

Marthiellen Roosevelt de Lima Felix

ANÁLISE DO PERFIL METABÓLICO E DE PARÂMETROS FISIOLÓGICOS E ULTRAESTRUTURAIS DE *Pterocladia capillacea* (RHODOPHYTA, GELIDIALES) SOB CONDIÇÕES DE ESTRESSE POR CÁDMIO E GRADIENTES DE SALINIDADE

Orientadora: Profa. Dra.: Zenilda Laurita Bouzon
Co-orientador: Dr. Éder Carlos Schmidt

Dissertação apresentada no Programa de Pós-graduação em Biologia de Fungos, Algas e Plantas da Universidade Federal de Santa Catarina, para obtenção do Título de Mestre em Biologia de Fungos, Algas e Plantas.

Florianópolis
2014

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Felix, Marthiellen Roosevelt
ANÁLISE DO PERFIL METABÓLICO E DE PARÂMETROS FISIOLÓGICOS
E ULTRAESTRUTURAIS DE *Pterocliadiella capillacea*
(RHODOPHYTA, GELIDIALES) SOB CONDIÇÕES DE ESTRESSE POR
CÁDMIO E GRADIENTES DE SALINIDADE / Marthiellen Roosevelt
Felix ; orientador, Zenilda Laurita Bouzon ; co-
orientador, Éder Carlos Schmidt. - Florianópolis, SC, 2014.
43 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-
Graduação em Biologia Vegetal.

Inclui referências

1. Biologia Vegetal. 2. *Pterocliadiella capillacea*. 3.
cádmio. 4. Microscopia. 5. Metabolismo primário. I.
Laurita Bouzon, Zenilda. II. Carlos Schmidt, Éder. III.
Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-
Graduação em Biologia Vegetal. IV. Título.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à minha mãe, meu pai e meus irmãos pelo amor incondicional, por terem me aceitado em suas vidas como se eu tivesse sempre estado lá. Obrigada pela educação e todas as oportunidades que me foram dadas, **AMO VOCÊS!**

A todos meus amigos e companheiros dos laboratórios LAMAR atual LABCEV, não somente pelo auxílio profissional, mas também pelos momentos de diversão e estarem me dando apoio em muitos momentos importantes da minha vida, nessa nossa jornada juntos que começou em 2009 enquanto eu ainda era IC. Especialmente a Carmen, minha irmã de coração, sempre me aconselhando e estando ao meu lado para me acalmar e reconfortar. Luz K. que foi minha grande companheira de experimentos, tantas vezes me auxiliou e brigamos e choramos e que me ensinou que não importa nossas diferenças, somos amigas e ponto! Minhas gateiras Ticiane e Fernanda pelas risadas, passeios, cervejas, caipirinhas, melhor pararmos por aqui rsrs. Marianne nossa IC rapidez, foram muitas e muitas Pteros em nossas mãos, obrigada! Giulia minha amiga de graduação que mais uma tivemos oportunidades de estarmos juntas, grande amiga e conselheira. Rodrigo se não fosse você o que faria com aquela vidraria toda?! com quem eu conversaria quando não temos paciência para ler mais nada?! Obrigada pela sua amizade!

Ao prof. Marcelo Maraschin por disponibilizar seu laboratório para realização de diversas análises e pelo seu tempo dedicado a mim e ao meu projeto, principalmente nas análises de infravermelho.

A Fernanda Ramlov pelo auxílio nas extrações e determinações dos compostos antioxidantes, pelos auxílios nas análises estatísticas, pela tentativa de elaboração de protocolos juntamente com a Aline Pereira. Muito obrigada!

A professora Dra. Luciane C. Ouriques pela ajuda e carinho. Muito, Obrigado!

Agradeço aos funcionários do Laboratório Central de Microscopia Eletrônica (LCME), especialmente a Eliana Oliveira que sempre se disponibilizou a me ajudar e por sua amizade e carinho.

A prof^ª. Fungyi Chow por me receber e esta disponível para as análises, discussões elaboração do artigo, tenho grande admiração pelo seu empenho no desenvolvimento dos alunos. Prof^ª. foi uma honra

poder ter tido o “karma” de ter a senhora em minha vida! Muitíssimo obrigada!

