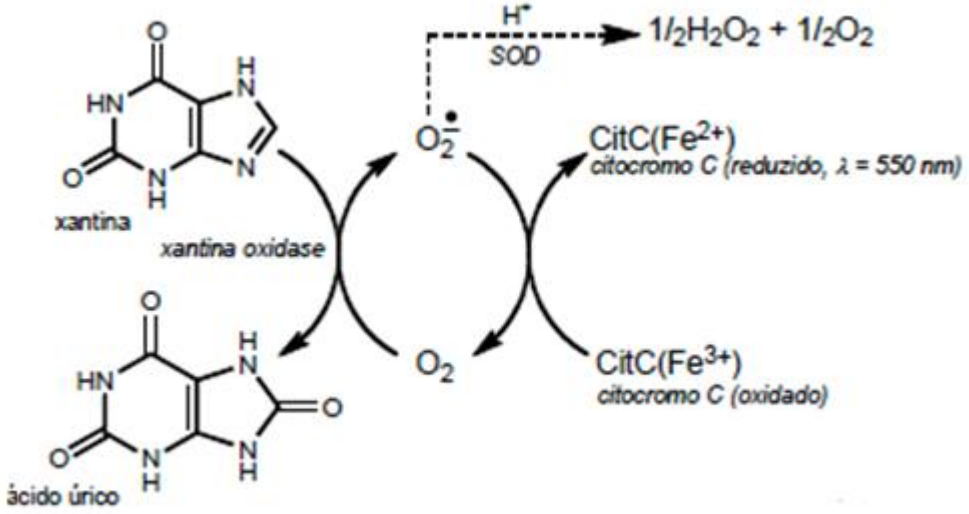
Quando a concentração de células do cultivo alcança 1 x 10^4, separa-se as células do meio de cultura por centrifugação (10.000 RPM por 10 minutos a 10°C – centrífuga Sorval modelo super T21). Descarta-se então o sobrenadante e as células são coletadas, liofilizadas e posteriormente armazenadas em freezer - 80°C.

Algas previamente liofilizadas (10 mg), são ressuspensas em 1 mL de tampão fosfato (fosfato de sódio 100 mM, pH 7,4 com 1 µM fenil-metano(sulfonil)fluoreto – PMSF - em etanol) gelado e então levadas ao sonicador para lisar as células.

O sonicador (Branson, modelo 102C) foi ajustado em amplitude de 70%, e as células foram submetidas aos pulsos de ultrassom por 5 minutos, em períodos de 15 segundos com intervalos de 15 segundos entre eles. Em seguida, os tubos foram centrifugados a 10.000 rpm durante 5 minutos sob 4°C. Estando os tubos sempre envoltos em gelo, os sobrenadantes obtidos dessa forma estavam prontos para os ensaios enzimáticos.

3.5.2 Método

O ensaio de SOD total foi baseado na inibição da taxa de redução do citocromo C, em que SOD compete com o citocromo C por $O_2^{\bullet -}$, gerado pelo sistema xantina/ xantina oxidase (Mccord & Fridovic, 1969), conforme exemplificado no esquema 4.



Esquema 4. Reação monitorada no ensaio de SOD. A enzima xantina oxidase transforma xantina em ácido úrico. Esta reação consome O_2, gerando $O_2^{\bullet}$ que pode ser dismutado pela SOD gerando H_2O_2 e O_2 ou reduzir o citocromo C, que é monitorado em 550 nm. O resultado do ensaio é baseado nessa competição entre SOD e citocromo C pelo $O_2^{\bullet -}$.

Adicionou-se 700 μL do meio reacional a 10 μL do extrato e completou-se o volume para 1 mL com tampão fosfato 50 mM, pH 7,8, contendo EDTA 0,1 mM. Mediu-se a absorbância em 550 nm, a 25°C, por 3 minutos.

A atividade de SOD foi determinada através da inclinação da reta controle ($A.min^{-1}$), que é a taxa de redução do citocromo C e das inclinações das retas que receberam alíquotas crescentes de extrato (k') que causaram a inibição da redução do citocromo C (conforme ilustra a figura 8).

A partir disso, calculou-se a inibição percentual através da relação %Inibição = ((k'/kmax) - 1) x 100. Determinou-se o volume de extrato equivalente a uma unidade de SOD através do gráfico (%Inibição *versus* volume das alíquotas de extrato). Finalmente, multiplicou-se pelo fator de diluição do volume determinado para o ensaio de 1mL.

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

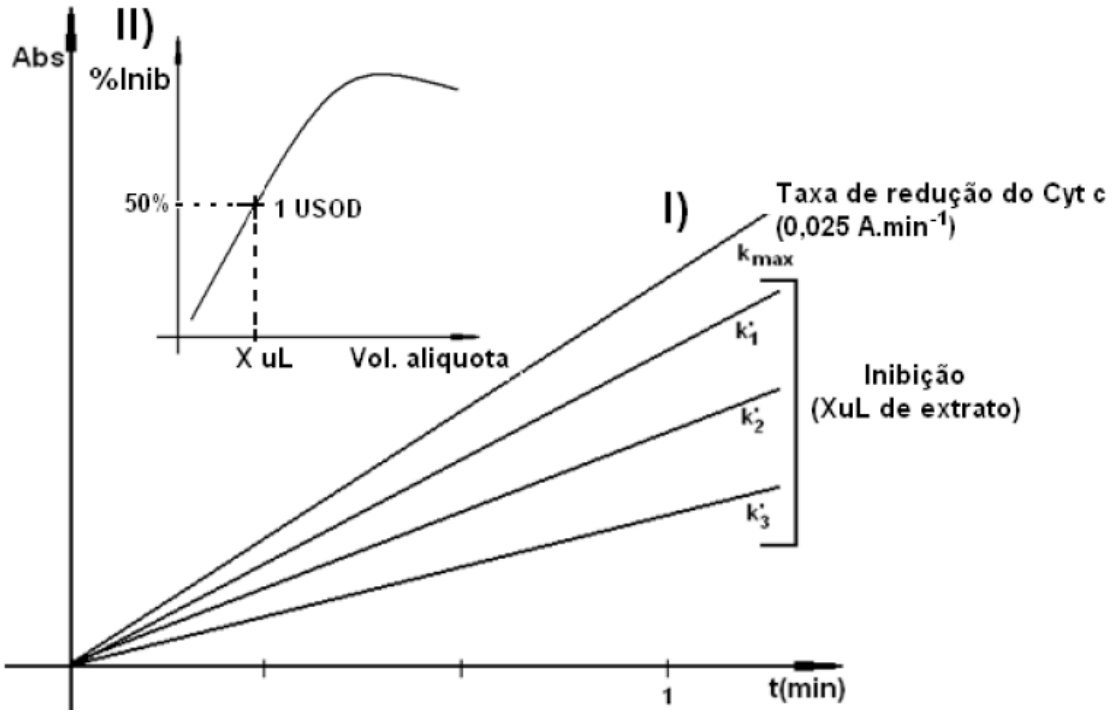


Figura 8. Calculo de SOD, retirado de Torres (2008). A inibição da taxa de redução do citocromo C pela SOD é calculado pela diminuição da inclinação da reta controle (correspondente à redução padrão de citocromo C, que na ausência de SOD deve estar em torno de 0,025 $A.min^{-1}$). Uma unidade de SOD é a quantidade de SOD capaz de inibir 50% da redução de citocromo C.

Com a adição do extrato ao sistema previamente descrito, ocorreu uma inibição da taxa de redução de citocromo C.

3.6 Análise de glutationa reduzida (GSH) e oxidada (GSSG)

3.6.1 Extração

Quando o cultivo de microalgas alcançou uma quantidade suficiente de células por mililitro (1,0 x 10^4), calculada através de microscopia e espectrofotometria, iniciou-se a extração. Centrifugou-se o meio (conforme item 3.5.1). Após a liofilização, pesou-se cerca de 10 mg de células liofilizadas. Adicionou-se 10 µL de solução de N-etilmaleimida (NEM) 1 mol/L e 990 µL de água com 0,1% de ácido fórmico e 5 mM de acetato de amônio. As células foram

rompidas por sonicação: amplitude de 50% por 5 minutos com tempo ligado/desligado de 3 segundos (sonicador digital 102C, Branson). Centrifugou-se a 10000 rpm a 5°C e resfriou-se em banho de gelo por 15 minutos. Após nova centrifugação a 10000 rpm a 5 ^{o}C, injetou-se o sobrenadante no LC-MS.

3.6.2 Método de análise por LC-MS

A separação cromatográfica foi realizada em uma coluna com fase estacionária C18 (Luna, 250 x 4,6 mm, 5 μm) da marca Phenomenex®.

A quantificação de GSH e GSSG foi realizada ao serem injetados padrões (Sigma Aldrich) contruindo a curva de calibração.

A fase móvel **A** utilizada foi água com 5 mM de acetato de amônio e 0,1% de ácido fórmico. A fase móvel **B** constituiu-se de metanol/água (65/35 v/v) contendo 5 mM de acetato de amônio e 0,1% de ácido fórmico. O fluxo usado foi de 0,9 mL/min, com gradiente de solventes conforme tabela 1:

Tempo (minutos)	Fase móvel A (%)	Fase móvel B (%)
0,0	100	0
0,5	100	0
2,0	0	100
5,0	0	100
5,1	100	0
12,0	100	0

Tabela 1. Gradiente de fase móvel do método de análise de Glutationa.

A análise por espectrometria de massas (espectrômetro de massas do tipo triplo quadrupolo híbrido íon trap linear, marca Applied Biosystems modelo 3200 QTrap) foi feita utilizando o método *Multiple Reaction Monitoring* (MRM) usando para glutationa reduzida as transições: 433,1/355,2 e 433,1/231,1, (GSH ligada a uma molécula de NEM) e para análise de glutationa oxidada utilizando as transições: 613,2/304,2 e 613,2/201,2.

Os parâmetros do espectrômetro de massas otimizados para a análise de GSH e GSSG encontram-se na tabela 2:

Q1	Q3	Dwell time (segundos)	DP (Volts)	EP (Volts)	CEP (Volts)	CE (Volts)	CXP (Volts)
433,1	304,2	0,08	50,0	10,0	22,3	35,0	4,0
433,1	201,2	0,08	50,0	10,0	22,3	35,0	4,0
613,2	355,2	0,08	50,0	10,0	27,3	35,0	4,0
613,2	231,1	0,08	50,0	10,0	27,3	35,0	4,0

Tabela 2. Parâmetros do espectrômetro de massas otimizados para análise de glutationa.

E os parâmetros da fonte de ioniização:

Parâmetros	Valores
Curtain gas	20
CAD gas	Medium
IonSpray voltage	5500
Temperature	650
Gas 1	50
Gas 2	30

Tabela 3. Parâmetros da fonte de ionização otimizados para análise de glutationa.

3.7 Análise de fitoquelatinas

3.7.1 Padrões

Devido à ausência de padrões comerciais de fitoquelatinas, foi feita uma colaboração de nosso laboratório com o laboratório da Prof. Dra. Maria Terêsa Machini Miranda do Departamento de Bioquímica (Instituto de Química da USP), para se realizar a síntese das fitoquelatinas de número 4 (PC4) $(Glu\text{-}Cys)_4$-Gly e de

número 3 (PC3) $(Glu\text{-}Cys)_3$-Gly, as quais foram utilizadas para o desenvolvimento do método analítico abaixo descrito.

3.7.2 Extração

As PC foram extraídas por sonicação conforme metodologia descrita no item 3.6.1.Antes de ser realizada a ruptura das células, assim como no método de análise de GSH, foi adicionado ao meio 1% de NEM, para estabilizar e impedir a oxidação dos grupos enxofre das PC.

3.7.3 Método de análise por LC-MS

A separação cromatográfica foi realizada em um coluna com fase estacionária C18 Phenomenex® (Luna, 150 x 2,0 mm, 3 μm). A fase móvel **A** foi água com 5 mM de acetato de amônio e 0,1 % de ácido fórmico, enquanto a fase móvel **B** foi metanol/água (65/35 v/v) contendo 5 mM de acetato de amônio e 0,1% de ácido fórmico. O fluxo usado foi de 0,170 mL/min., com gradiente de solventes conforme tabela 4:

Tempo (minutos)	Fase móvel A (%)	Fase móvel B (%)
0,0	100	0
0,5	100	0
2,0	0	100
5,0	0	100
5,5	100	0
20,0	100	0

Tabela 4. Gradiente de fase móvel do método de análise de PC.

Assim como o método de glutationa, a análise por espectrometria de massas foi feita utilizando o método MRM, sendo usado para a PC4 as transições: 1504,1 / 358,2 e 1504,1 / 267,0 (PC4 ligada a quatro moléculas de NEM). Para a PC3, foram usados 1147,1 / 358,2 e 1147,1 / 267,0 (PC3 ligada a três moléculas de NEM).

Os parâmetros do espectrômetro de massas otimizados para a análise de PC3 e PC4 encontram-se na tabela 5:

Q1	Q3	Dwell time (segundos)	DP (Volts)	EP (Volts)	CEP (Volts)	CE (Volts)	CXP (Volts)
1504,1	358,2	0,4	111,0	10,5	52,2	95,0	4,0
1504,1	267,0	0,4	111,0	10,5	52,2	113,0	4,0
1147,1	358,1	0,4	91,0	10,5	42,3	69,0	4,0
1147,1	267,2	0,4	91,0	10,5	42,3	87,0	4,0

Tabela 5. Parâmetros do espectrômetro de massas otimizados para análise de PC.

E os parâmetros da fonte de ionização:

Parâmetros	Valores
Curtain gas	18
CAD gas	Medium
IonSpray voltage	5500
Temperature	550
Gas 1	12
Gas 2	13

Tabela 6. Parâmetros da fonte de ionização otimizados para análise de PC.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Culturas

As culturas da microalga *L. polyedrum* foram mantidas em incubadoras com iluminação e temperaturas controladas.

A curva de crescimento foi monitorada durante 30 dias, sendo as medidas feitas sempre no mesmo horário, pela manhã (10 h), utilizando-se duas técnicas para estimá-la: (i) contagem por microscopia óptica – figura 9 e (ii) medida a absorbância em 680 nm (figura 10). A medida por espectrofotometria mostra-se muito útil para fazer uma leitura rápida e oferecer uma estimativa da concentração celular.

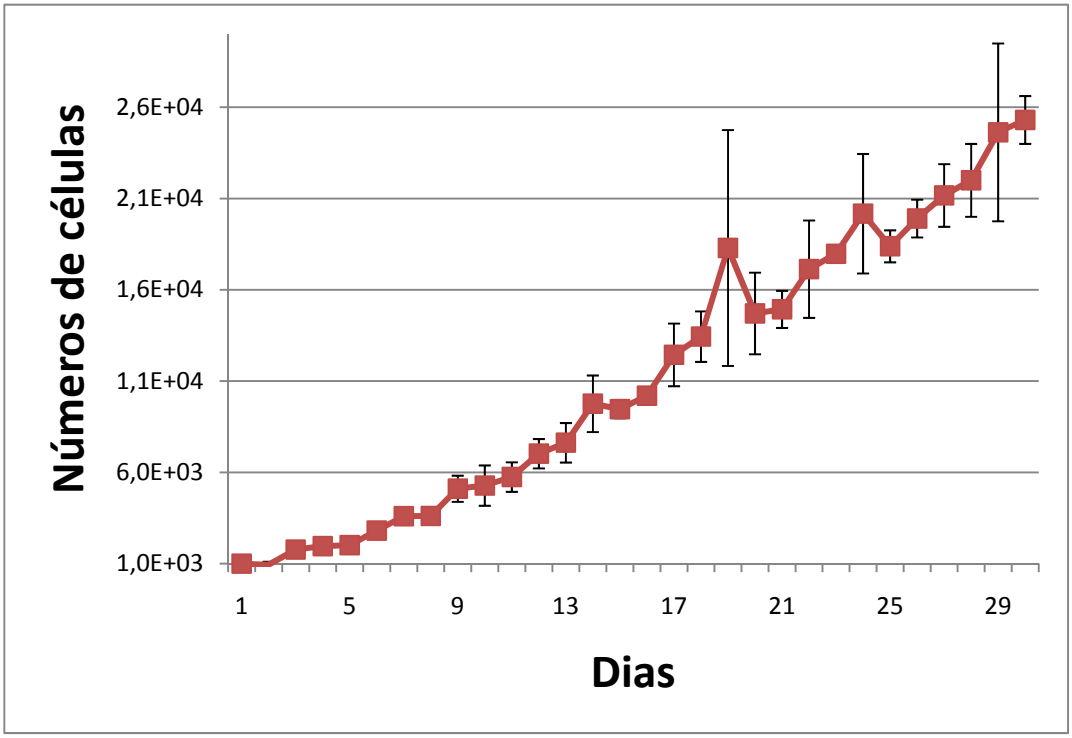


Figura 9. Curva de crescimento de *L. polyedrum* obtida por contagem em microscópio óptico durante 30 dias, realizada em triplicata. Os pontos representam as médias e a barra de erros o desvio padrão.

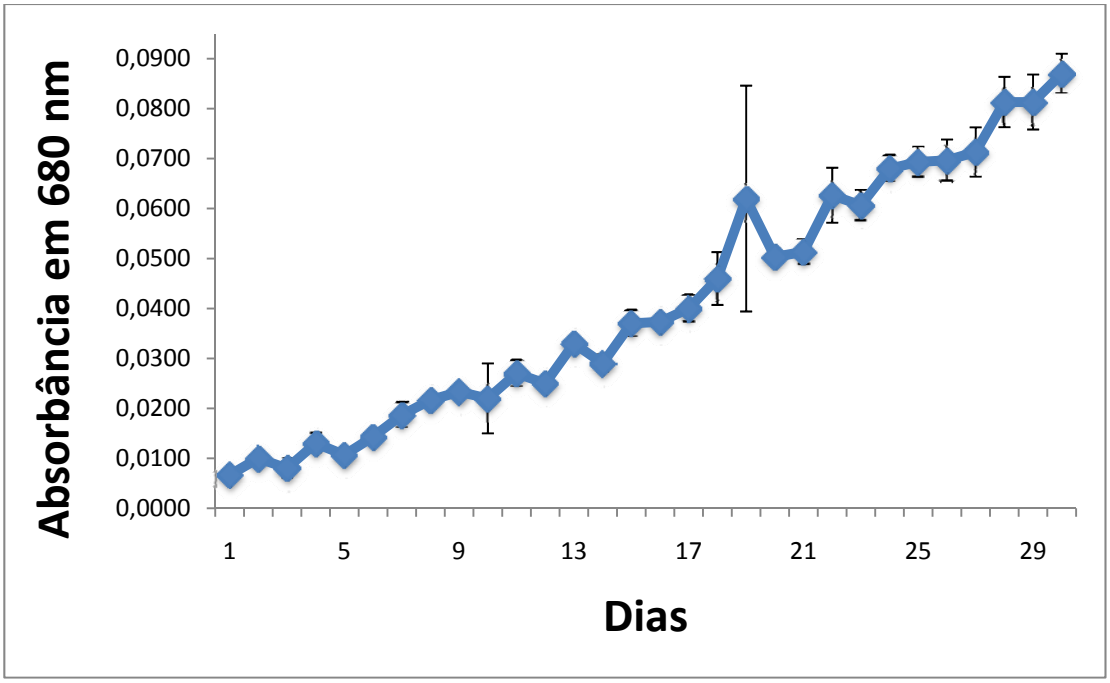


Figura 10. Medidas de absorbância de *L. polyedrum* em 680 nm para curva de crescimento, durante 30 dias, realizada em triplicata. Os pontos representam as médias e a barra de erros o desvio padrão.

Pode se notar que a curva de crescimento desta alga não apresenta as fases características de crescimento como fase exponencial, platô e decaimento. A fase de crescimento exponencial se manteve durante todos os 30 dias, período no qual não houve decaimento do número de células, indicando que os nutrientes presentes no meio foram adicionados em quantidade suficiente para suprir as necessidades celulares por 30 dias.

Com os dados de crescimento da alga, é possível calcular alguns parâmetros importantes de crescimento. Entre eles, destacam-se a taxa de crescimento (figura 11) e o tempo de duplicação (figura 12).

Taxa de crescimento é uma medida relativa de variação da densidade de células, com base na determinação do número de indivíduos, de um mesmo cultivo, em dois momentos distintos (Lourenço, 2006). Calcula-se da seguinte forma:

Taxa de cresc. =[ln (n° de céls do dia 5) – ln (n° de céls do dia 1)] / 5 (n° de dias).

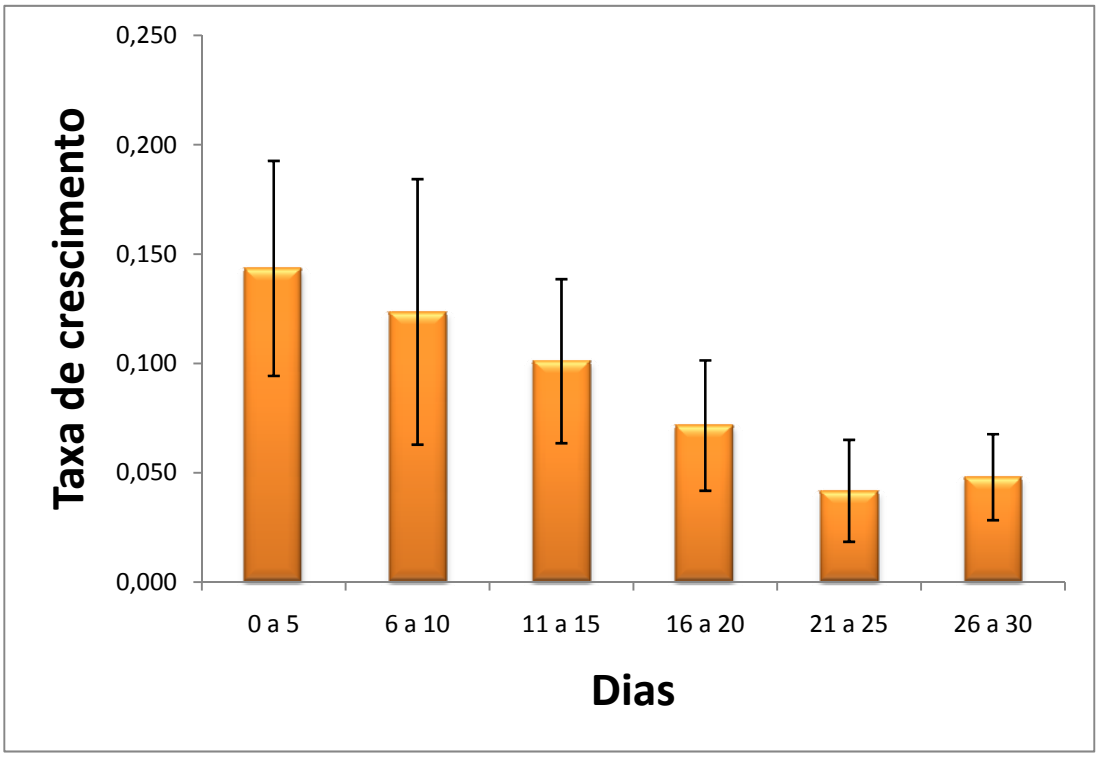


Figura 11. Taxa de crescimento das algas do cultivo ao longo dos dias, realizada em triplicata. Os valores apresentados são as médias e a barra de erros o desvio padrão.

Pode-se perceber que a taxa de crescimento é maior nos primeiros dias em relação aos seguintes.

Outro parâmetro importante é o tempo de duplicação que é a estimativa do tempo necessário para que a população duplique sua densidade celular (Lourenço, 2006).

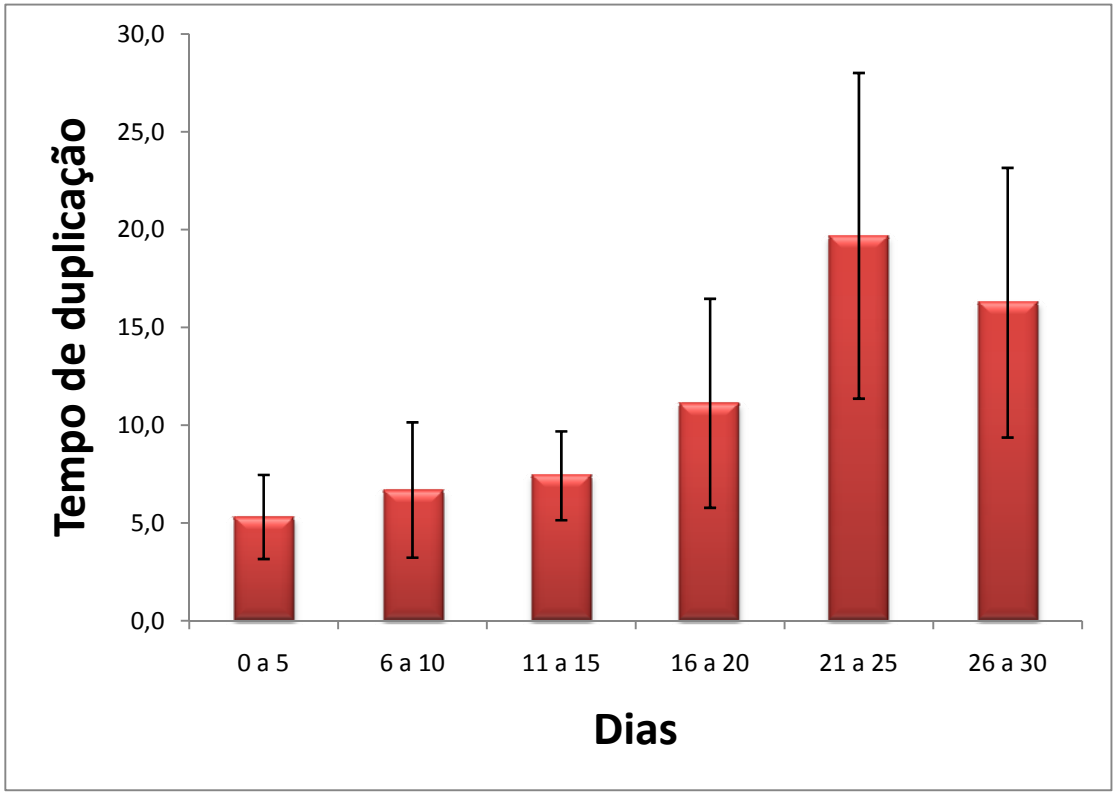


Figura 12. Tempo para que o número de algas do cultivo duplique, conhecido como tempo de duplicação. A análise foi realizada em triplicata. Os valores apresentados são as médias e a barra de erros é o desvio padrão.

Pela análise da figura 12, pode-se observar que o tempo de duplicação aumenta no decorrer da curva.

Esses dados mostram que, apesar do número de células ser sempre crescente durante os 30 dias medidos, esse crescimento vai decaindo com o passar dos dias, isso já era esperado, uma vez que o número de células aumenta (gerando competição entre elas) e os nutrientes vão sendo consumidos.

4.2 Análise do desempenho fotossintético de *L. polyedrum*

Os resultados de fotossíntese obtidos das algas expostas às diferentes concentrações de cádmio foram comparados com algas não expostas ao metal.

4.2.1 Dose letal

Mesmo quando houve adição de altas quantidades de Cd e foram evidenciadas alterações características de morte algal, como precipitação das células no fundo do frasco de cultivo, liberação de odores característicos de deterioração orgânica e ausência de movimento dos flagelos celulares, ao adicionar-se lugol, muitas células não apresentaram alterações perceptíveis em sua estrutura.

Num primeiro momento poder-se-ia inferir que as células não estivessem realmente mortas, mas sim em sua forma cística como forma de se proteger da condição ambiental não favorável. No entanto, mesmo separando essas células por filtração, lavando-as com água do mar para retirar o excesso de metal adsorvido nas paredes celulares e reinoculando-as em novo meio de cultura com todos os nutrientes e condições para seu desenvolvimento, não houve volta da atividade celular, evidenciado por ausência de movimentação dos flagelos e de atividade fotossintética.

Ao adicionar-se concentrações crescentes de cádmio até 2,0 µg/mL, não foi verificada morte celular nem diminuição da atividade de fotossíntese. Em concentrações superiores a 2,0 µg/mL de Cd observou-se precipitação das células, cheiro de degradação orgânica e queda na atividade fotossintética, evidenciando a morte celular, como pode-se observar na tabela 7:

	ETR		
	0 h	**24 h**	**48 h**
Sem exposição	49,2	50,5	51,3
2,0 µg/mL ou menos de Cd	47,2	47,8	48,5
3,0 µg/mL de Cd	48,0	↓ **22,0**	↓ **0,0**
4,0 µg/mL de Cd	50,0	↓ **7,2**	↓ **0,0**

Tabela 7. Valores de fotossíntese de *L. polyedrum* em amostras expostas e não expostas à Cd.

Baseando-se nesta tabela, podemos notar que 3,0 µg/mL do metal é capaz de matar cerca de 50% das células em 24 h de exposição (de 48 unidades de ETR, passamos para 22 unidades quando a alga é exposta a 3,0 µg/mL). Portanto a DL_{50} para 24 h de exposição é de aproximadamente 3,0 µg/mL de cádmio, o que pode ser confirmado por trabalhos anteriores (Okamoto *et al.*, 1999). Para exposição por 48 h, a mesma concentração de metal é capaz de matar praticamente 100% das células.

Quando da adição de 4,0 µg/mL de cádmio, foi observada a morte de praticamente todas as células em 24 e 48 h de exposição.

4.3 Quantificação de proteínas

O método de quantificação de proteínas usado abrange um intervalo de concentrações de 1 a 10 μg/mL (figura 13). A curva de calibração foi construída utilizando-se albumina sérica bovina e mostrou-se linear no intervalo utilizado.

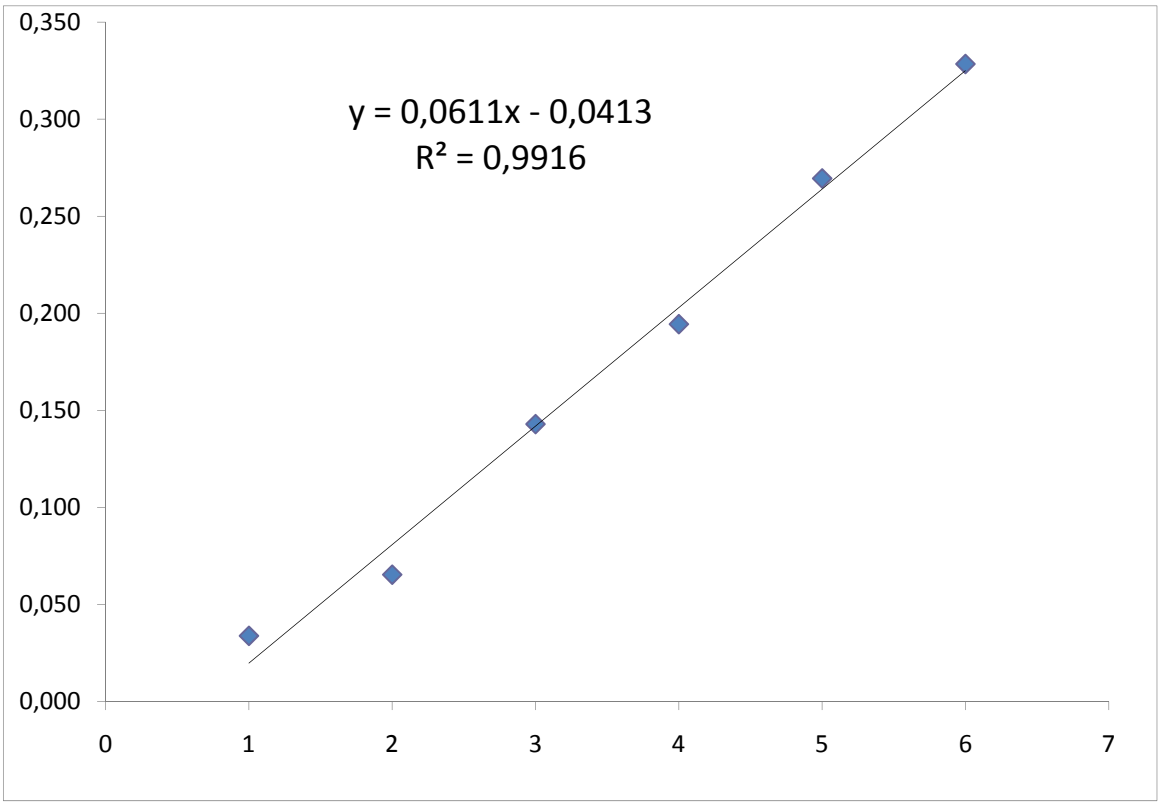


Figura 13. Curva de calibração de proteínas, a equação da reta e o valor de R^2.

A escolha do analisador de microplacas Tecan, ao invés de espectrofotômetro convencional, ocorreu por sua rapidez de leitura, utilização de pequenos volumes (de 50 a 250 μL) e robustez.

Quando substâncias provenientes de organismos vivos são analisadas, é muito importante que seja feita a normalização dos valores encontrados pela quantidade de proteínas presentes, uma vez que, ao pesar as amostras para serem analisadas, não é possível garantir que toda a massa pesada representa o organismo. Quando se trabalha com algas marinhas, a presença de cloreto de sódio

proveniente da água do mar pode atrapalhar a pesagem das amostras, adicionando massa do sal e dificultando a relação entre o resultado obtido e a massa pesada. Este problema é resolvido quando se relacionam os resultados obtidos com a quantidade de proteínas solúveis encontradas na amostra, uma vez que a quantidade de proteína é diretamente proporcional à quantidade do organismo presente na amostra.

4.4. Análise de Cd presente na água do mar

Neste experimento foi adicionado 2,0 µg/mL de cádmio a uma cultura com 1,0 x 10^4 células e verificada a quantidade do metal depois de 24 e 48 horas de exposição. A análise foi comparada com o meio de cultura sem alga (considerado o controle positivo) em que foi adicionado 2,0 µg/mL de Cd.

O resultado foi expresso em porcentagem de cádmio presente na situação controle e depois de 24 e 48 horas da exposição da alga ao metal (figura 14).

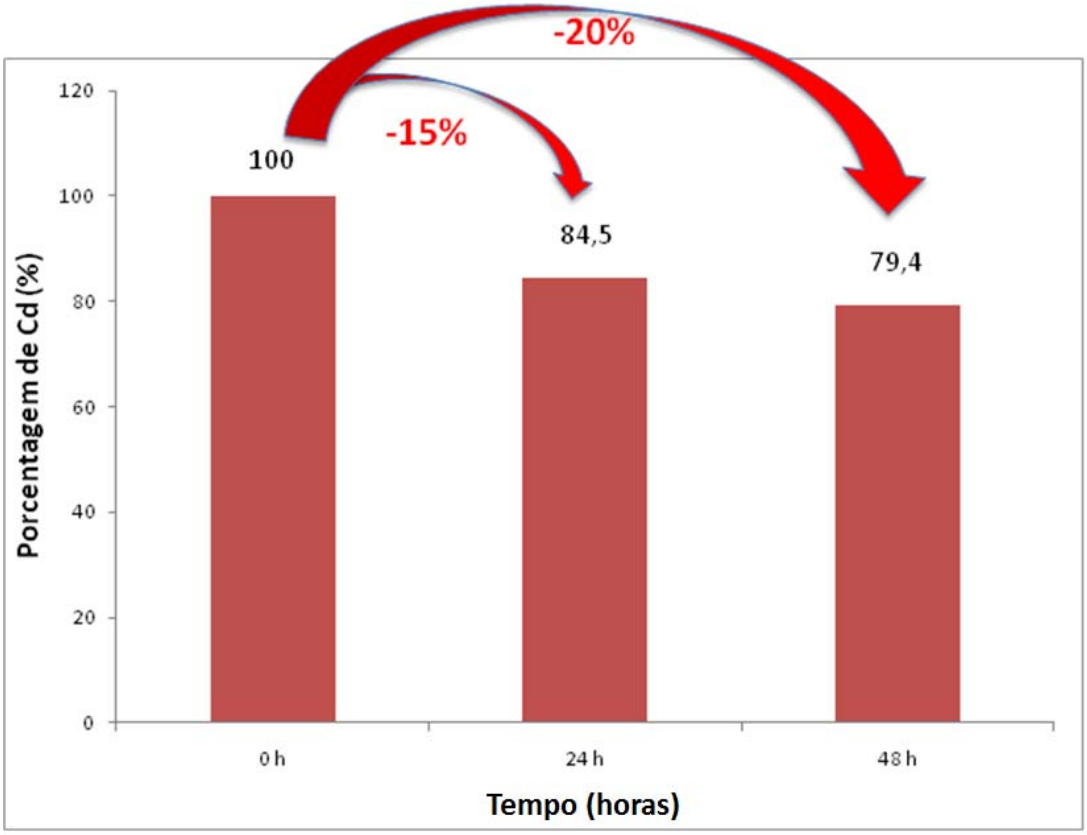


Figura 14. Quantidade de cádmio encontrado no meio, após adição deste metal em cultivos por 24 e 48 horas de exposição.

Nas condições estudadas, pode-se verificar que o cultivo de alga (com 1 x 10^4 células/mL) é capaz de retirar cerca de 20% do cádmio presente no meio marinho, depois de ser exposta por 48 h. Pode-se inferir que uma das formas de diminuir a quantidade livre de metal é resultado da quelação realizada pelas PC sintetizadas.

Em trabalhos científicos que relacionam espécies de algas com potencial de biorremediar cádmio (Matsunaga *et al.*, 1999; Henderson & Mitman, 2003), aquelas que têm potencial de biorremediar acima de 10% de cádmio em 2 semanas de exposição, são consideradas boas biorremediadoras. Não existem trabalhos científicos relacionando *L. polyedrum* com biorremediação de Cd, mas com os resultados aqui apresentados, percebe-se um grande potencial biorremediador desta espécie (retirando cerca de 20% de cádmio em 48 horas).

4.5 Análise de superóxido dismutase (SOD)

O resultado foi dado pela comparação entre amostras de algas não expostas a cádmio e amostras expostas a 0,5 µg/mL de cádmio por 24 e 48 horas (figura 15). Todas foram normalizadas pela quantidade de proteína presente.

- Amostra branco (ou 0 h) = 14 unidades de SOD/mg de proteína.
- Algas expostas a 2,0 µg/mL de Cd por 24 horas = 72 unidades de SOD/mg de proteína
- Algas expostas a 2,0 µg/mL de Cd por 48 horas = 66 unidades de SOD/mg de proteína

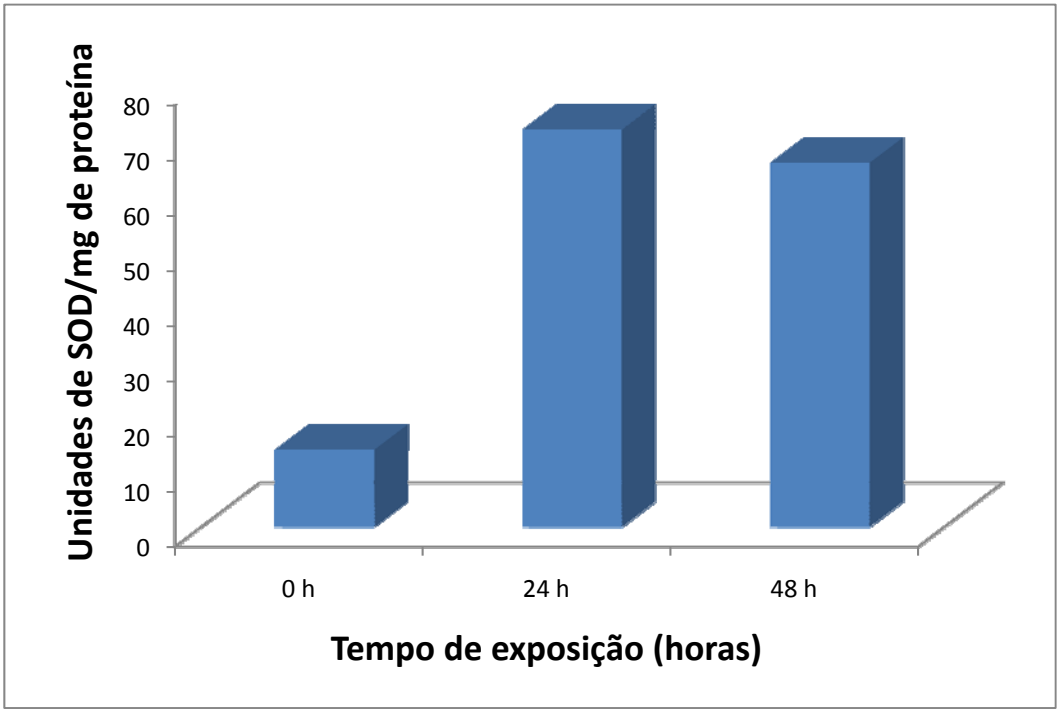


Figura 15. Atividade de SOD em amostras expostas a Cd 2,0 µg/mL. Amostras foram analisadas em triplicata e os dados mostram a média e o desvio padrão.

Nota-se o aumento na atividade de SOD em algas expostas a 2,0 µg/mL de Cd por 24 horas, indicando que o organismo aumenta a síntese desta enzima como forma de se proteger frente ao agente tóxico. No entanto, a atividade de SOD em algas expostas à mesma concentração de Cd por 48 horas, é ligeiramente menor do que naquelas expostas por 24 h, o que pode indicar uma adaptação da alga quando exposta por um período maior.

Aumento de atividade de SOD é esperado nestas condições em que as algas são expostas à Cd, uma vez que o aumento de ROS decorrentes do efeito de Cd intracelular é combatido dentre outras formas, com enzimas antioxidantes, dentre as quais a SOD é primeira (Leitão *et al.*, 2003; Pokora *et al.*, 2003).