Ao prof. Dr. Paulo Horta por sempre colaborar com suas ideias, de forma a melhorar minha visão profissional, sempre mostrando diferentes pontos de vista. Pela oportunidade de estar no projeto PNADB-CAPES (Programa nacional de apoio e desenvolvimento da botânica). Obrigada!

Aos meus orientadores Prof.^a Zenilda Laurita Bouzon e Dr. Éder Carlos Schmidt, pelo acolhimento, atenção e pela as horas de dedicação, ensinamentos e pelo suporte que me foi dado durante esses dois anos. A ambos tenho muito a agradecer, por todo o carinho, amizade e demonstração de confiança em meu trabalho, na minha capacidade.

Co obrigada por tudo, por tudo mesmo! Palavras são pequenas para expressar todo a minha gratidão pelas oportunidades, pelo seu tempo (finais de semana, feriados, e-mails e em laboratório), por todo seu empenho em me ajudar! Novamente Obrigada!

Ao PNADB – CAPES (Programa nacional de apoio e desenvolvimento da botânica) pelo apoio financeiro. Ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal: funcionários e professores.

RESUMO

O presente trabalho avaliou o efeito do metal cádmio sobre o metabolismo, fisiologia e ultraestrutura em *Pterocladia capillacea* cultivada em condições de laboratório sobre o sinergismo de três de salinidades (25, 35 e 45 ups) acrescidas de quatro concentrações de cloreto de cádmio (CdCl_2): 0 (controle), 0.17 ppm, 0.35 ppm e 0.70 ppm. Algas cultivadas em meio de cultivo acrescido de cádmio (Cd), tiveram redução na taxa de crescimento quando comparadas ao tratamento sem adição de metal. Entre os tratamentos de 25, 35 e 45 ups, em condição hipersalina a alga mostrou redução na taxa de crescimento e um provável desvio da rota metabólica, aumentando a produção de clorofila *a*. A adição de cádmio ao meio de cultivo também provocou redução na concentração de clorofila *a* dos tratamentos quando comparados aos controles, em 35 ups somente na maior concentração (0.70 ppm) foi detectada redução no conteúdo de clorofila *a*. A maior absorção e bioconcentração de Cd em todas as salinidades ocorreu na concentração de 0.17 ppm, sendo maior em 25 ups, em qualquer concentração de metal, do que em qualquer um de 35 ou 45 psu. Usando um modelo matemático, plantas cultivadas em 35 psu mostrou um modelo polinomial para os fatores de absorção e bioconcentração, enquanto que as plantas cultivadas em 25 e 45 psu exibiu um modelo linear. Análise da superfície das plantas, por microscopia eletrônica de varredura, mostraram que plantas cultivadas em Cd apresentaram alterações na superfície quando comparadas ao controle. A microanálise de raio-x mostrou presença do metal na superfície do talo, das plantas tratadas com cádmio e redução no conteúdo de carbono na maior concentração nas três salinidades, o que pode estar relacionado a menor taxa de crescimento. Na análise de ultraestrutura cultivadas a 35 e 45 psu, apresentaram precipitados eletrônicos e cloroplastos mostrou mudanças na organização ultraestrutural com morfologia irregular, nos tratamentos com acréscimo de cádmio. Os tratamentos com cádmio também apresentaram alterações no perfil metabólico de lipídios e carboidratos.

Palavras-chave: *Pterocladia capillacea*, cádmio, absorção, bioconcentração, pigmentos, microscopia e infravermelho.

ABSTRACT

The present work evaluated the effect of cadmium metal on the metabolism, physiology and ultrastructure in *Pterocladia capillacea* grown in laboratory conditions on the synergism of three salinities (25, 35 and 45 ups) plus four concentrations of cadmium chloride (CdCl_2): 0 (control), 0.17 ppm, 0.35 ppm and 0.70 ppm. Algae grown in culture medium supplemented with cadmium (Cd), had a reduction in growth rate when compared to the treatment without addition of metal. Algae grown in culture medium supplemented with cadmium (Cd), had a reduction in growth rate when compared to the treatment without addition of metal. Among the treatments of 25, 35 and 45 ups, on condition hypersalina the alga showed a reduction in growth rate and a probable deviation of metabolic pathway, increasing the production of chlorophyll *a*. The addition of cadmium to the culture medium also caused reduction in the concentration of chlorophyll *a* of treatments when compared to controls, in 35 ups only in higher concentration (0.70 ppm) was detected reduction in the content of chlorophyll *a*. The greater absorption and bioconcentration of Cd in all salinities occurred in concentration of 0.17PPM, being higher in 25 ups, at any concentration of metal, than in any one of 35 or 45 psu. Using a mathematical model, plants grown in 35 psu showed a polynomial model for the factors of absorption and bioconcentration, while that the plants grown in 25 and 45 psu exhibited a linear model. Analysis of thermo plants, by scanning electron microscopy, showed that plants grown in Cd showed changes in surface when compared to control. The x-ray microanalysis showed presence of metal on the surface of the thallus, plants treated with cadmium and reduction in carbon content in higher concentration in three salinities, which could be related to the lower rate of growth. In the analysis of ultrastructure grown at 35 and 45 psu, presented precipitated electron dense and chloroplasts showed changes in ultrastructural organization with irregular morphology. Metabolic Profile showed changes in the metabolism of lipids and carbohydrates.