4.4 Desenvolvimento de métodos em LC-MS/MS

Ao iniciar-se o desenvolvimento de métodos por LC-MS é necessária a infusão do padrão da substância (em concentração em torno de 5,0 µg/mL) diretamente no espectrômetro de massas para otimização de parâmetros específicos para cada analito, os quais são aplicados nas posições ilustradas na figura 16.

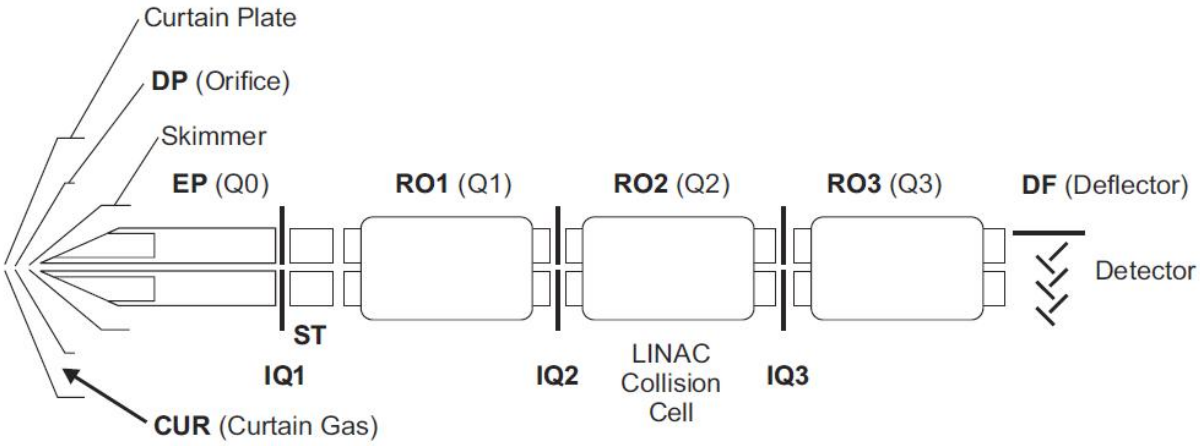


Figura 16. Localização dos parâmetros a serem otimizados no espectrômetro de massas.

Estes parâmetros são:

Declustering Potential **(DP)**: é a diferença de potencial entre uma superfície (skimmer) e o "orifice plate". É usado para minimizar os clusters de íons de solvente que podem acompanhar a amostra. Porém, com altas energias, pode levar à fragmentação das moléculas.

Entrance Potential **(EP)**: controla a diferença de potencial entre a voltagem no quadrupolo zero e o skimmer. É uma energia que guia e focaliza os íons para dentro da região de alto vácuo do Quadrupolo Q0.

***Collision Cell Entrance Potential* (CEP)**: controla o potencial aplicado na entrada da cela de colisão, focalizando os íons para dentro do segundo quadrupolo.

***Collision Energy* (CE)**: controla a diferença de potencial entre os quadrupolos Q0 e Q2. É usado apenas em experimentos em que há fragmentação das moléculas. É a quantidade de energia que o íon precursor recebe quando é acelerado para dentro da cela de colisão, onde colide com moléculas de gás (nitrogênio) e fragmenta-se.

***Collision Cell Exit Potential* (CXP)**: potencial aplicado na saída da cela de colisão para focalizar os íons provenientes da cela de colisão para dentro do terceiro quadrupolo.

***CAD Gas* (CAD)**: parâmetro que controla a pressão de gás na cela de colisão durante experimentos de Q3 e MS/MS. Para varreduras em Q3, o gás de colisão ajuda a focalizar os íons quando estes passam pela cela de colisão. Em experimentos MS/MS, o gás funciona como um alvo para fragmentar o íon precursor.

Depois de concluída esta etapa, inicia-se então o desenvolvimento do método cromatográfico. Este deve ser capaz de separar as substâncias de interesse entre si e estas da matriz das amostras. A separação, quando se utiliza HPLC com detecção por espectrometria de massas, não é tão fundamental quanto em outros tipos de detectores, porém é interessante que haja uma separação (mesmo que mínima) entre as substâncias para que estas, ao chegarem ao equipamento, não compitam entre si pela ionização, pelo mesmo motivo, é interessante que haja separação dos analitos de interesse dos constituintes da matriz.

Depois de selecionada a coluna cromatográfica e a fase móvel, passa-se então à otimização dos parâmetros da fonte de ionização electronspray. Estes parâmetros só podem ser otimizados depois de desenvolvido o método cromatográfico, pois são dependentes do fluxo do HPLC e do solvente utilizado como fase móvel. Os parâmetros são:

***IonSpray Voltage* (IS)**: voltagem aplicada na ponta do capilar de onde vem a fase móvel do HPLC, ionizando a amostra na fonte de colisão. Depende da polaridade usada e afeta a estabilidade do spray e a sensibilidade.

***Gas 1* (GS1)**: conhecido como gás nebulizador, controla o fluxo de gás nitrogênio aplicado paralelamente ao capilar de onde vem a fase móvel do HPLC, auxiliando na geração de pequenas gotículas, afetando a estabilidade do spray e a sensibilidade.

***Gas 2* (GS2)**: conhecido como gás auxiliar ou turbo gás, controla o fluxo de gás nitrogênio que sai de câmaras aquecidas (conhecidas como "turbo heaters") em direção ao spray de fase móvel, auxiliando a evaporação do solvente e evitando que o solvente entre no equipamento.

***Temperature* (TEM)**: Controla a temperatura do gás auxiliar na fonte TurboIonSpray®, auxiliando a evaporação do solvente para gerar a amostra ionizada na fase gasosa.

***Curtain Gas* (CUR)**: Controla o fluxo de gás (nitrogênio) na interface do "Curtain Gas". A interface do "Curtain Gas" é localizada entre a "curtain plate" e o

orifício de entrada. Ele previne que gotículas do solvente entrem e contaminem as lentes internas.

4.5 Análise de glutationa reduzida (GSH) e glutationa oxidada (GSSG)

Ao iniciar a análise de GSH, verificou-se que o grupo enxofre da molécula se oxida rapidamente em solução (conforme ilustra a figura 17 - depois de 48h em solução, a concentração de GSH cai pela metade), gerando sua forma oxidada. Na literatura encontram-se artigos que sugerem a utilização de compostos que estabilizam o enxofre da GSH. Os principais são iodoacetamida (Dixon *et al.*, 2005; Ryan *et al.*, 2007; Ying *et al.*, 2007) e NEM (Kot & Bicz, 2008; Mojica *et al.*, 2008; Miller *et al.*, 2009).

Foi escolhido o NEM como agente derivatizante, por ter uma reação rápida de complexação com o enxofre (5 minutos) e por necessitar de relativamente pouca quantidade (1% de uma solução 1 Mol/L) para provocar a reação.

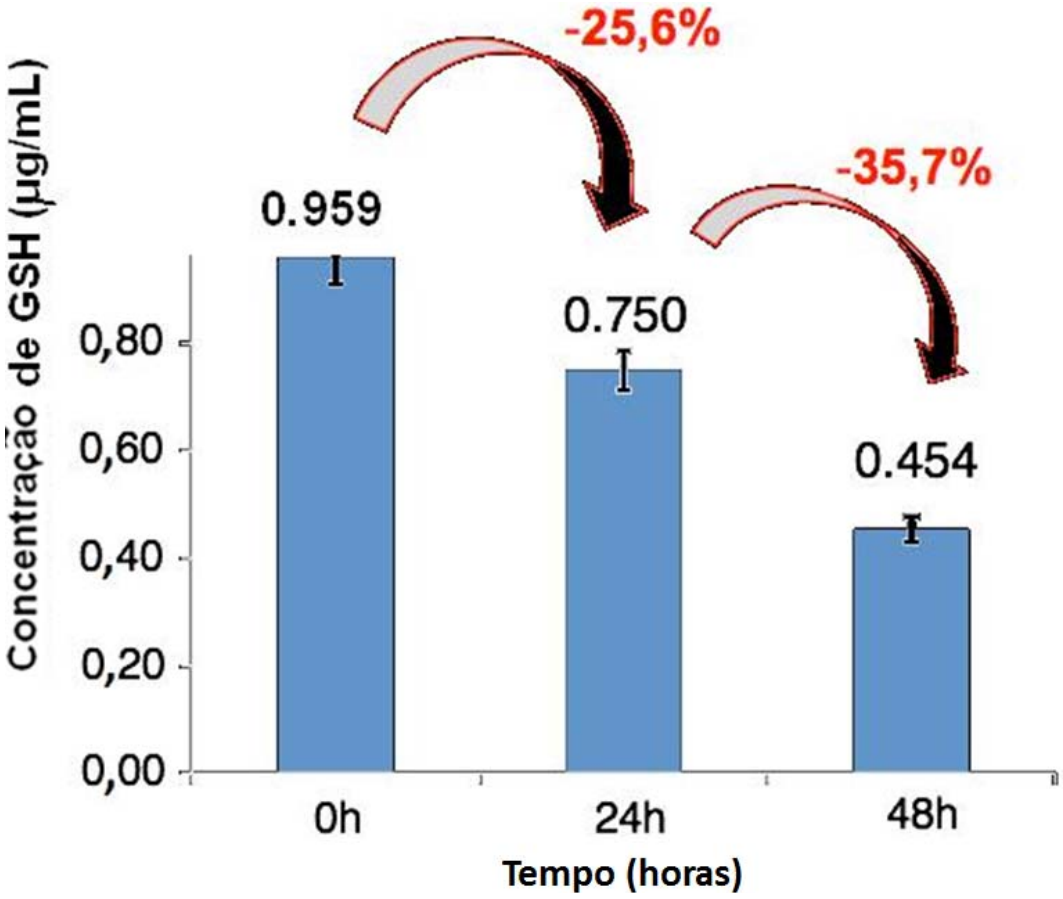


Figura 17. Decaimento da concentração de padrão de GSH com o grupo enxofre desprotegido. Análise realizada em triplicata e os valores são as médias e desvios padrão.

A escolha do NEM como derivatizante foi motivada também pela estabilidade do complexo formado com a GSH, que se mostrou estável por até 48 horas (como mostra a figura 18). A concentração de NEM adicionada às amostras foi de 10 mM, pois esta concentração mostrou-se capaz de ligar-se à praticamente todos os enxofres da glutationa.

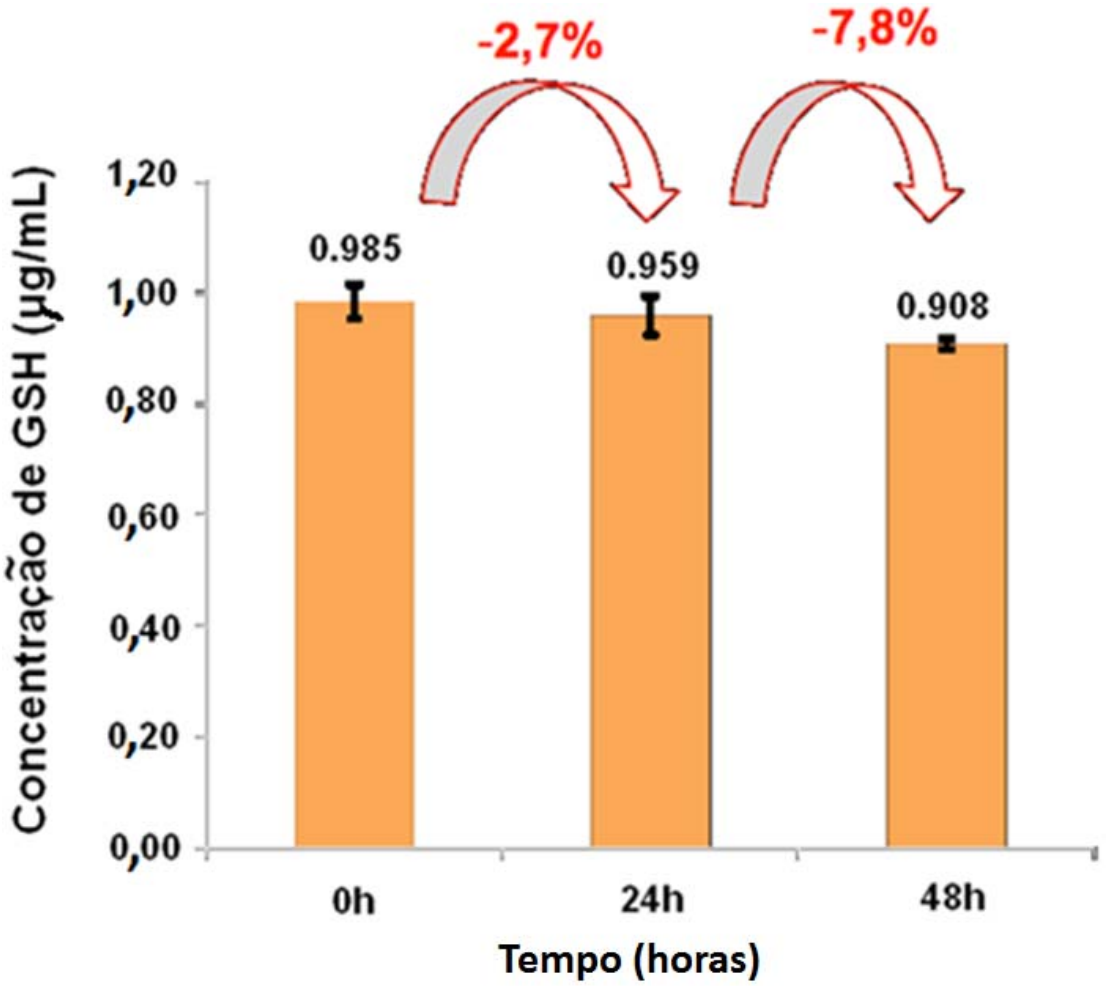


Figura 18. Decaimento da concentração de padrão de GSH com o grupo enxofre protegido com NEM. Analise realizada em triplicata. Os valores apresentados são as médias com seus desvios padrão.

O método cromatográfico desenvolvido foi capaz de separar a GSH e a GSSG (figura 19) e mostrou-se reprodutível mesmo após longas listas de injeção.

Além disso, a curva de calibração mostrou-se linear dentro do intervalo de concentração estudado para GSH (0,05 μg/mL a 5 μg/mL, figura 20) e GSSG (0,05 μg/mL a 5 μg/mL, figura 21).

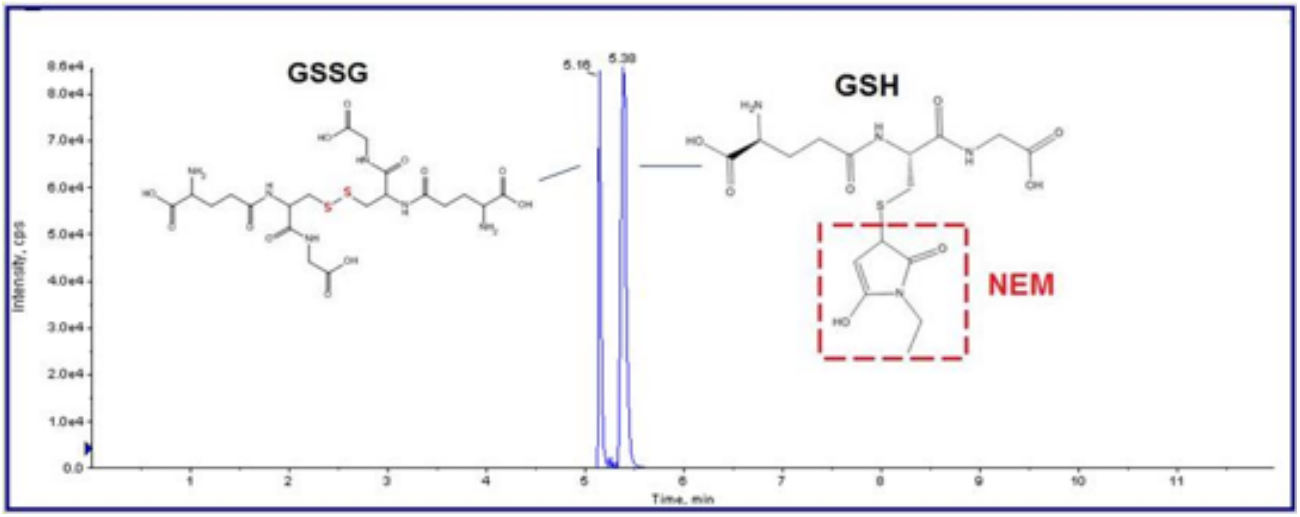


Figura 19. Cromatograma gerado ao ser injetado padrão de GSH e GSSG, no método desenvolvido.

No presente método utilizaram-se duas transições de massas de cada composto para se aumentar ainda mais a especificidade. O íon de GSH (protonado e ligado ao NEM) gerou os fragmentos de m/z 355,2 e 231,1, enquanto o íon de GSSG (protonado) gerou os fragmentos de m/z 304,2 e 201,2.

Os resultados de quantificação das amostras foram obtidos através de curvas de calibração ao serem injetados os padrões de GSH e GSSG, conforme mostram as figuras 20 e 21, respectivamente.

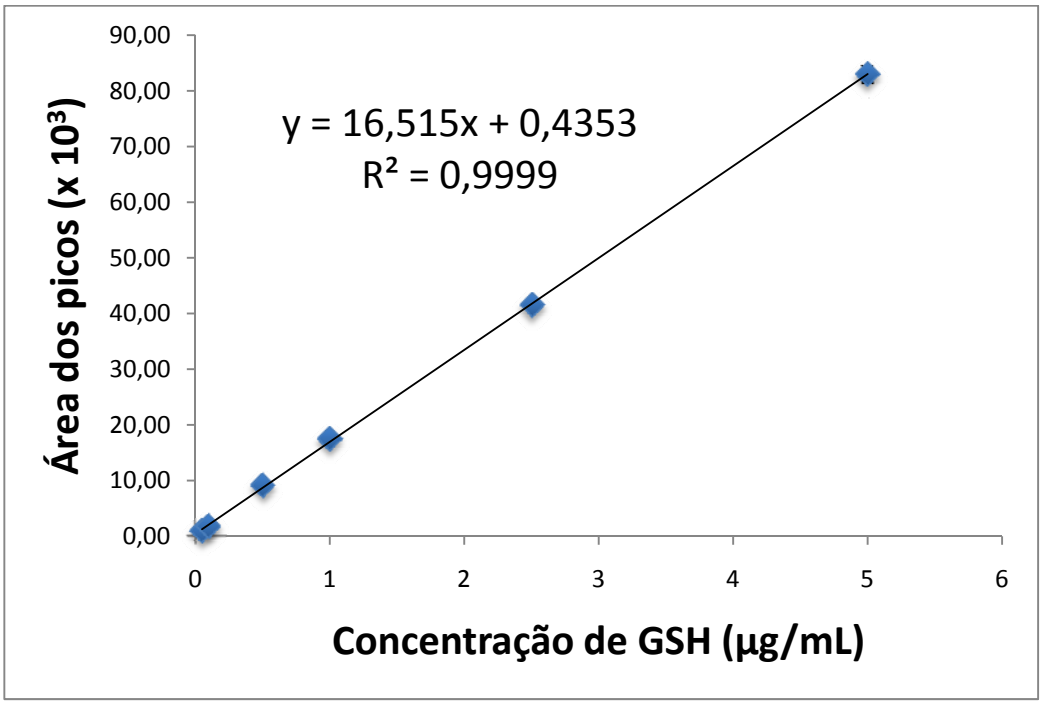


Figura 20. Curva de calibração de GSH, analisada em triplicata. Os valores são as médias com os desvios padrão.