Keywords: *Pterocladia capillacea*, cadmium absorption, bioconcentration, pigments, microscopy and infrared spectroscopy.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Morfologia *Pterocladiaella capillacea*. **A-** Talo de *P.capillacea*. **B** – Corte transversal, mostrando células corticais C, células subcorticais SC e rizines (setas) Fonte: Smithsonian Tropical Research Institute's).....12

Figura 2: Local de coleta dos espécimes. **A-** Ilha de Santa Catarina. **B-** Ponta das Campanhas, praia da Armação. **C-E** – Costão de coleta. **D-** Algas expostas durante a maré baixa.....20

Figura 3: Desenho experimental. Colunas representam salinidades em que as algas foram cultivadas e linhas as concentrações de cádmio. Cada tratamento foi realizado em quadruplicata (n=4).....21

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	10
1.1	<i>Algas</i>	10
1.2	<i>Pterocladiaella capillacea (S.G.Gmelin) Santelices e Hommersand</i>	11
1.3	<i>Metais Pesados</i>	12
1.4	<i>Cádmio</i>	13
1.5	<i>Metais e plantas</i>	14
1.6	<i>Salinidade e metais pesados</i>	17
2	JUSTIFICATIVA	18
3	OBJETIVOS	19
3.1	Objetivos gerais	19
3.2	Objetivos específicos	19
4	Material e Métodos	20
4.1	Coleta e processamento do material biológico	20
4.2	Desenho experimental	21
4.3	Análise das taxas de crescimento	21
4.4	Conteúdo de cádmio	22
4.5	Extração e dosagem dos pigmentos fotossintetizantes	22
4.6	Flavonóides totais	23
4.7	Perfil metabólico por espectroscopia vibracional de infravermelho médio com transformada de Fourier (IR)	23
4.8	Processamentos para análise em microscopia	23
4.8.1	<i>Microscopia eletrônica de varredura (MEV)</i>	24
4.8.2	<i>Microscopia eletrônica de transmissão (MET)</i>	24
4.8.3	Análise e interpretação dos dados	24
	CAPITULO 1	
	The effect of cadmium under different salinity conditions on the cellular architecture and metabolism in the red alga <i>Pterocladiaella capillacea</i>	26
5	DISCUSSÃO	27
6	CONCLUSÃO	32
	REFERÊNCIAS	33

1. INTRODUÇÃO

1.1 Algas

Segundo Horta (2000 *apud* Cabral *et al.*, 2011) as algas são os organismos aquáticos mais antigos do planeta, havendo evidências de sua existência no período pré-cambriano (3,5 bilhões de anos, aproximadamente). Por serem organismos fotossintetizantes, foram responsáveis pela estruturação da atmosfera terrestre, possibilitando a vida de todos os seres vivos aeróbicos sobre a superfície do planeta, pela produção de oxigênio molecular e a consequente formação da camada de ozônio que filtra raios ultravioleta (UV). O termo alga é utilizado para designar um grupo heterogêneo de organismos que possuem clorofila *a* e corpo não diferenciado em raiz, caule e folha, denominado talo. As algas podem apresentar talos microscópicos, que só podem ser observados com auxílio de um microscópio, ou talos macroscópicos que podem ser observados a “olho nu” (Grahan *et al.*, 2009; Paula *et al.*, 2007).