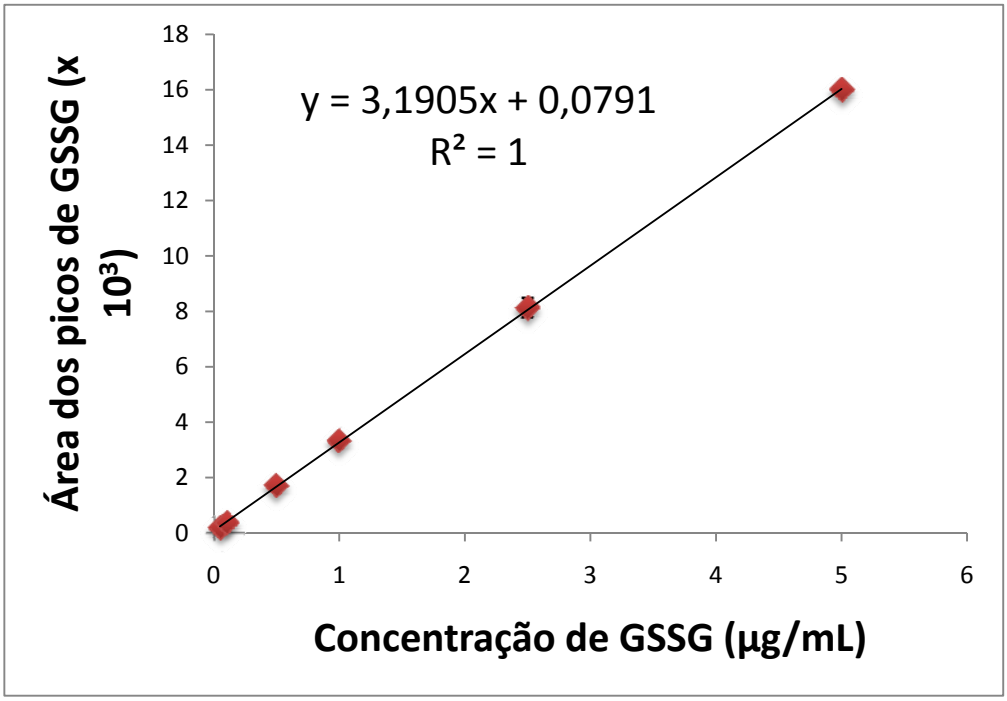


Figura 21. Curva de calibração de GSSG, analisada em triplicata. Os valores são as médias com os desvios padrão

4.4.1 Análise de GSH e GSSG em amostras expostas cádmio

Foi obtido um resultado muito interessante ao serem analisadas algas expostas a 2,0 µg/mL de cádmio por 24 e 48 horas. Houve um decaimento considerável da quantidade de GSH quando a alga foi exposta ao metal, como pode ser visualizado na figura 22. Este resultado está de acordo com trabalhos anteriormente publicados em que também é verificado queda na concentração de GSH quando organismos são expostos à cádmio (Singhal *et al.*, 1987; Vogelilange & Wagner, 1996).

A queda de GSH se dá nestes casos principalmente por três motivos: (i) complexação de GSH com Cd, fomando o complexo GS-Cd (ii) oxidação de GSH, gerando GSSG e (iii) GSH sendo consumido para a síntese de PC.

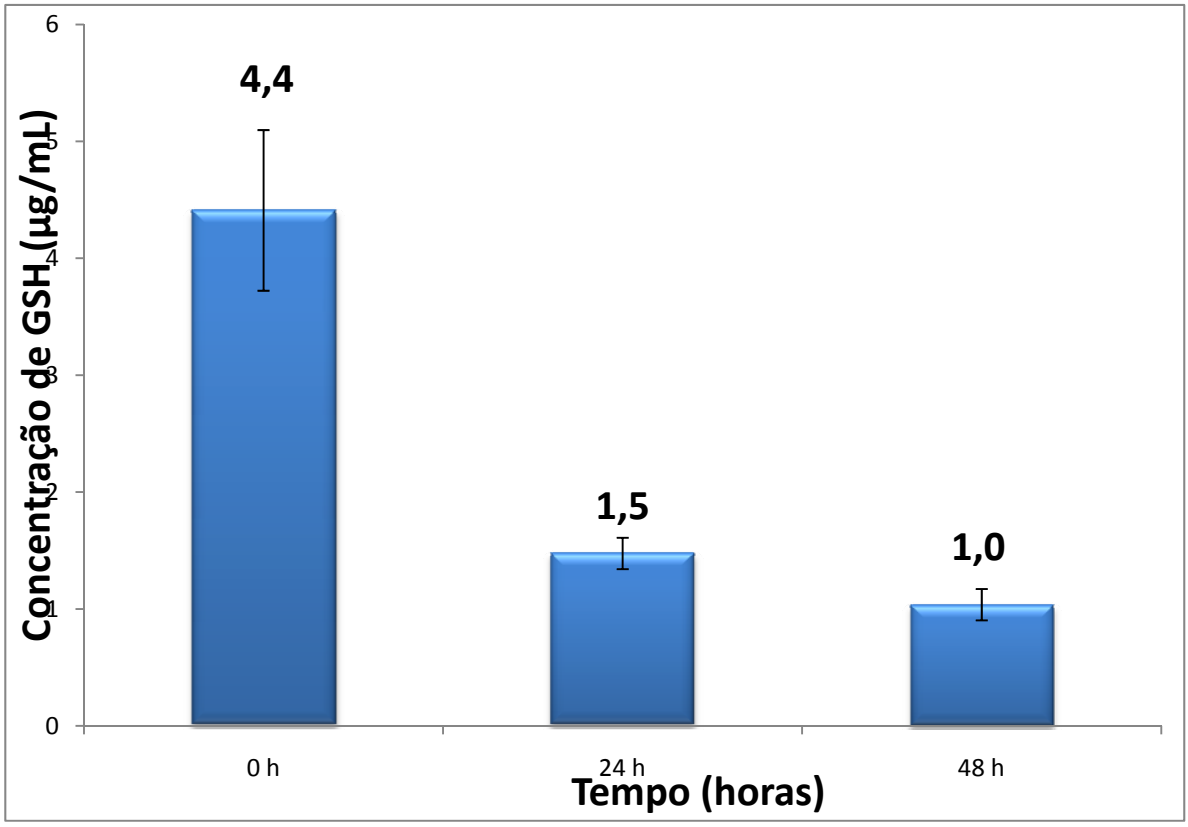


Figura 22. Concentração de GSH em amostras não expostas e expostas a 2,0 µg/mL de cádmio, analisadas em triplicata. Os valores são as médias com os desvios padrão.

Porém ao analisarmos os resultados de GSSG (figura 23), podemos notar que ao invés de aumento de GSSG, há diminuição. Indicando que o consumo de GSH não é para formar GSSG, porém ambos podem estar sendo consumidas para formar as PC como forma de defesa do organismo frente ao metal tóxico.

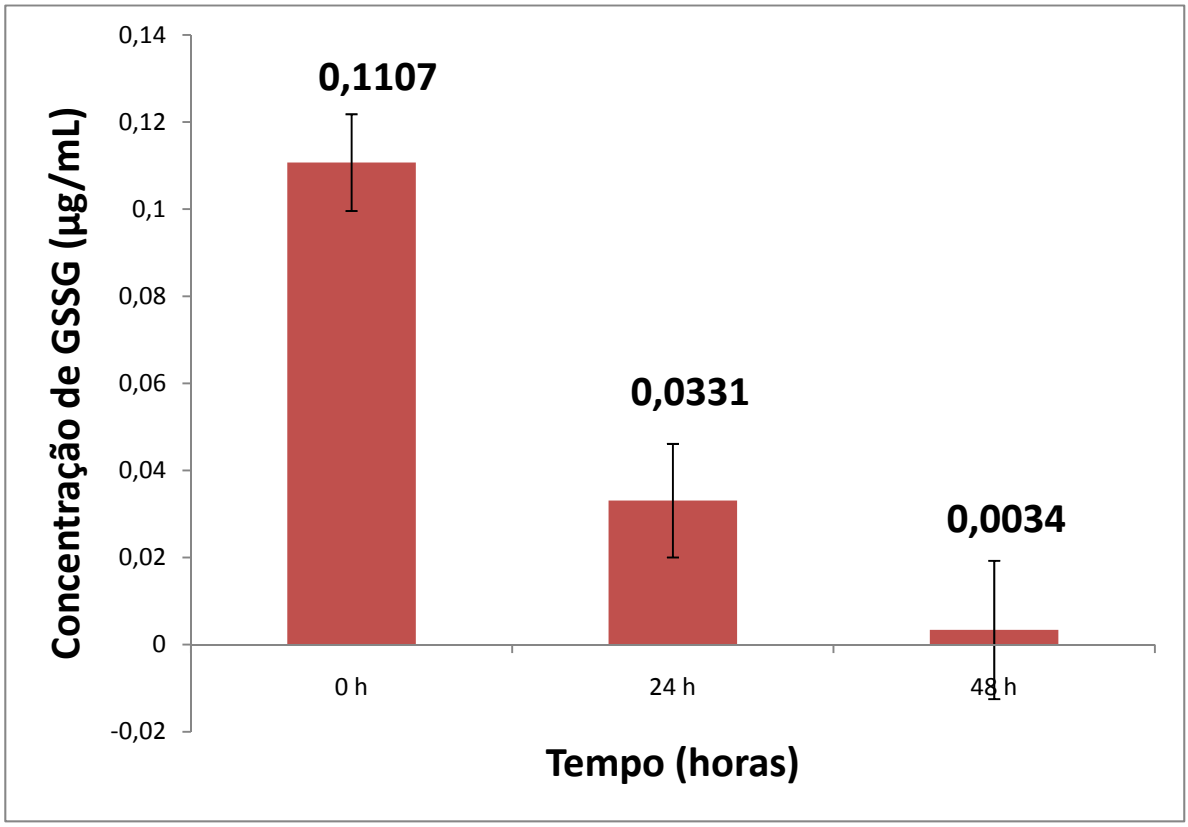


Figura 23. Concentração de GSSG em amostras não expostas e expostas a Cd 2,0 µg/mL, analisadas em triplicata. Os valores são as médias com os desvios padrão.

A estequiometria de formação de GSSG a partir de GSH é 2:1 e, portanto a glutationa total da célula (GSH_{total}) pode ser considerada como [GSH] + 2.[GSSG]. Essa relação fornece o índice redox (IR), ou seja, a %GSH na forma de GSSG frente ao total de glutationa. Correlacionam-se então, os efeitos dos tratamentos com o IR. As variações de IR frente aos ensaios toxicológicos foram avaliadas pela relação:

$IR = 100x\ (2GSSG/GSH_{total})$

Esta razão costuma ser baixa para organismos não expostos a estresse oxidativo e alta para organismos expostos. No entanto, ao se fazer o IR nas amostras de algas expostas a 2,0 µg/mL de Cd, verifica-se uma diminuição neste parâmetro, como pode ser observado na figura 24.

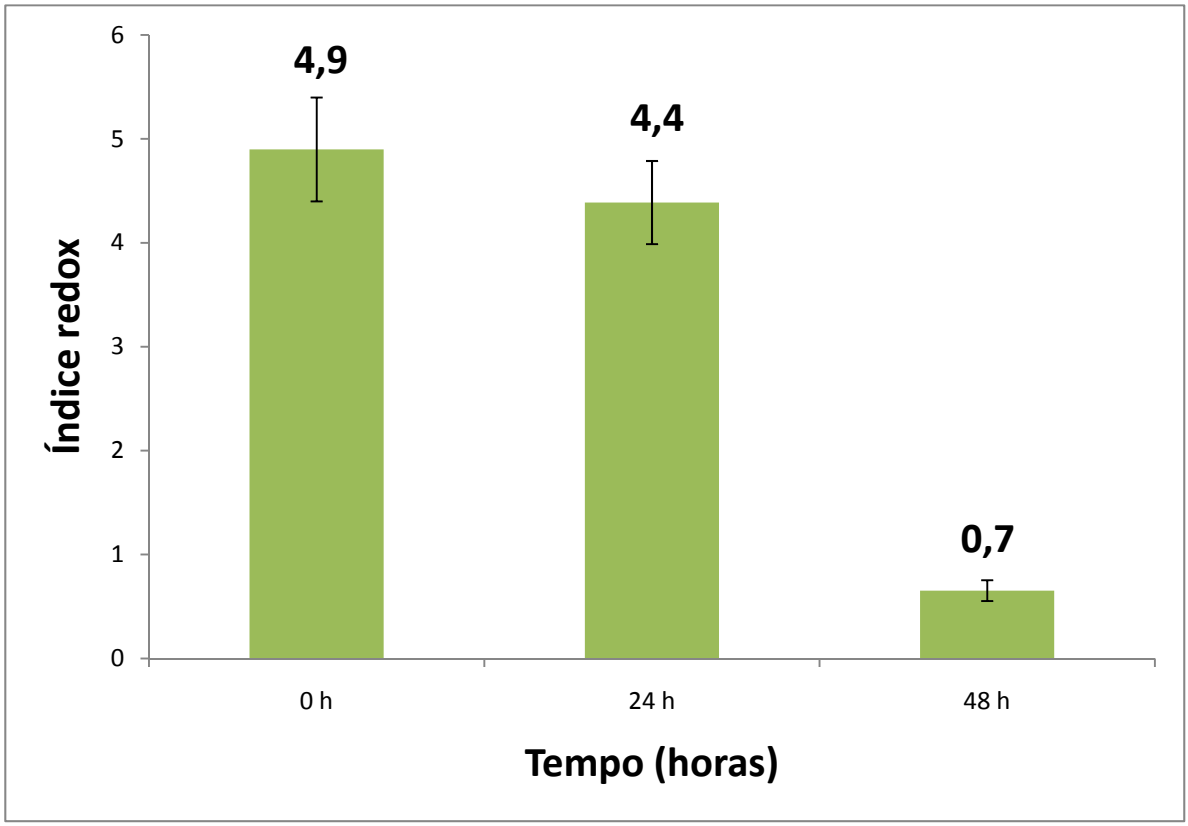


Figura 24. Razão entre GSH e GSSG em amostras expostas a Cd 2,0 µg/mL, analisada em triplicata. Os valores são as médias com os desvios padrão.

Os valores de IR dos controles (em torno de 4,9) são valores esperados, uma vez que a quantidade de GSSG em relação à GSH encontrada em organismo não expostos à estresse oxidativo é de menos de 10% (Pompella *et al.*, 2003). No entanto, a diminuição do IR em amostras expostas por 48 h pode ser devido a um

consumo maior de GSSG do que GSH pelo organismo, provavelmente indicando o consumo da molécula de GSSG para síntese de PC.

4.5. Análise de fitoquelatinas

A primeira análise realizada ao serem recebidas as PC de número 3 e 4 provenientes de síntese química, foi a infusão das soluções dos mesmos no espectrômetro de massas utilizando a função chamada *Enhanced Resolution*, em que é possível detectar a massa da substância com resolução suficiente para diferenciar os seus isótopos, como demonstrado na figura 25:

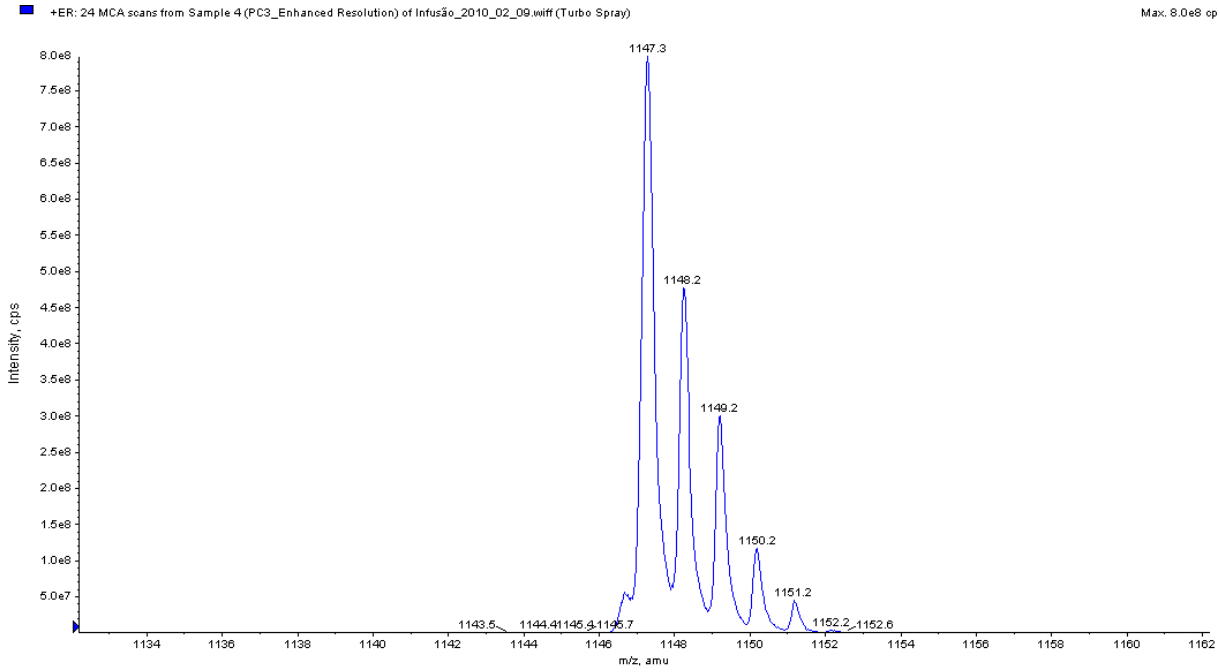


Figura 25. PC3 infundida diretamente no espectrômetro de massas no modo *enhanced resolution*.

Uma vez que as fitoquelatinas foram obtidas por processo de síntese química, é necessário se certificar que o composto obtido é realmente o que se espera. Isso é possível ser feito utilizando este modo *enhanced resolution*.

O método cromatográfico desenvolvido foi capaz de separar a PC3 da PC4 como demonstra o cromatograma da figura 26.

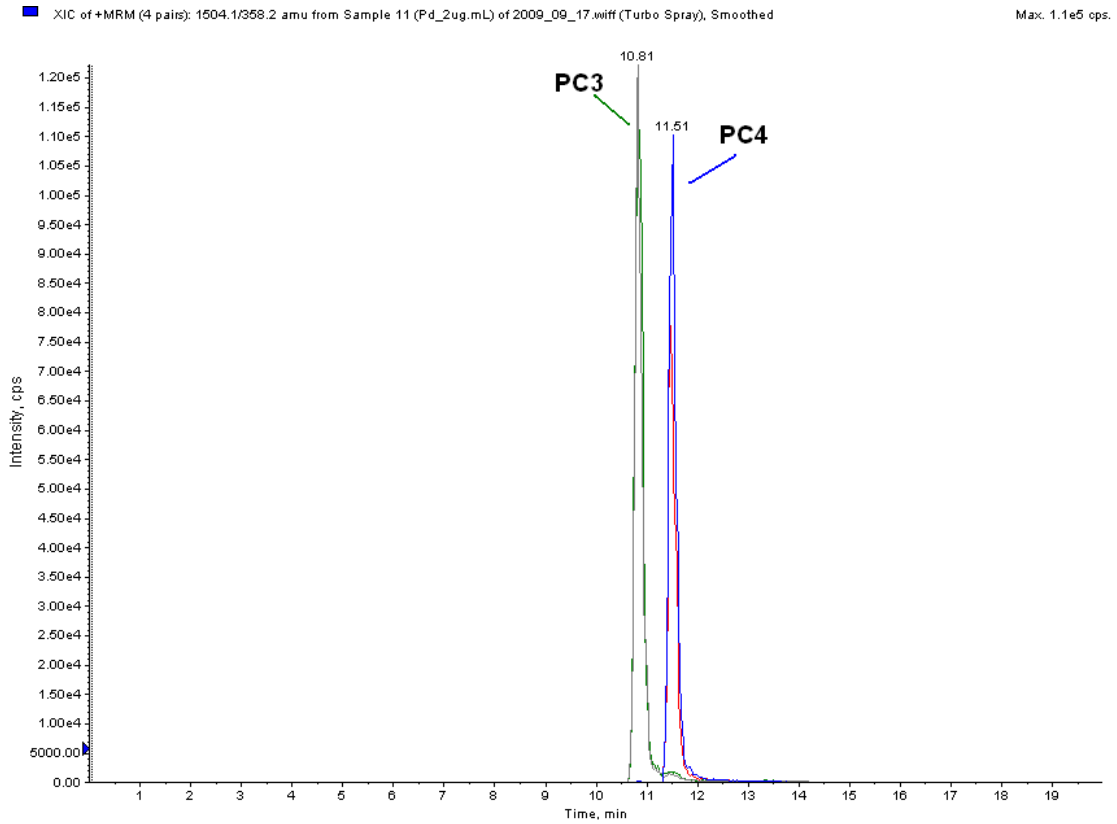


Figura 26. Cromatograma gerado ao serem injetados os padrões de PC3 e PC4 no método desenvolvido por LC-MS/MS. As cores indicam 2 transições diferentes para cada substância. As cores cinza e verde são as transições de PC3 e as cores azuis e vermelhas as transições de PC4

No método foram utilizados dois fragmentos de cada composto para aumentar ainda mais a especificidade. O íon de PC4 (protonado e tendo ligado seus 4 átomos de enxofre a 4 moléculas de NEM) gera os fragmentos de m/z 358,2 e 267,2, enquanto que o íon de PC3 (protonado e ligado a 3 moléculas de NEM) gera os fragmentos 358,2 e 267,2, conforme ilustra a tabela 8:

Molécula precursora	Transição 1	Transição 2
PC3	1147,5->358,1	1147,5->267,2
PC4	1504,3->358,2	1504,3->267,2

Tabela 8. Transições de PC utilizadas no método de análise por LC-MS.

4.5.1. Estabilidade

Assim como a GSH, as PC possuem em sua estrutura molecular um átomo de enxofre facilmente oxidável, o que se torna um problema para analisar a substância em organismos vivos, pois assim que as células são lisadas, o seu conteúdo intracelular começa a sofrer oxidação.

Na literatura não foram encontrados artigos científicos em que são feitos testes de estabilidade da PC em diferentes solventes e faixas de pH. Fato este curioso, uma vez que se não for tomada a precaução de manter a PC em solventes e pH abaixo de 7, para que a presença de prótons em solução auxilie a PC a não perder seus prótons ligados ao enxofre, a substância sofre oxidação muito facilmente, fazendo com que os valores encontrados da análise possam ser errôneos.

Por esta razão, foram realizados testes de estabilidade da PC4 em três condições diferentes: água com de ácido fórmico 0,1% (figura 27), água com ácido trifluoroacético (TFA) 0,1% (figura 28), água com ácido fórmico 0,1% e NEM 1% (figura 29). Para estas análises é importante que a amostra esteja em água, pois esta é nossa condição inicial de análise no cromatógrafo líquido.

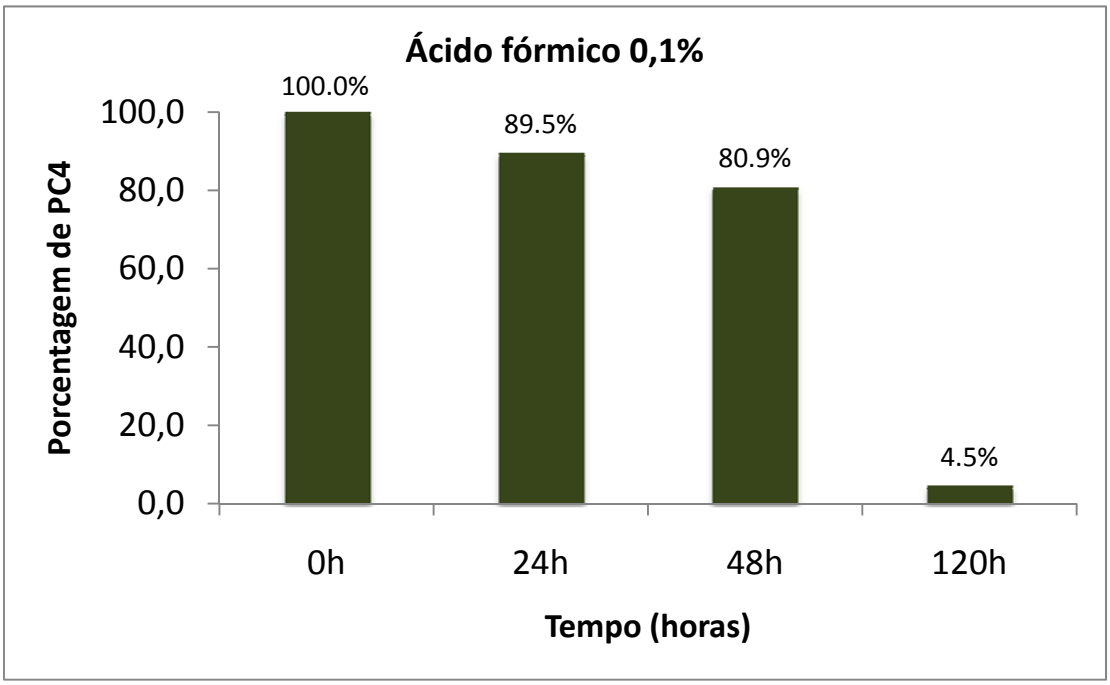


Figura 27. Degradação da PC4 ao longo do tempo em solução ácido fórmico 0,1%.

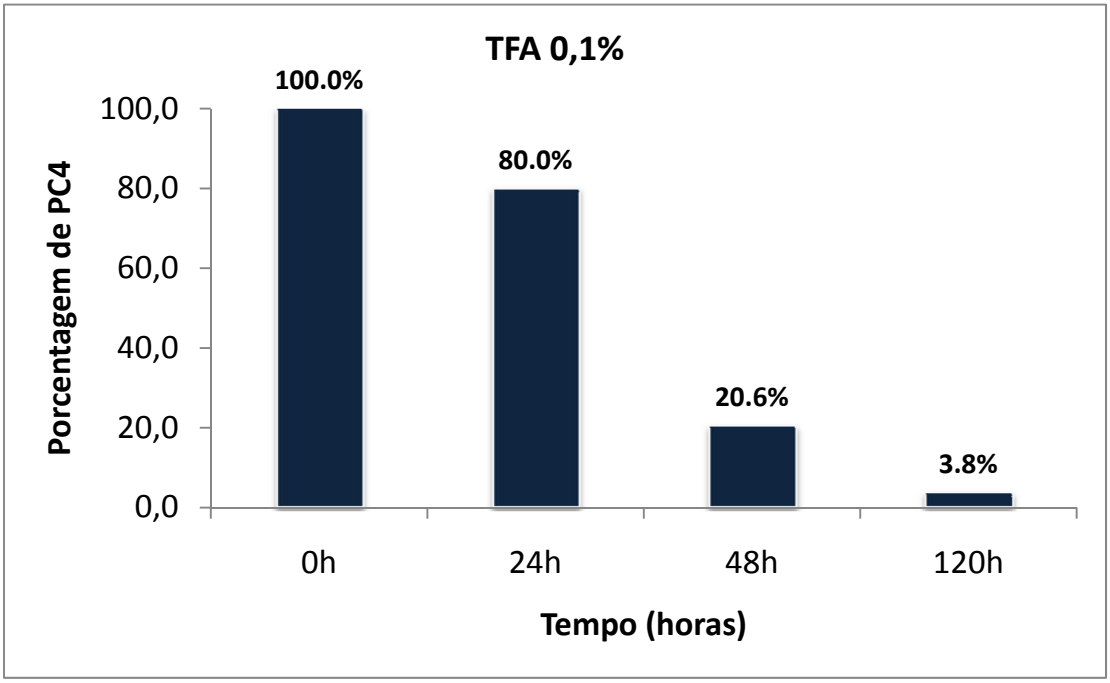


Figura 28. Degradação de PC4 ao longo do tempo em solução de ácido trifluoro acético 0,1 %.

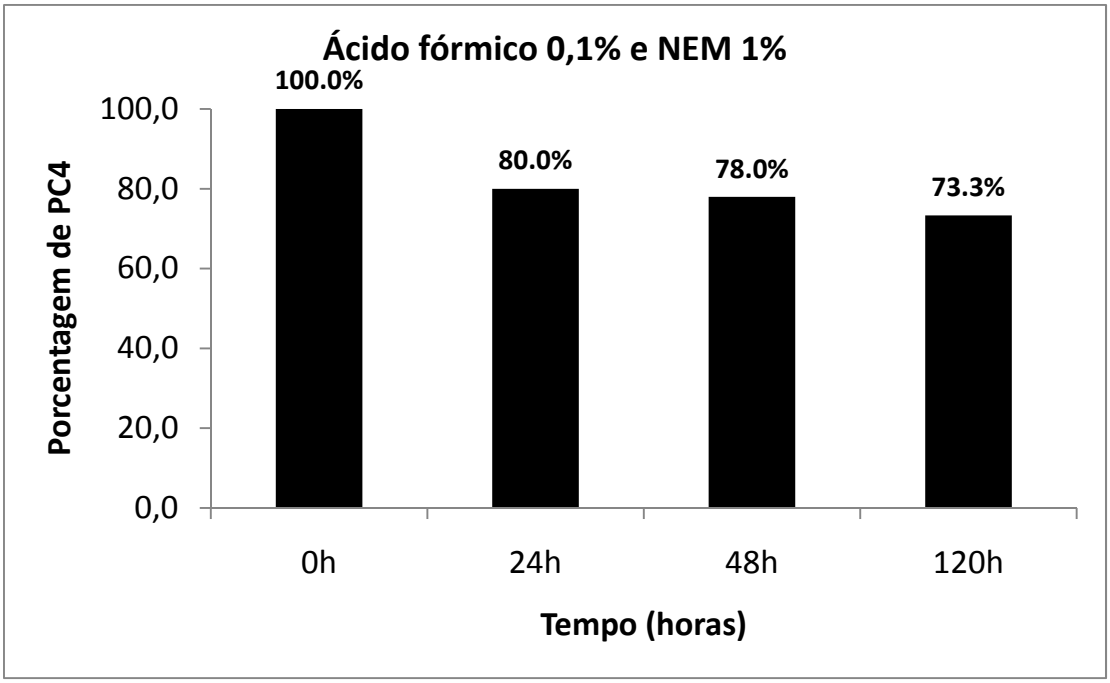


Figura 29. Degradação de PC4 ao longo do tempo em solução NEM 1%.

O teste realizado evidencia que a PC é facilmente oxidável e necessita ter seus átomos de enxofre estabilizados de forma a não sofrer degradação ao longo do tempo. A forma encontrada de alcançar esta condição foi derivatizando-se com NEM, que, assim como ocorre com a molécula de GSH, se liga na porção instável (o átomo de enxofre), establizando-a.

4.5.2. Fragmentação de PC3 e PC4

No espectro de fragmentação das PC3 e PC4 foi possível relacionar os picos encontrados com os fragmentos da molécula precursora, conforme mostram as figuras 30 e 31.

A fragmentação acontece prioritariamente nas ligações peptídicas dos aminoácidos, por serem as posições mais lábeis da molécula. Quando há fragmentação nesta porção da molécula, geram-se os íon **b** e **y**. Os íons **y** são os fragmentos que retêm a carga residual (próton) no lado N-terminal e os íons **b,** são aqueles que retêm a carga residual (próton) na região C-terminal

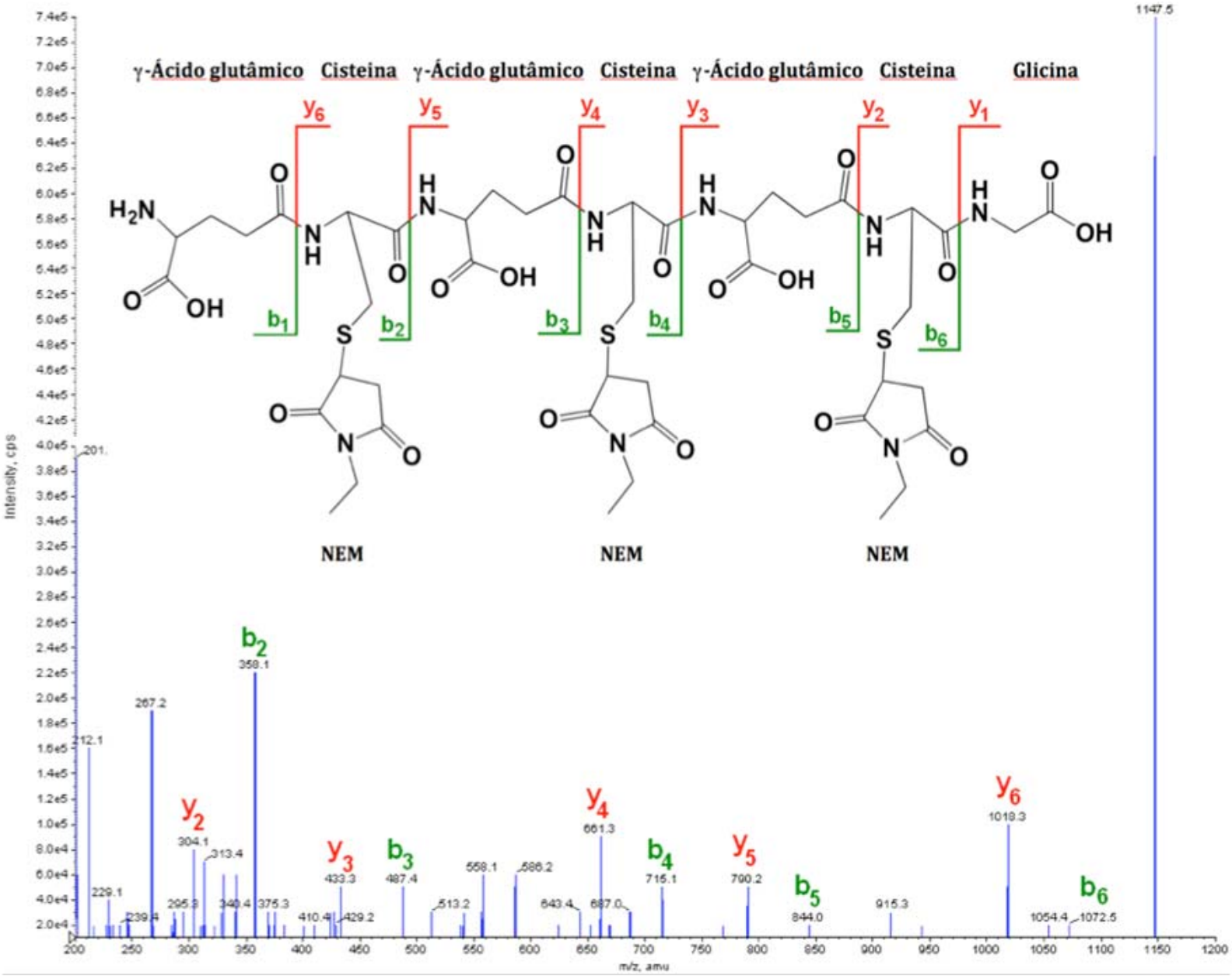


Figura 30. Fragmentação da PC3. Ao ser fragmentada a PC3 no espectrômetro de massas, verificamos a presença de seus fragmentos **y** (aqueles que retêm a carga residual ou próton na região C-terminal) e **b** (fragmentos com carga residual ou próton no lado N-terminal) característicos.

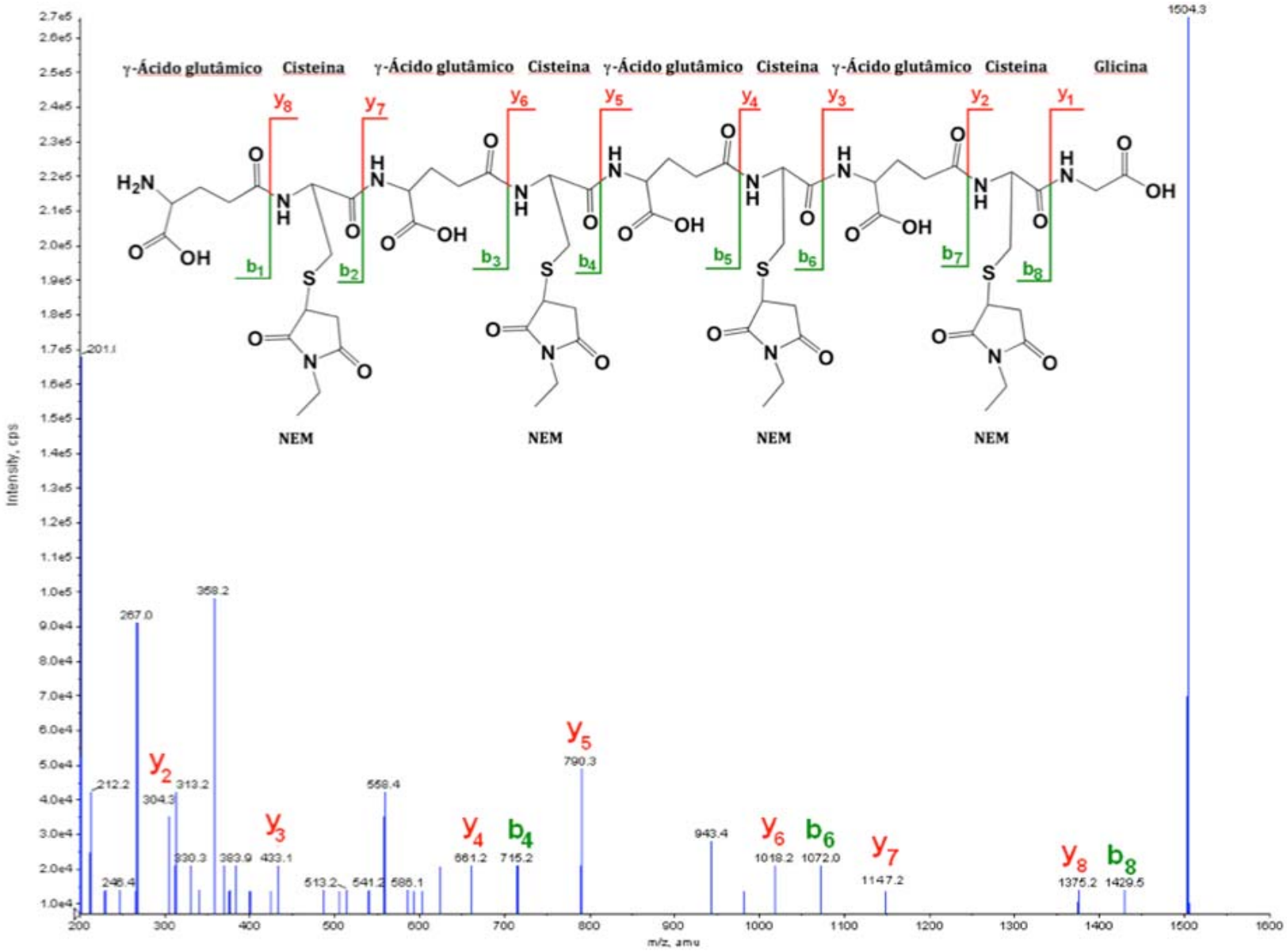


Figura 31. Fragmentação da PC4. Ao ser fragmentada a PC4 no espectrômetro de massas, verificamos a presença de seus fragmentos **y** (aqueles que retêm a carga residual ou próton na região C-terminal) e **b** (fragmentos com carga residual ou próton no lado N-terminal) característicos.

O modelo da mobilidade do próton (Dongre *et al.*, 1996) descreve como a energia interna adquirida induz a transferência intramolecular dos prótons em cada peptídeo, culminando na desestabilização das ligações do esqueleto polipeptídico e, por conseqüência, induzindo a formação de dois íon-fragmentos (Mann *et al.*, 1989). Esses íons são classificados em dois grupos: íons que retêm a carga residual (próton) no lado N-terminal (gerando fragmentos **-a**, **-b** e **-c**, dependendo da ligação que é fragmentada) e íons que retêm a carga residual (próton) na região C-terminal (gerando os fragmentos **-x**, **-y** **-z**, dependendo da ligação que é fragmentada) (Cantúi *et al.*, 2008).

É importante enfatizar que os pares de íons a/x, b/y e c/z serão sempre íons correspondentes aos fragmentos opostos e complementares entre si. Considerando-se que as ligações peptídicas são aquelas menos energéticas, espera-se que a formação do par de fragmentos **-b/-y** seja mais freqüente que os demais pares de fragmentos, facilitando muito a interpretação dos espectros (Cantúi *et al.*, 2008).

Como resultado da fragmentação das ligações peptídicas, uma série de íons **-b** e **-y** complementares é obtida, de modo que a diferença de valores de m/z entre dois íons consecutivos do mesmo tipo pode revelar a identidade do resíduo de aminoácido em questão. Enquanto as séries **-b** e **-y** resultam diretamente da clivagem das ligações peptídicas, os íons **-a** são formados pela perda neutra de monóxido de carbono dos íons **-b** (diferença de 27.9949 u relativo ao íon **-b** correspondente)(Dongre *et al.*, 1996; Tabb *et al.*, 2003).

4.5.3. Quantificação de PC3 e PC4 em amostras expostas a Cd

A quantificação foi possível graças à etapa de purificação dos peptídeos, em que se obtém as PC isoladas e com concentração determinada.. Foram feitas diluições seriadas das soluções estoque de PC3 e PC4 derivatizadas com NEM e injetadas no LC-MS.A quantificação foi feita utilizando curvas de calibração como pode-se verificar nas figuras 32 e 33.

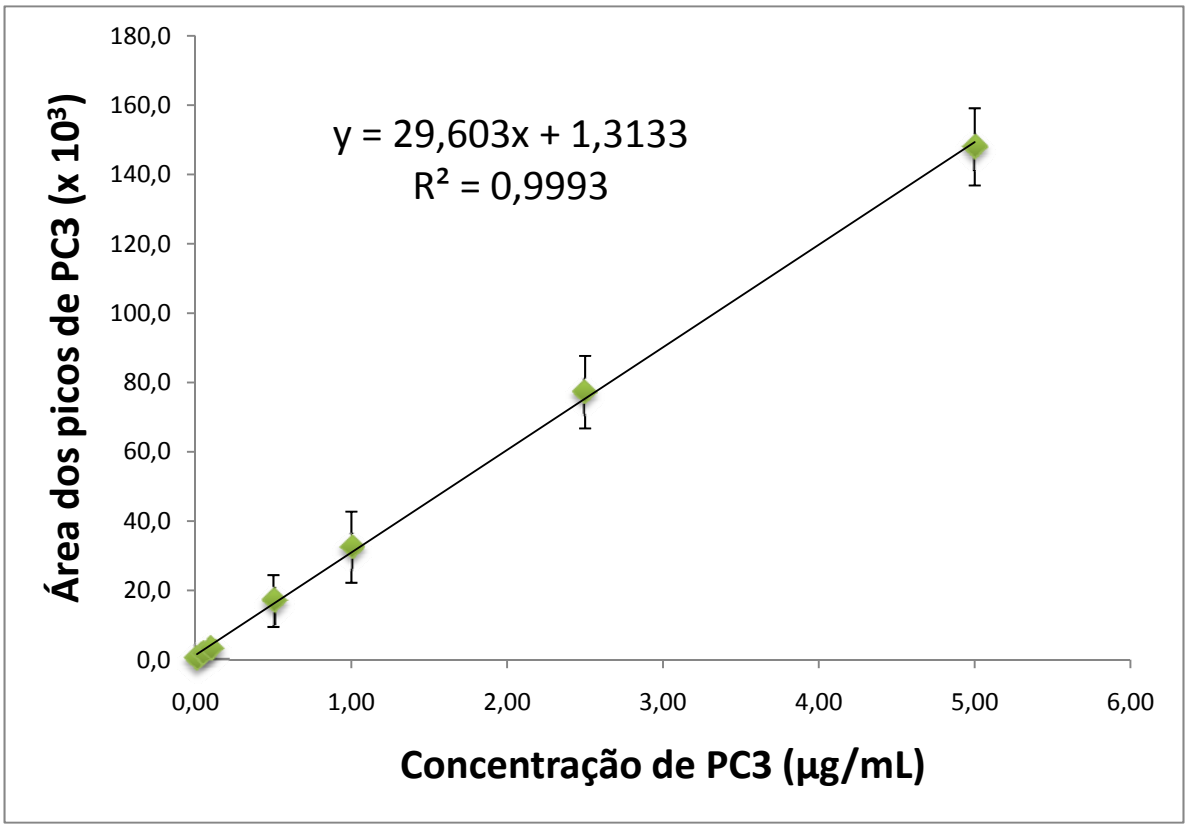


Figura 32. Curva de calibração de PC3, realizada em triplicata. Os valores são as médias com os desvios padrão.

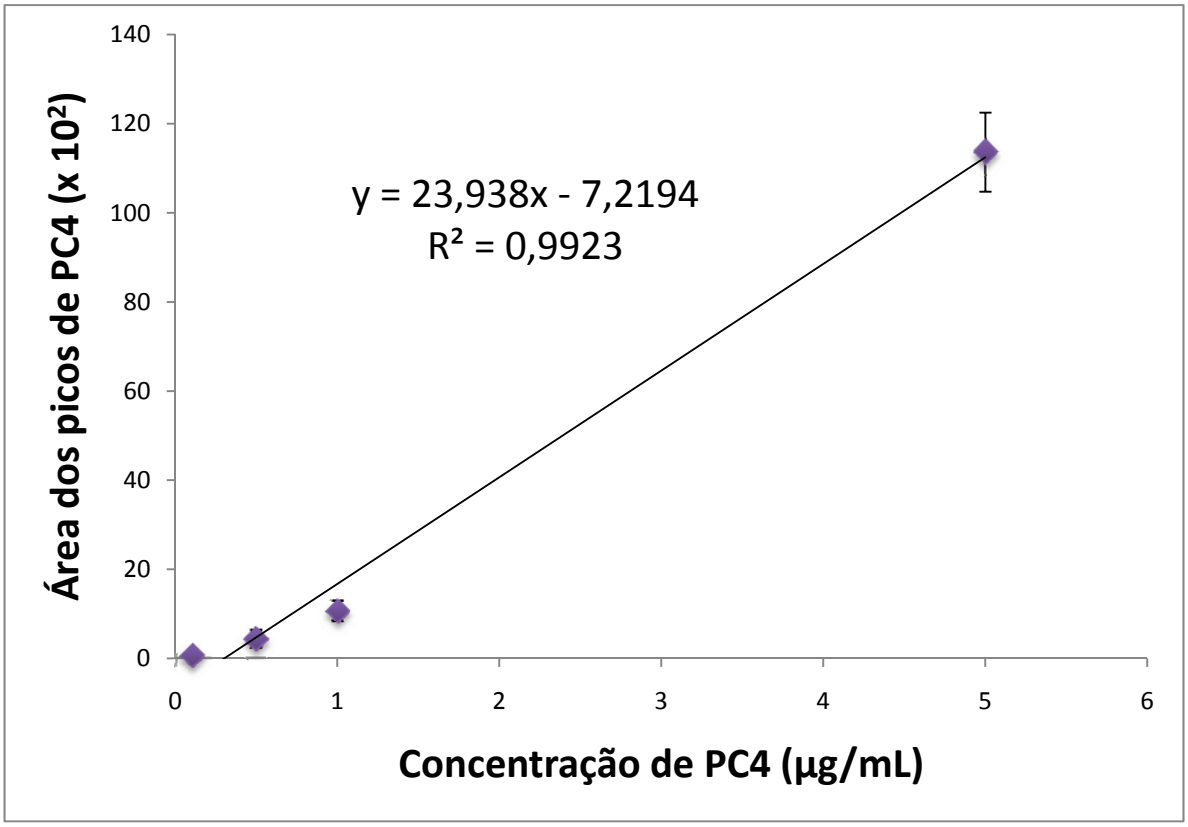


Figura 33. Curva de calibração de PC4, realizada em triplicata. Os valores são as médias com os desvios padrão.

4.5.4. Quantificação de PC3 e PC4 em concentrações crescentes de Cd

Os níveis intracelulares de PC3 e PC4 foram estimados após as células de *L. polyedrum* serem expostas a Cd (de 0,2 a 3,0 µg/mL) por 24 horas de exposição. Os resultados indicam que a presença de Cd induz a síntese de PC3 e PC4 (figuras 34 e 35 respectivamente).

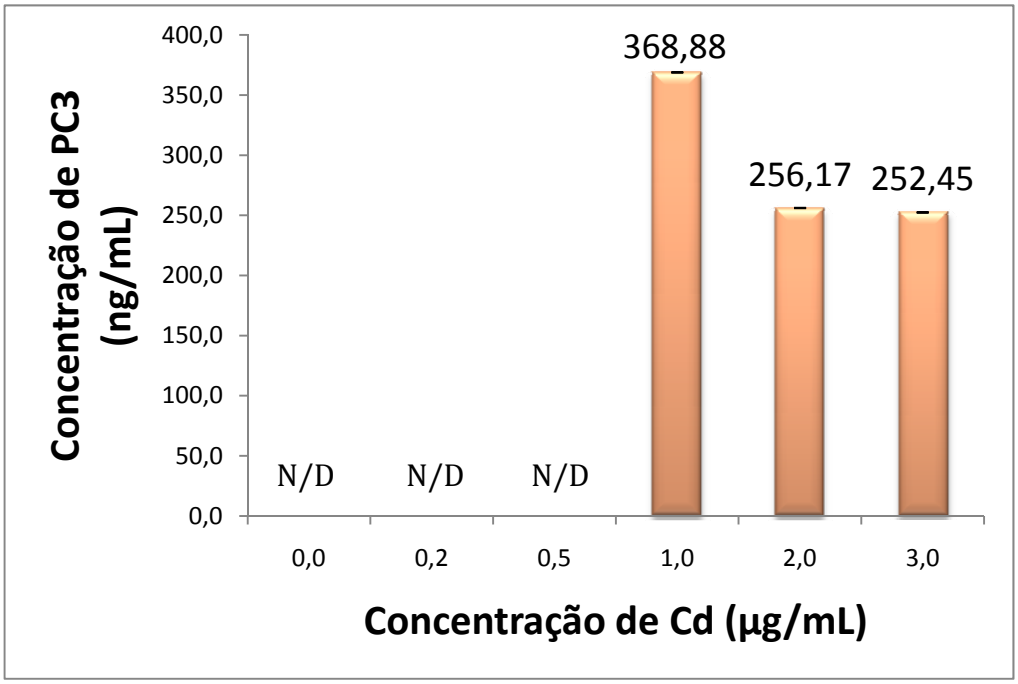


Figura 34. Níveis de PC3 com aumento de quantidade de Cd a que as algas são expostas. A análise foi realizada em triplicata. Os valores são as médias com os desvios padrão. N/D significa não detectado.

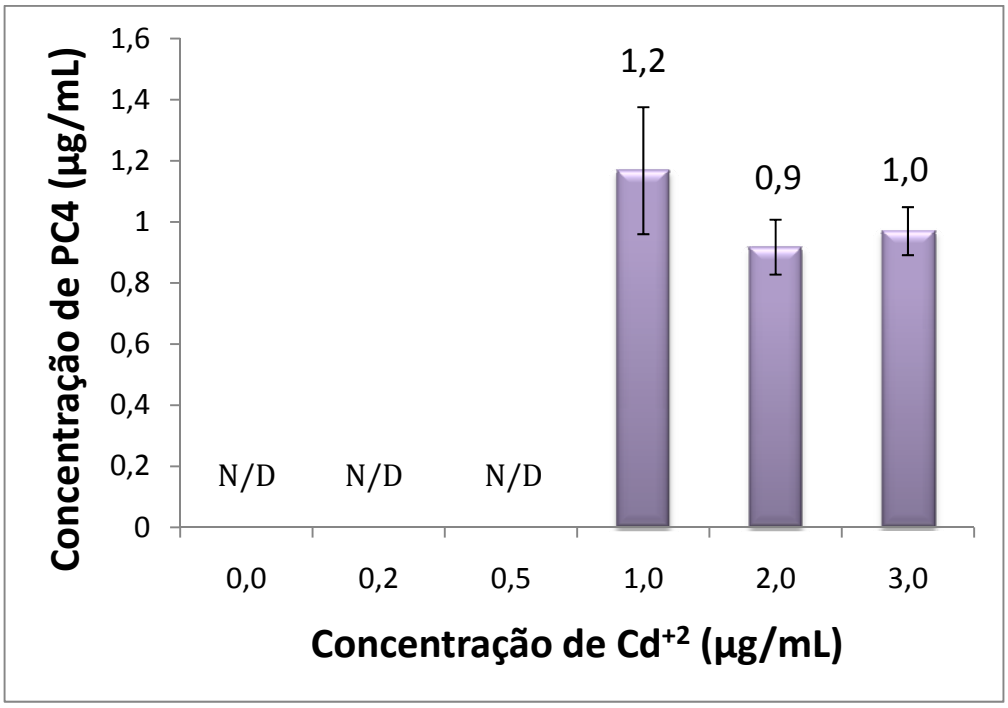


Figura 35. Níveis de PC4 com aumento de quantidade de Cd a que as algas são expostas. A análise foi realizada em triplicata. Os valores são as médias com os desvios padrão. N/D significa não detectado.

Pode-se verificar que, quando as algas estão em contato com concentrações baixas de cádmio (0,2 e 0,5 µg/mL), parecem não sintetizar PC. Com o aumento da concentração de metal, a alga sintetiza quantidades crescentes da substância quelante. Em ambos os casos, acima de 1,0 µg/mL, os níveis de PC3 e PC4 são ligeiramente diminuídos, indicando que a alga atinge o limite máximo de síntese de PC ou a quantidade de Cd é tão grande, que as células morrem antes mesmo de conseguirem sintetizar PC.

É importante observar que o limite máximo encontrado de PC3 está aproximadamtente 4 vezes menor que o de PC4. Este resultado sugere que a PC3 deve ser direcionada para a síntese de PC4. E naturalmente pode-se supor que o limite máximo de PC4 alcançado deve induzir a síntese de PC5. Ainda, a rota de biossíntese de PC é única e a adição do dímero Glu-Cys às moléculas de PC é catalizada pela fitoquelatina sintase (ver esquema 5). Neste sentido, é esperado que a enzima antinja sua velocidade máxima com a disponibilidade de substrato em excesso.

4.5.5. Quantificação de PC3 e PC4 em tempos crescentes de exposição a Cd

Neste experimento fixou-se a quantidade de cádmio à qual a alga foi exposta (2,0 µg/mL) e foram sendo retiradas alíquotas do meio de cultura em tempos crescentes de exposição, para verificar quanto tempo o organismo leva para sintetizar as PC3 e PC4 (figuras 36 e 37 respectivamente).

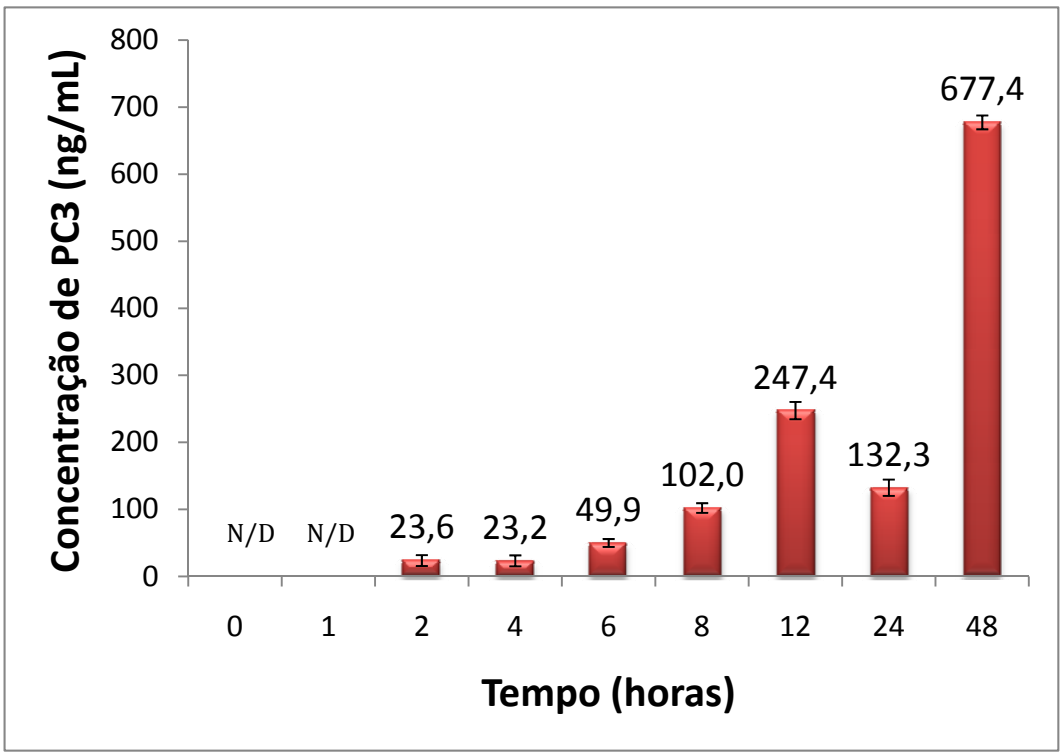


Figura 36. Síntese de PC3 em tempos crescentes de exposição a cádmio (2,0 µg/mL), analisadas em triplicata. . Os valores são as médias com os desvios padrão. N/D significa não detectado.

Através da análise da figura 36, pode-se visualizar que a PC3 começa a ser sintetizada depois de 2 horas de exposição a cádmio.

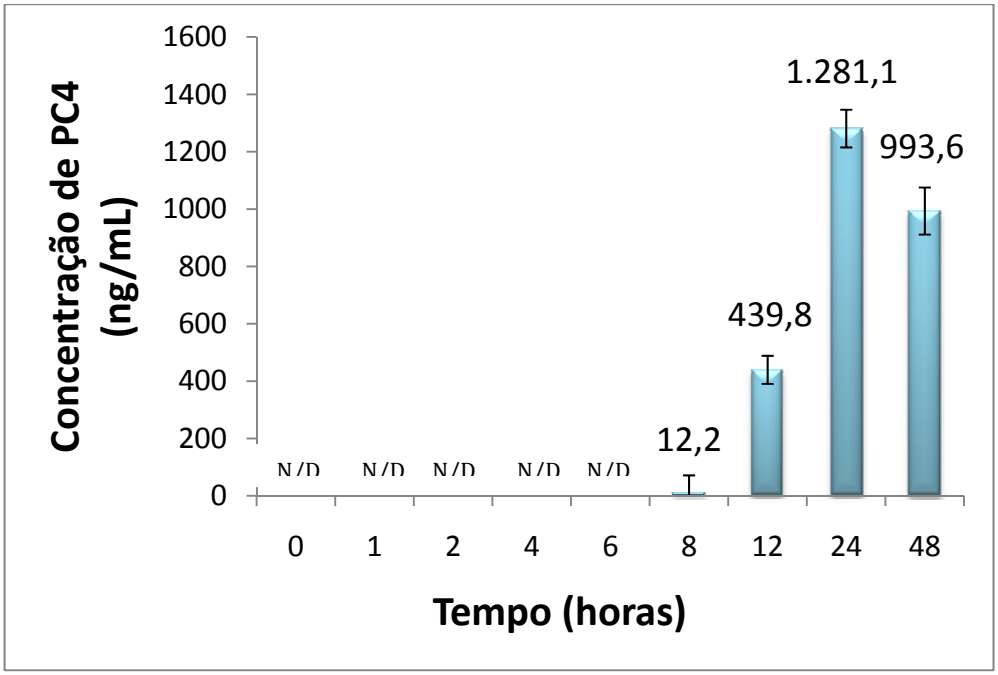
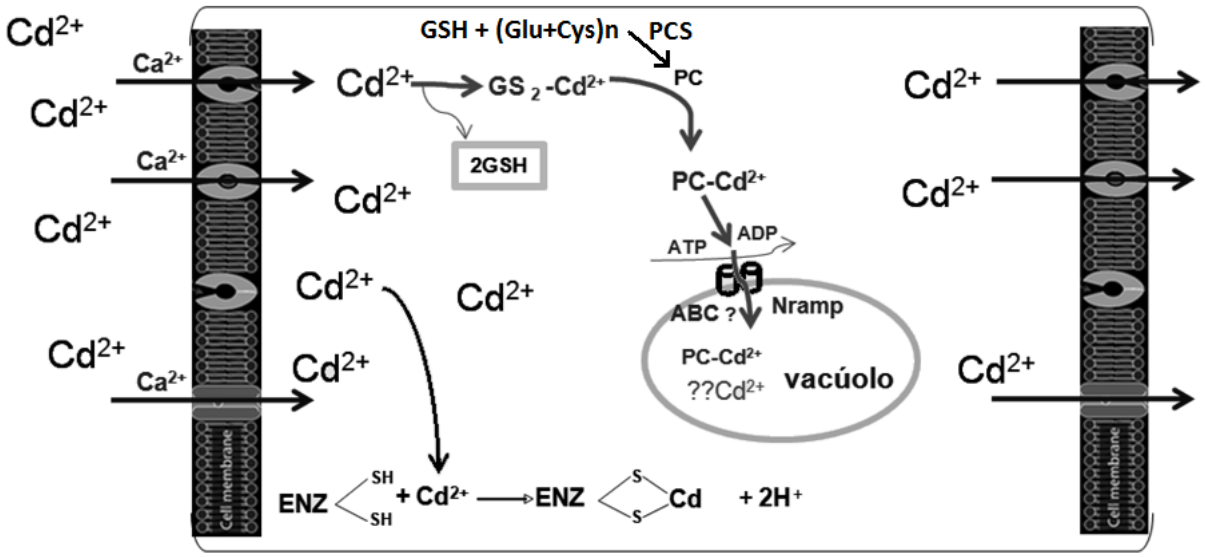


Figura 37. Síntese de PC4 em tempos crescentes de exposição à cádmio (2,0 µg/mL), analisadas em triplicata. . Os valores são as médias com os desvios padrão. N/D significa não detectado.

Pode-se notar que a PC4 leva cerca de 8 horas para ser sintetizada (figura 37), enquanto que a PC3 levar apenas 2 horas. Pode-se inferir que por ser um peptídeo de cadeia maior, a PC4 leva um tempo maior para ser sintetizada do que a PC3, que rapidamente é liberada no citoplasma celular para se complexar com o Cd e passar para o vacúolo, onde fica armazenada.

A entrada de Cd nas células desencadeando o processo de síntese de PC pode ser visualizado no esquema 5. O Cd entra nas células por canais de cálcio. Uma vez dentro das células, o Cd pode se ligar às enzimas que possuam grupos SH (inativando-as), pode se ligar à GSH e induzir a síntese de PC. Ao se ligar às PC, o complexo Cd-PC é armazenado dentro do vacúolo celular.



Esquema 5. Cd dentro das células de algas, podendo se ligar a enzimas e se complexar com GSH e PC (formando o complexo PC-Cd que é armazenado dentro do vacúolo). Adaptado de Tonon (2009).

Na busca por artigos científicos para comparar os resultados aqui obtidos, encontram-se apenas artigos em que relacionam o tempo de exposição (em semanas) ao qual plantas são expostas à cádmio (Oven *et al.*, 2001; Maier *et al.*, 2003; Mendoza-Cozatl & Moreno-Sanchez, 2006), o que impossibilita a comparação uma vez que o tempo de absorção de metais em plantas é muito maior do que em algas unicelulares.

5. CONCLUSÕES

- As culturas de *L. polyedrum* em meio f/2 mostraram-se adequadas para ensaios toxicológicos e a utilização do espectrofotômetro auxiliou a contagem celular;

- a DL_{50} de cádmio para a *L. polyedrum* exposta por 24 h é de 3,0 µg/mL;

- a quantidade de Cd presente no meio de cultura diminuiu quando o meio de cultura continha células de *L. polyedrum,* indicando que esta é uma espécie com potencial biorremediador, ajudando na remoção de metais do meio aquático.

- houve aumento da atividade da enzima SOD em amostras expostas ao metal;

- foi desenvolvido método para detecção de GSH e GSSG por LC-MS;

- os resultados das análises de GSH e GSSG mostraram que a quantidade de ambas diminui quando algas são expostas ao metal, indicando uma possível utilização das moléculas para síntese de PC;

- foi desenvolvido método para detecção de PC3 e PC4 por LC-MS;

- a quantidade de PC3 e PC4 sintetizadas pelas células aumenta de acordo com o aumento de Cd presente no meio e é nula em organismos não expostos a este metal, sendo essas moléculas, portanto, potenciais biomarcadores de exposição ao metal.

6. BIBLIOGRAFIA

ADONAYLO, V. N.; OTEIZA, P. I. Lead intoxication: antioxidant defenses and oxidative damage in rat brain. **Toxicology,** v. 135, n. 2-3, p. 77-85, 1999.

ALLAN, R. Introduction: mining and metals in the environment. **Journal of Geochemical Exploration,** v. 58, n. 2-3, p. 95-100, 1997.

ANDERSON, D. M.; KULIS, D. M.; BINDER, B. J. Sexuality and cyst formation in the dinoflagellate *Gonyaulax tamarensis*: cyst yield batch cultures. **Journal of Phycology,** v. 20, n. 3, p. 418-425, 1984.

ARISAWA, K.; NAKANO, A.; SAITO, H.; LIU, X. J.; YOKOO, M.; SODA, M.; KOBA, T.; TAKABASHI, T.; KINOSHITA, K. Mortality and cancer incidence among a population previously exposed to environmental cadmium. **International Archives of Occupational and Environmental Health,** v. 74, n. 4, p. 255-262, 2001.

ARMISEN, R. World-wide use and importance of Gracilaria. **Journal of Applied Phycology,** v. 7, n. 3, p. 231-243, 1995.

ASAI, A.; SUGAWARA, T.; ONO, H.; NAGAO, A. Biotransformation of fucoxanthinol into amarouciaxanthin A in mice and HepG2 cells: Formation and cytotoxicity of fucoxanthin metabolites. **Drug Metabolism and Disposition,** v. 32, n. 2, p. 205-211, 2004.

ASANO, C. S.; OKAMOTO, O. K.; COLEPICOLO, P. The activity of superoxide dismutase oscillates in the marine dinoflagellate *Gonyaulax polyedra*. **Ciência e cultura,** v. 48, p. 64-67, 1996.

ASH, C.; STONE, R. A question of dose - Introduction. **Science,** v. 300, n. 5621, p. 925-925, 2003.

BAGIYAN, G. A.; KOROLEVA, I. K.; SOROKA, N. V.; UFIMTSEV, A. V. Oxidation of thiol compounds by molecular oxygen in aqueous solutions. **Russian Chemical Bulletin,** v. 52, n. 5, p. 1135-1141, 2003.

BALZER, I.; HARDELAND, R. Photoperiodism and effects of indoleamines in a unicellular alga, *Gonyaulax polyedra*. **Science,** v. 253, n. 5021, p. 795-7, 1991.

BALZER, I. H., R. Effects of Indoleamines and short photoperiods on the encystment of *Gonyaulax polyedra*. **Chronobiology International,** v. 9, n. 4, p. 260-265, 1992.

BECKER, E. W. **Microalgae: biotechnology and microbiology**. Cambridge University Press, 1994.

BEHRMANN, G.; HARDELAND, R. Ultrastructural characterization of asexual cysts of *Gonyaulax polyedra* Stein (*Dinoflagellata*). **Protoplasma,** v. 185, n. 1-2, p. 22-27, 1995.

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

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

BRAUTIGAM, A.; SCHAUMLOFFEL, D.; KRAUSS, G. J.; WESENBERG, D. Analytical approach for characterization of cadmium-induced thiol peptides a case study using *Chlamydomonas reinhardtii*. **Analytical and Bioanalytical Chemistry,** v. 395, n. 6, p. 1737-1747, 2009.

BUCHET, J. P.; LAUWERYS, R.; ROELS, H.; BERNARD, A.; BRUAUX, P.; CLAEYS, F.; DUCOFFRE, G.; DE PLAEN, P.; STAESSEN, J.; AMERY, A.; LIJNEN, P.; THIJS, L.; RONDIA, D.; SARTOR, F.; SAINT REMY, A.; NICK, L. Renal effects of cadmium body burden of the general population. **The Lancet,** v. 336, n. 8717, p. 699-702, 1990.

BUCHMANN, I. Battery University. 2005. Disponível em: < http://www.batteryuniversity.com/partone-11.htm >. Acesso em: 24/08/2009.

CANTÚI, M. D.; CARRILHOI, E.; WULFFII, N. A.; PALMA, M. S. Seqüenciamento de peptídeos usando espectrometria de massas: um guia prático. **Química nova,** v. 31, 2008.

CARDEY, B.; FOLEY, S.; ENESCU, M. Mechanism of thiol oxidation by the superoxide radical. **Journal of Physical Chemistry A,** v. 111, n. 50, p. 13046-13052, 2007.

CARDOZO, K. H. M. **Estudos de compostos fotoprotetores da radiação ultravioleta em algas: aminoácidos do tipo micosporinas (MAAs)**. 2007. Departamento de bioquímica, Universidade de São Paulo, São Paulo.

CHEN, F.; SHI, X. L. Intracellular signal transduction of cells in response to carcinogenic metals. **Critical Reviews in Oncology Hematology,** v. 42, n. 1, p. 105-121, 2002.

COBBETT, C. S. Phytochelatins and their roles in heavy metal detoxification. **Plant Physiology,** v. 123, n. 3, p. 825-832, 2000.

COLEPICOLO, P.; CAMARERO, V. C. P. C.; HASTINGS, J. W. A circadian rhythm in the activity of superoxide dismutase in the photosynthetic alga *Gonyaulax polyedra*. **Chronobiology International,** v. 9, n. 4, p. 266-268, 1992.

COTURNIX. Biological Clocks in Protista. 2006. Disponível em: < http://scienceblogs.com/clock/upload/2006/07/gonyalax.jpeg >. Acesso em: 27/08/2009.

DE VRIES, D. J.; BEART, P. M. Fishing for drugs from the sea: status and strategies. **Trends Pharmacology Science,** v. 16, n. 8, p. 275-9, 1995.

DEKNECHT, J. A.; VANBAREN, N.; TENBOOKUM, W. M.; SANG, H. W. W. F.; KOEVOETS, P. L. M.; SCHAT, H.; VERKLEIJ, J. A. C. Synthesis and degradation of phytochelatins in cadmium sensitive and cadmium tolerant *Silene vulgaris*. **Plant Science,** v. 106, n. 1, p. 9-18, 1995.

DEKNECHT, J. A. V., M.; KOEVOETS, P. L. M.; SCHAT, H.; VERKLEIJ, J. A. C.; ERNST, W. H. O. Phytochelatins in cadmium sensitive and cadmium tolerant *Silene vulgaris* - chain length distribution and sulfide incorporation. **Plant Physiology,** v. 104, n. 1, p. 255-261, 1994.

DIXON, D. P.; FORDHAM-SKELTON, A. P.; EDWARDS, R. Redox regulation of a soybean tyrosine-specific protein phosphatase. **Biochemistry,** v. 44, n. 21, p. 7696-7703, 2005.

DODGE, J. D. Some revisions of the family *Gonyaulacaceae* (Dinophyceae) based on a scanning electron microscope study. **Botanica Marina,** v. 32, n. 4, p. 275-298, 1989.

DONGRE, A. R.; JONES, J. L.; SOMOGYI, A.; WYSOCKI, V. H. Influence of peptide composition, gas-phase basicity, and chemical modification on fragmentation efficiency: Evidence for the mobile proton model. **Journal of the American Chemical Society,** v. 118, n. 35, p. 8365-8374, 1996.

FRITZ, L.; ANDERSON, D. M.; TRIEMER, R. E. Ultrastructural aspects of sexual reproduction in the red tide dinoflagellate *Gonyaulax tamarensis*. **Journal of Phycology,** v. 25, n. 1, p. 95-107, 1989.

GEKELER, W.; GRILL, E.; WINNACKER, E. L.; ZENK, M. H. Algae sequester heavy metals via synthesis of phytochelatin complexes. **Archives of Microbiology,** v. 150, n. 2, p. 197-202, 1988.

GEKELER, W.; GRILL, E.; WINNACKER, E. L.; ZENK, M. H. Survey of the plant kingdom for the ability to bind heavy metals through phytochelatins. **Zeitschrift Fur Naturforschung C-a Journal of Biosciences,** v. 44, n. 5-6, p. 361-369, 1989.

GIBSON, J. A. E.; GARRICK, R. C.; BURTON, H. R.; MCTAGGART, A. R. Dimethylsulfide and the alga *Phaeocystis pouchetii* in antarctic coastal waters. **Marine Biology,** v. 104, n. 2, p. 339-346, 1990.

GRILL, D.; TAUSZ, M.; DE KOK, L. J. **Significance of glutathione to plant adaptation to the environment**. Hardcover, 2002.

GRILL, E.; GEKELER, W.; WINNACKER, E. L.; ZENK, H. H. Homo phytochelatins are heavy metal binding peptides of homo glutathione containing fabales. **Febs Letters,** v. 205, n. 1, p. 47-50, 1986.

GRILL, E.; LOFFLER, S.; WINNACKER, E. L.; ZENK, M. H. Phytochelatins, the heavy metal binding peptides of plants, are synthesized from glutathione by a specific gamma glutamylcysteine dipeptidyl transpeptidase (phytochelatin synthase). **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America,** v. 86, n. 18, p. 6838-6842, 1989.

GRILL, E.; WINNACKER, E. L.; ZENK, M. H. Phytochelatins, a class of heavy metal binding peptides from plants, are functionally analogous to metallothioneins. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America,** v. 84, n. 2, p. 439-443, 1987.

GUILLARD, R. R.; RYTHER, J. H. Studies of marine planktonic diatoms. *Cyclotella nana* Hustedt, and *Detonula confervacea* (Cleve) Gran. **Canadian Journal of Microbiology,** v. 8, n. 2, p. 229-&, 1962.

HALLIWELL, B. Superoxide dependent formation of hydroxyl radicals in the presence of iron salts is a feasible source of hydroxyl radicals Invivo. **Biochemical Journal,** v. 205, n. 2, p. 461-462, 1982.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. **Free radicals in biology and medicine**. 3rd. Oxford University Press, 1999. 936

HAN, T. M.; RUNNEGAR, B. Megascopic eukaryotic algae from the 2.1 billion year old negaunee iron formation, Michigan. **Science,** v. 257, n. 5067, p. 232-235, 1992.

HAQ, R. U.; SHAKOORI, A. R. Short communication: microbiological treatment of industrial wastes containing toxic chromium involving successive use of bacteria, yeast and algae. **World Journal of Microbiology & Biotechnology,** v. 14, n. 4, p. 583-585, 1998.

HARDELAND, R. Induction of cyst formation by low temperature in the dinoflagellate *Gonyaulax polyedra* Stein - dependence on circadian phase and requirement of light. **Experientia,** v. 50, n. 1, p. 60-62, 1994.

HARWOOD, D. T.; KETTLE, A. J.; BRENNAN, S.; WINTERBOURN, C. C. Simultaneous determination of reduced glutathione, glutathione disulphide and glutathione sulphonamide in cells and physiological fluids by isotope dilution liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences,** v. 877, n. 28, p. 3393-3399, 2009.

HASTINGS, J. W.; ASTRACHAN, L.; SWEENEY, B. M. Persistent Daily Rhythm in Photosynthesis. **Journal of General Physiology,** v. 45, n. 1, p. 69-&, 1961.

HASTINGS, J. W.; BOULOS, Z.; RUSAK, B. **Comparative Animal Physiology, Neural and Integrative Animal Physiology**. 4th. New York: Wiley Interscience, 1991.

HASTINGS, J. W.; DUNLAP, J. C. Cell-free components in dinoflagellate bioluminescence - the particulate activity - scintillons - the soluble components - luciferase, luciferin, and luciferin binding protein. **Methods in Enzymology,** v. 133, p. 307-327, 1986.

HASTINGS, J. W.; SWEENEY, B. M. A Persistent diurnal rhythm of luminescence in *Gonyaulax polyedra*. **The Biological Bulletin,** v. 115, n. 3, p. 440-458, 1958.

HAY, M. E. Marine chemical ecology: What's known and what's next? **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology,** v. 200, n. 1-2, p. 103-134, 1996.

HAYNES, D.; JOHNSON, J. E. Organochlorine, heavy metal and polyaromatic hydrocarbon pollutant concentrations in the Great Barrier Reef (Australia) environment: a review. **Marine pollution bulletin,** v. 41, n. 7-12, p. 267-278, 2000.

HENDERSON, M.; MITMAN, G. G. 66 Algal bioremediation of mine waste tailings by application of moss protonema. **Journal of Phycology,** v. 39, n. s1, p. 23-23, 2003.

HIRATA, K.; TSUJI, N.; MIYAMOTO, K. Biosynthetic regulation of phytochelatins, heavy metal-binding peptides. **Journal of Bioscience and Bioengineering,** v. 100, n. 6, p. 593-599, 2005.

HO, Y. S.; MAGNENAT, J. L.; GARGANO, M.; CAO, J. The nature of antioxidant defense mechanisms: a lesson from transgenic studies. **Environmental Health Perspectives,** v. 106, p. 1219-1228, 1998.

HOLLNAGEL, H. C. **Aspectos bioquímicos da biossíntese de pigmentos carotenóides em *Gonyaulax polyedra* (dinophyceae)**. 2000. Departamento de Bioquímica, Universidade de São Paulo, São Paulo.

HOLLNAGEL, H. C.; DI MASCIO, P.; ASANO, C. S.; OKAMOTO, O. K.; STRINGHER, C. G.; OLIVEIRA, M. C.; COLEPICOLO, P. The effect of light on the biosynthesis of beta-carotene and superoxide dismutase activity in the photosynthetic alga *Gonyaulax polyedra*. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research,** v. 29, n. 1, p. 105-10, 1996.

HOLOVSK·, J. K.; SOBEKOV·, A.; HOLOVSK·, K.; LEN·RTOV·, V.; JAVORSK˝, P.; LEG·TH, J.; LEG·TH, L. U.; MARETTA, M. Antioxidant and detoxifying enzymes in the liver of rats after subchronic inhalation of the mixture of cyclic hydrocarbons. **Experimental and Toxicologic Pathology,** v. 56, n. 6, p. 377-383, 2005.

HOWDEN, R.; GOLDSBROUGH, P. B.; ANDERSEN, C. R.; COBBETT, C. S. Cadmium sensitive, Cad1 mutants of *Arabidopsis thaliana* are phytochelatin deficient. **Plant Physiology,** v. 107, n. 4, p. 1059-1066, 1995.

HUANG, B.; HATCH, E.; GOLDSBROUGH, P. B. Selection and characterization of cadmium tolerant cells in tomato. **Plant Science,** v. 52, n. 3, p. 211-221, 1987.

HUGHES, S. L.; BUNDY, J. G.; WANT, E. J.; KILLE, P.; STURZENBAUM, S. R. The metabolomic responses of *Caenorhabditis elegans* to cadmium are largely independent of metallothionein status, but dominated by changes in cystathionine and phytochelatins. **Journal of Proteome Research,** v. 8, n. 7, p. 3512-3519, 2009.

IARC, I. A. F. R. O. C. **Beryllium, Cadmium, Mercury, and Exposures in the Glass Manufacturing Industry**: **World health organization**. 58 1997.

INÁCIO, A. F. **Metalotioneína e Metais em Geophagus brasiliensis - Acará**. 2006. 54 (Mestrado). Saúde Pública, Escola Nacional de Saúde Pública, Rio de Janeiro.

INDEX MUNDI. http://www.indexmundi.com/en/commodities/minerals/. 2009. Acesso em: 10 de agosto de 2009.

IPCS, I. P. O. C. S. **Environmental health criteria 134** 1992.

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

JACKSON, P. J.; DELHAIZE, E.; HARRISON, L. A.; ROBINSON, N. J. Mechanisms of trace metal tolerance in plants. **Abstracts of Papers of the American Chemical Society,** v. 195, p. 26-AGFD, 1988.

JAMES, S. J.; ROSE, S.; MELNYK, S.; JERNIGAN, S.; BLOSSOM, S.; PAVLIV, O.; GAYLOR, D. W. Cellular and mitochondrial glutathione redox imbalance in lymphoblastoid cells derived from children with autism. **Faseb Journal,** v. 23, n. 8, p. 2374-2383, 2009.

JARUP, L.; BERGLUND, M.; ELINDER, C. G.; NORDBERG, G.; VAHTER, M. Health effects of cadmium exposure - a review of the literature and a risk estimate - Preface. **Scandinavian Journal of Work Environment & Health,** v. 24, p. -, 1998.

JIN, C. Y.; CUI, J. L.; CUI, S. Y. Synergetic effect by oxidized glutathione for radical scavenging activities of reduced glutathione. **Chinese Journal of Analytical Chemistry,** v. 37, n. 9, p. 1349-1353, 2009.

JOHNSON, C. H.; GOLDEN, S. S.; ISHIURA, M.; KONDO, T. Circadian clocks in prokaryotes. **Molecular Microbiology,** v. 21, n. 1, p. 5-11, 1996.

KARIMI, N.; GHADERIAN, S. M.; RAAB, A.; FELDMANN, J.; MEHARG, A. A. An arsenic-accumulating, hypertolerant *brassica*, *Isatis capadocica*. **New Phytologist,** v. 184, n. 1, p. 41-47, 2009.

KNEER, R.; KUTCHAN, T. M.; HOCHBERGER, A.; ZENK, M. H. *Saccharomyces cerevisiae* and *Neurospora crassa* contain heavy-metal sequestering phytochelatin. **Archives of Microbiology,** v. 157, n. 4, p. 305-310, 1992.

KOT, M.; BICZ, A. Inactivation of jack bean urease by N-ethylmaleimide: pH dependence, reversibility and thiols influence. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry,** v. 23, n. 4, p. 514-520, 2008.

KOWALEWSKA, G. Phytoplankton - the main factor responsible for transport of polynuclear aromatic hydrocarbons from water to sediments in the Southern Baltic ecosystem (extended abstract). **Ices Journal of Marine Science,** v. 56, p. 219-222, 1999.

LANDSBERG, J. H. The effects of harmful algal blooms on aquatic organisms. **Reviews in Fisheries Science,** v. 10, n. 2, p. 113-390, 2002.

LEE, R.; BRITZ-MCKIBBIN, P. Differential rates of glutathione oxidation for assessment of cellular redox status and antioxidant capacity by capillary electrophoresis mass spectrometry: an elusive biomarker of oxidative stress. **Analytical Chemistry,** v. 81, n. 16, p. 7047-7056, 2009.

LEI, A. P.; HU, Z. L.; WONG, Y. S.; TAM, N. F. Y. Removal of fluoranthene and pyrene by different microalgal species. **Bioresource Technology,** v. 98, n. 2, p. 273-280, 2007.

LEITÃO, M. A. D.; CARDOZO, K. H. M.; PINTO, E.; COLEPICOLO, P. PCB-induced oxidative stress in the unicellular marine dinoflagellate *Lingulodinium polyedrum*. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology,** v. 45, n. 1, p. 59-65, 2003.

LEONARD, S. S.; BOWER, J. J.; SHI, X. L. Metal-induced toxicity, carcinogenesis, mechanisms and cellular responses. **Molecular and Cellular Biochemistry,** v. 255, n. 1-2, p. 3-10, 2004.

LIVINGSTONE, D. R. Contaminant stimulated reactive oxygen species production and oxidative damage in aquatic organisms. **Marine pollution bulletin,** v. 42, n. 8, p. 656-666, 2001.

LONERGAN, T. A. Regulation of the photosynthetic light reactions by the biological clock. **Photochemistry and Photobiology,** v. 40, n. 6, p. 789-793, 1984.

LOURENÇO, S. O. **Cultivo de microalgas marinhas: princípios e aplicações**. 1a. São Carlos: Rima, 2006.

LUOMA, S. N.; VAN GEEN, A.; LEE, B. G.; CLOERN, J. E. Metal uptake by phytoplankton during a bloom in south San Francisco bay: implications for metal cycling in estuaries. **Limnology and Oceanography,** v. 43, n. 5, p. 1007-1016, 1998.

MACFARLANE, G. R.; BURCHETT, M. D. Photosynthetic pigments and peroxidase activity as indicators of heavy metal stress in the grey mangrove, *Avicennia marina* (Forsk.) Vierh. **Marine pollution bulletin,** v. 42, n. 3, p. 233-240, 2001.

MAIER, E. A.; MATTHEWS, R. D.; MCDOWELL, J. A.; WALDEN, R. R.; AHNER, B. A. Environmental cadmium levels increase phytochelatin and glutathione in lettuce grown in a chelator-buffered nutrient solution. **Journal of Environmental Quality,** v. 32, n. 4, p. 1356-1364, 2003.

MAITANI, T.; KUBOTA, H.; SATO, K.; YAMADA, T. The composition of metals bound to class III metallothionein (phytochelatin and its desglycyl peptide) induced by various metals in root cultures of *Rubia tinctorum*. **Plant Physiology,** v. 110, n. 4, p. 1145-1150, 1996.

MANINI, P.; NAPOLITANO, A.; WESTERHOF, W.; RILEY, P. A.; D'ISCHIA, M. A reactive ortho quinone generated by tyrosinase catalyzed oxidation of the skin depigmenting agent monobenzone: self coupling and thiol conjugation reactions and possible implications for melanocyte toxicity. **Chemical Research in Toxicology,** v. 22, n. 8, p. 1398-1405, 2009.

MANN, M.; MENG, C. K.; FENN, J. B. Interpreting mass spectra of multiply charged ions. **Analytical Chemistry,** v. 61, n. 15, p. 1702-1708, 1989.

MATSUNAGA, T.; TAKEYAMA, H.; NAKAO, T.; YAMAZAWA, A. Screening of marine microalgae for bioremediation of cadmium-polluted seawater. **Journal of Biotechnology,** v. 70, n. 1-3, p. 33-38, 1999.

MCCORD, J. M.; FRIDOVIC, I. Superoxide dismutase an enzymic function for erythrocuprein (Hemocuprein). **Journal of Biological Chemistry,** v. 244, n. 22, p. 6049-&, 1969.

MEHRA, R. K.; KODATI, V. R.; ABDULLAH, R. Chain length-dependent Pb(Ii) coordination in phytochelatins. **Biochemical and Biophysical Research Communications,** v. 215, n. 2, p. 730-736, 1995.

MENDOZA-COZATL, D. G.; MORENO-SANCHEZ, R. Control of glutathione and phytochelatin synthesis under cadmium stress. Pathway modeling for plants. **Journal of Theoretical Biology,** v. 238, n. 4, p. 919-936, 2006.

MILLER, V. M.; LAWRENCE, D. A.; MONDAL, T. K.; SEEGAL, R. F. Reduced glutathione is highly expressed in white matter and neurons in the unperturbed mouse brain - implications for oxidative stress associated with neurodegeneration. **Brain Research,** v. 1276, p. 22-30, 2009.

MOJICA, E. R. E.; KIM, S.; AGA, D. S. Formation of N-ethylmaleimide (NEM)-Glutathione conjugate and N-ethylmaleamic acid revealed by mass spectral characterization of intracellular and extracellular microbial metabolites of NEM. **Applied and Environmental Microbiology,** v. 74, n. 1, p. 323-326, 2008.

MOKGALAKA-MATLALA, N. S.; FLORES-TAVIZON, E.; CASTILLO-MICHELB, H.; PERALTA-VIDEA, J. R.; GARDEA-TORRESDEY, J. L. Arsenic tolerance in mesquite

(Prosopis sp.): Low molecular weight thiols synthesis and glutathione activity in response to arsenic. **Plant Physiology and Biochemistry,** v. 47, n. 9, p. 822-826, 2009.

MOORE, M. N.; DEPLEDGE, M. H.; READMAN, J. W.; LEONARD, D. R. P. An integrated biomarker-based strategy for ecotoxicological evaluation of risk in environmental management. **Mutation Research-Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis,** v. 552, n. 1-2, p. 247-268, 2004.

MOORTHI, S. D.; COUNTWAY, P. D.; STAUFFER, B. A.; CARON, D. A. Use of quantitative real-time PCR to investigate the dynamics of the red tide dinoflagellate *Lingulodinium polyedrum*. **Microbial Ecology,** v. 52, n. 1, p. 136-150, 2006.

MORELLI, E.; FERRARA, R.; BELLINI, B.; DINI, F.; DI GIUSEPPE, G.; FANTOZZI, L. Changes in the non-protein thiol pool and production of dissolved gaseous mercury in the marine diatom Thalassiosira weissflogii under mercury exposure. **Science of the Total Environment,** v. 408, n. 2, p. 286-293, 2009.

MULLER, M.; DE KOK, L. J.; WEIDNER, W.; TAUSZ, M. Differential effects of H_2S on cytoplasmic and nuclear thiol concentrations in different tissues of Brassica roots. **Plant Physiology and Biochemistry,** v. 40, n. 6-8, p. 585-589, 2002.

MUNDT, S.; KREITLOW, S.; NOWOTNY, A.; EFFMERT, U. Biochemical and pharmacological investigations of selected cyanobacteria. **International Journal of Hygiene and Environmental Health,** v. 203, n. 4, p. 327-334, 2001.

MURRAY, L. A.; RAAB, A.; MARR, I. L.; FELDMANN, J. R. Biotransformation of arsenate to arsenosugars by *Chlorella vulgaris*. **Applied Organometallic Chemistry,** v. 17, n. 9, p. 669-674, 2003.

NAKAGAWA, H.; NISHIJO, M. Environmental cadmium exposure, hypertension and cardiovascular risk. **J Cardiovasc Risk,** v. 3, n. 1, p. 11-7, 1996.

NISHIKAWA, K.; TOMINAGA, N. Isolation, growth, ultrastructure, and metal tolerance of the green alga, *Chlamydomonas acidophila* (Chlorophyta). **Bioscience Biotechnology and Biochemistry,** v. 65, n. 12, p. 2650-2656, 2001.

NOCTOR, G.; FOYER, C. H. Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology,** v. 49, p. 249-279, 1998.

NOCTOR, G.; GOMEZ, L.; VANACKER, H.; FOYER, C. H. Interactions between biosynthesis, compartmentation and transport in the control of glutathione homeostasis and signalling. **Journal of Experimental Botany,** v. 53, n. 372, p. 1283-1304, 2002.

NUBEL, T.; KLUGHAMMER, C.; HUBER, R.; HAUSKA, G.; SCHUTZ, M. Sulfide : quinone oxidoreductase in membranes of the hyperthermophilic bacterium Aquifex aeolicus (VF5). **Archives of Microbiology,** v. 173, n. 4, p. 233-244, 2000.

OGA, S.; CAMARGO, M. M. D. A.; BATISTUZZO, J. A. D. O. **Fundamentos de Toxicologia**. 3a. São Paulo: Atheneu Editora, 2008.

OKAI, Y.; HIGASHIOKAI, K.; YANO, Y.; OTANI, S. Suppressive effects of chlorophyllin on mutagen-induced umu C gene expression in *Salmonella typhimurium* (TA 1535/pSK 1002) and tumor promoter-dependent ornithine decarboxylase induction in BALB/c 3T3 fibroblast cells. **Mutation Research-Genetic Toxicology,** v. 370, n. 1, p. 11-17, 1996.

OKAMOTO, O. K. **Aspectos da adaptação bioquímica ao estresse metálico na alga unicelular *Gonyaulax polyedra*: modulação de antioxidantes cloroplásticos e expressão diferencial da enzima Fe-superóxido dismutase**. 2000. Departamento de Bioquímica, Instituto de química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

OKAMOTO, O. K.; ASANO, C. S.; AIDAR, E.; COLEPICOLO, P. Effects of cadmium on growth and superoxide dismutase activity of the marine microalga *Tetraselmis gracilis* (Prasinophyceae). **Journal of Phycology,** v. 32, n. 1, p. 74-79, 1996.

OKAMOTO, O. K.; COLEPICOLO, P. Response of superoxide dismutase to pollutant metal stress in the marine dinoflagellate *Gonyaulax polyedra*. **Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology & Pharmacology,** v. 119, n. 1, p. 67-73, 1998.

OKAMOTO, O. K.; SHAO, L.; HASTINGS, J. W.; COLEPICOLO, P. Acute and chronic effects of toxic metals on viability, encystment and bioluminescence in the dinoflagellate *Gonyaulax polyedra*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology,** v. 123, n. 1, p. 75-83, 1999.

OVEN, M.; RAITH, K.; NEUBERT, R. H. H.; KUTCHAN, T. M.; ZENK, M. H. Homo-phytochelatins are synthesized in response to cadmium in Azuki beans. **Plant Physiology,** v. 126, n. 3, p. 1275-1280, 2001.

PARSEK, M. R.; MCFALL, S. M.; CHAKRABARTY, A. M. Microbial degradation of toxic, environmental pollutants ecological and evolutionary considerations. **International Biodeterioration & Biodegradation,** v. 35, n. 1-3, p. 175-188, 1995.

PEARSON, R. G. Hard and soft acids and bases. **Journal of the American Chemical Society,** v. 85, n. 22, p. 3533-3539, 1963.

PINTO, E. **Modulação dos níveis de pigmentos e ácidos graxos em algas marinhas: função dos carotenóides e efeitos do estresse ambiental**. 2002. 129 Departamento de Bioquímica, Universidade de São Paulo, São Paulo.

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

POKORA, W.; RESZKA, J.; TUKAJ, Z. Activities of superoxide dismutase (SOD) isoforms during growth of *Scenedesmus* (Chlorophyta) species and strains grown in batch-cultures. **Acta Physiologiae Plantarum,** v. 25, n. 4, p. 375-384, 2003.

POMPELLA, A.; VISVIKIS, A.; PAOLICCHI, A.; DE TATA, V.; CASINI, A. F. The changing faces of glutathione, a cellular protagonist. **Biochemical Pharmacology,** v. 66, n. 8, p. 1499-1503, 2003.

POSPELOVA, V.; CHMURA, G. L.; BOOTHMAN, W. S.; LATIMER, J. S. Dinoflagellate cyst records and human disturbance in two neighboring estuaries, New Bedford Harbor and Apponagansett Bay, Massachusetts (USA). **Science of the Total Environment,** v. 298, n. 1-3, p. 81-102, 2002.

PREZELIN, B. B.; SWEENEY, B. M. Characterization of photosynthetic rhythms in marine dinoflagellates .2. photosynthesis-irradiance curves and in vivo chlorophyll a ffluorescence. **Plant Physiology,** v. 60, n. 3, p. 388-392, 1977.

QIAN, Y.; CASTRANOVA, V.; SHI, X. L. New perspectives in arsenic-induced cell signal transduction. **Journal of Inorganic Biochemistry,** v. 96, n. 2-3, p. 271-278, 2003.

RAMALHO, C. B.; HASTINGS, J. W.; COLEPICOLO, P. Circadian oscillation of nitrate reductase activity in *Gonyaulax Polyedra* is due to changes in cellular protein levels. **Plant Physiology,** v. 107, n. 1, p. 225-231, 1995.

RAND, G. M. **Fundamentals of aquatic toxicology: effects, environmental fate and risk assessment**. 2. CRC, 1995. 1148

RAUSER, W. E. Phytochelatins. **Annual Review of Biochemistry,** v. 59, p. 61-86, 1990.

RAUSER, W. E. Phytochelatins and related peptides. **Plant Physiology**, n. 109, p. 1141-1149, 1995.

REHMAN, A.; SHAKOORI, A. R. Heavy metal resistance *Chlorella* spp., isolated from tannery effluents, and their role in remediation of hexavalent chromium in industrial waste water. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology,** v. 66, n. 4, p. 542-547, 2001.

REHMAN, A.; SHAKOORI, F. R.; SHAKOORI, A. R. Heavy metal resistant *Distigma proteus* (Euglenophyta) isolated from industrial effluents and its possible role in bioremediation of contaminated wastewaters. **World Journal of Microbiology & Biotechnology,** v. 23, n. 6, p. 753-758, 2007.

ROBINSON, N. J.; URWIN, P. E.; ROBINSON, P. J.; JACKSON, P. J. **Stress induced gene expression in plants**. Amsterdam: Harwood Academic Publishers, 1994.

ROCHA, A. A. Algae as biological indicators of water pollution. **Algae and environment: a general approach**, 1992.

RODRIGUEZ-ARIZA, A.; DORADO, G.; NAVAS, J. I.; PUEYO, C.; LÛPEZ-BAREA, J. Promutagen activation by fish liver as a biomarker of littoral pollution. **Environmental and Molecular Mutagenesis,** v. 24, n. 2, p. 116-123, 1994.

ROENNEBERG, T.; TAYLOR, W. Automated recordings of bioluminescence with special reference to the analysis of circadian rhythms. **Methods in Enzymology,** v. 305, p. 104-19, 2000.

ROENNEBERG, T. M., DAVID. Two circadian oscillators in one cell. **Nature,** v. 362, n. 6418, p. 362-364, 1993.

ROSSI, R.; MILZANI, A.; DALLE-DONNE, I.; GIUSTARINI, D.; LUSINI, L.; COLOMBO, R.; DI SIMPLICIO, P. Blood glutathione disulfide: in vivo factor or in vitro artifact? **Clinical Chemistry,** v. 48, n. 5, p. 742-753, 2002.

RYAN, F. J.; LEESCH, J. G.; PALMQUIST, D. E.; AUNG, L. H. Glutathione concentration and phytotoxicity after fumigation of lemons with methyl iodide. **Postharvest Biology and Technology,** v. 45, n. 1, p. 141-146, 2007.

SATARUG, S.; MOORE, M. R. Adverse health effects of chronic exposure to low-level cadmium in foodstuffs and cigarette smoke. **Environmental Health Perspectives,** v. 112, n. 10, p. 1099-1103, 2004.

SCHOPF, J. W. Microfossils of the early archean apex chert: new evidence of the antiquity of life. **Science,** v. 260, n. 5108, p. 640-646, 1993.

SIES, H. Glutathione and its role in cellular functions. **Free Radical Biology and Medicine,** v. 27, n. 9-10, p. 916-921, 1999.

SIGAUD-KUTNER, T. C. S.; PINTO, E.; OKAMOTO, O. K.; LATORRE, L. R.; COLEPICOLO, P. Changes in superoxide dismutase activity and photosynthetic pigment content during growth of marine phytoplankters in batch-cultures. **Physiologia Plantarum,** v. 114, n. 4, p. 566-571, 2002.

SINGHAL, R. K.; ANDERSON, M. E.; MEISTER, A. Glutathione, a first line of defense against cadmium toxicity. **The Federation of American Societies for Experimental Biology Journal,** v. 1, n. 3, p. 220-3, 1987.

SOLUCORP, I. Solucorp Unveils Pollution Preventing, Self-Remediating Ni-Cd Battery to International Markets. 2006. Disponível em: < http://findarticles.com/p/articles/mi_m0EIN/is_2006_Oct_19/ai_n27033828/ >. Acesso em: 24/08/2009.

STEJSKAL, K.; SVOBODOVA, Z.; FABRIK, I.; ADAM, V.; BEKLOVA, M.; RODINA, M.; KIZEK, R. Content of cysteine, reduced and oxidized glutathione in spermatozoa of representatives of Acipenseriformes (*Acipenser baerii* and *A-ruthenus*) as well as

teleosts (*Perca fluviatilis* and *Sander lucioperca*). **Journal of Applied Ichthyology,** v. 24, n. 4, p. 519-521, 2008.

SWAMINATHAN, M. S. Bio-diversity: an effective safety net against environmental pollution. **Environmental Pollution,** v. 126, n. 3, p. 287-291, 2003.

SWEENEY, B. M. **Rhythmic phenomena in plants**. 2nd San Diego: Academic Press, 1987.

SWEENEY, B. M.; HASTINGS, J. W. Rhythmic cell division in populations of *Gonyaulax polyedra*. **Journal of Protozoology,** v. 5, n. 3, p. 217-224, 1958.

SZE, P. **A biology of the algae**. 3rd. WCB/Mcgraw Hill Publishers, 1998.

TABB, D. L.; SMITH, L. L.; BRECI, L. A.; WYSOCKI, V. H.; LIN, D.; YATES, J. R. Statistical characterization of ion trap tandem mass spectra from doubly charged tryptic peptides. **Analytical Chemistry,** v. 75, n. 5, p. 1155-1163, 2003.

TAHARA, E. B.; NAVARETE, F. D.; KOWALTOWSKI, A. J. Tissue, substrate, and site specific characteristics of mitochondrial reactive oxygen species generation. **Free Radical Biology & Medicine,** v. 46, n. 9, p. 1283-97, 2009.

TAUSZ, M.; SIRCELJ, H.; GRILL, D. The glutathione system as a stress marker in plant ecophysiology: is a stress-response concept valid? **Journal of Experimental Botany,** v. 55, n. 404, p. 1955-1962, 2004.

TONON, A. P. **Adaptação celular e molecular de *Gracilaria tenuistipitata* exposta a cádmio e cobre**. 2009. Departamento de bioquímica, Universidade de São Paulo, São Paulo.

TORRES, M. A. **Marcadores de estresse oxidativo em *Minutocellus polymorphus* sob exposição ao oxifluorfeno e ao benzo[a]pireno** 2008. 188 Departamento de Bioquímica, Universidade de São Paulo, São Paulo.

TORRES, M. A.; BARROS, M. P.; CAMPOS, S. C. G.; PINTO, E.; RAJAMANI, S.; SAYRE, R. T.; COLEPICOLO, P. Biochemical biomarkers in algae and marine pollution: A review. **Ecotoxicology and Environmental Safety,** v. 71, n. 1, p. 1-15, 2008.

TORREY, H. B. An unusual occurrence of *Dinoflagellata* on the California coast. **American Naturalist,** v. 36, p. 187-192, 1902.

VENKATARAMAN, L. V.; BECKER, E. W. **Biotechnology and utilization of algae: The Indian experience**. Bangalore: Sahrada Press, 1985.

VETTERLEIN, D.; WESENBERG, D.; NATHAN, P.; BRAUTIGAM, A.; SCHIERHORN, A.; MATTUSCH, J.; JAHN, R. Pteris vittata - Revisited: Uptake of As and its speciation, impact

of P, role of phytochelatins and S. **Environmental Pollution,** v. 157, n. 11, p. 3016-3024, 2009.

VIDOTTI, E. C.; ROLLEMBERG, M. D. C. E. Algas: da economia nos ambientes aquáticos à bioremediação e à química analítica. **Química nova,** v. 27, p. 139-145, 2004.

VOGELI-LANGE, R.; WAGNER, G. J. Subcellular localization of cadmium and cadmium-binding peptides in tobacco leaves : implication of a transport function for cadmium-binding peptides. **Plant Physiology,** v. 92, n. 4, p. 1086-1093, 1990.

VOGELILANGE, R.; WAGNER, G. J. Relationship between cadmium, glutathione and cadmium-binding peptides (phytochelatins) in leaves of intact tobacco seedlings. **Plant Science,** v. 114, n. 1, p. 11-18, 1996.

WAGNER, G. J.; DONALD, L. S. Accumulation of cadmium in crop plants and Its consequences to human health. In: (Ed.). **Advances in Agronomy**: Academic Press, v.Volume 51, 1993. p.173-212. ISBN 0065-2113.

WANG, J. S.; CHOU, H. N.; FAN, J. J.; CHEN, C. M. Uptake and transfer of high PCB concentrations from phytoplankton to aquatic biota. **Chemosphere,** v. 36, n. 6, p. 1201-1210, 1998.

WANG, S. W.; SHI, X. L. Molecular mechanisms of metal toxicity and carcinogenesis. **Molecular and Cellular Biochemistry,** v. 222, n. 1-2, p. 3-9, 2001.

WANG, W. X.; DEI, R. C. H. Effects of major nutrient additions on metal uptake in phytoplankton. **Environmental Pollution,** v. 111, n. 2, p. 233-240, 2001a.

WANG, W. X.; DEI, R. C. H. Metal uptake in a coastal diatom influenced by major nutrients (N, P, and Si). **Water Research,** v. 35, n. 1, p. 315-321, 2001b.

WOJCIK, M.; PAWLIKOWSKA-PAWLEGA, B.; TUKIENDORF, A. Physiological and ultrastructural changes in *Arabidopsis thaliana* as affected by changed GSH level and Cu excess. **Russian Journal of Plant Physiology,** v. 56, n. 6, p. 820-829, 2009.

WOLF, R.; HARDELAND, R.; BALZER, I. **Cell biological problems in chronobiology**. Goettingen: Hardeland, R., 1994.

YING, J.; CLAVREUL, N.; SETHURAMAN, M.; ADACHI, T.; COHEN, R. A. Thiol oxidation in signaling and response to stress: detection and quantification of physiological and pathophysiological thiol modifications. **Free Radical Biology and Medicine,** v. 43, n. 8, p. 1099-1108, 2007.

YOON, S. J.; YU, M. A.; PYUN, Y. R.; HWANG, J. K.; CHU, D. C.; JUNEJA, L. R.; MOURAO, P. A. The nontoxic mushroom *Auricularia auricula* contains a polysaccharide with anticoagulant activity mediated by antithrombin. **Thrombosis Research,** v. 112, n. 3, p. 151-8, 2003.

ZABLUDOWSKA, E.; KOWALSKA, J.; JEDYNAK, L.; WOJAS, S.; SKLODOWSKA, A.; ANTOSIEWICZ, D. M. Search for a plant for phytoremediation - What can we learn from field and hydroponic studies? **Chemosphere,** v. 77, n. 3, p. 301-307, 2009.

ZENK, M. H. Heavy metal detoxification in higher plants - A review. **Gene,** v. 179, n. 1, p. 21-30, 1996.