Estes organismos podem ser encontrados em diversos ambientes, mas a maioria das espécies conhecidas é aquática, e ocorrem em águas com variados graus de salinidade. Do ponto de vista taxonômico, as algas são polifiléticas, isto é, constituídas por organismos com diferentes origens (Gonçalves, 2010). No ambiente aquático, as algas podem fazer parte dos bentos (sésseis ao substrato) ou plâncton (indivíduos suspensos na água).

As algas são de grande importância nos ambientes marinhos por serem os produtores primários dos oceanos e, desta maneira, compõem a biomassa e determinam a produtividade primária para os demais elos da cadeia trófica (Norton *et al.*, 1996). São alimentos para os herbívoros, onívoros e os detritívoros, como também constituem uma área de berçário e habitat para peixes e invertebrados (Lippert *et al.*, 2001).

Nas últimas décadas, grande importância econômica foi atribuída às macroalgas marinhas devido aos seus compostos de parede celular, por exemplo: alginatos, agaranas, caragenanas. Esses polissacarídeos são utilizados em setores economicamente importantes, como nas indústrias alimentícia e farmacêutica, apresentando alto potencial biotecnológico e despertando interesse mundial, devido ao seu alto valor econômico (De Ruiter e Rudolph, 1997). Nas algas, os ficocolóides promovem flexibilidade, crescimento e proteção (McHugh, 2003).

As rodófitas compreendem cerca de 4.000 espécies, superando as clorófitas e ocrófitas juntas. São consideradas, por alguns pesquisadores, as mais vistosas e delicadas, em geral, com dimensões menores (Prescott, 1969). Em águas frias, atingem tamanhos maiores, porém menor abundância, enquanto em águas tropicais são mais numerosas, com talos menores e filamentosos. Geralmente crescem presas a rochas ou sobre outras algas (Raven *et al.*, 1996). Podem ocorrer a profundidades de até 200m, possivelmente em virtude dos pigmentos acessórios da fotossíntese (Lee, 2008). Apesar de conhecidas como algas vermelhas, sua coloração pode variar, devido à presença de pigmentos como ficobilinas, ficocianinas (azuis), ficoeritrinas (vermelha) e carotenóides (amarelo). Em sua maioria são marinhas, com alguns representantes de água doce. Em seu ciclo de vida as rodófitas são caracterizadas pela ausência completa de flagelos. Como substância reserva, acumulam amido das florídeas, que se encontra livre no citoplasma. Os cloroplastos apresentam formas discóides ou de fita e são numerosos, e os tilacóides não formam grana sendo paralelos e isolados (Oliveira, 2003). A parede celular das rodófitas caracteriza-se por ser mais flexível do que em outros grupos de algas e plantas, pois além de um esqueleto de celulose esse grupo apresenta a parede impregnada por polímeros de galactanas e mucilagens, que podem ser mais abundantes que o conteúdo de celulose. Alguns grupos como a família Corallinacea podem depositar carbonatos de cálcio e de magnésio em sua parede celular (Graham *et al.*, 2009).

1.2 *Pterocliadiella capillacea* (S.G.Gmelin) Santelices e Hommersand

Dentre as várias espécies de algas vermelhas com relevância ecológica e econômica o gênero *Pterocliadiella* (Rhodophyta, Gelidiales) é um dos mais importantes. *Pterocliadiella* foi descrito a partir do gênero *Pterocliadia* (Perrone *et al.*, 2006), agrupa onze espécies (Millar e Freshwater, 2005), algumas sendo utilizadas na alimentação e na produção de ágar principalmente em países como Coreia e Japão (Boo *et al.*, 2010.). Assim como a maioria das algas vermelhas apresenta ciclo de vida trifásico, envolvendo alternância de geração de gametófitos, carposporófitos e tetrasporófitos.

A espécie *Pterocliadiella capillacea* (Figura 1A) apresenta ampla distribuição no litoral brasileiro, ocorrendo desde o Estado do Espírito

Santo até o litoral de Rio Grande do Sul. Esta espécie apresenta um talo cartilaginoso e muito ramificado, com 4 a 20 cm de comprimento e 2 mm de espessura, que se fixa ao substrato por intermédio de pequenos rizóides de onde partem ramos eretos ligeiramente achatados próximos a base, e na região apical são fortemente achatados (Boo *et al.*, 2010; Xia *et al.*, 2004). Em corte transversal é possível observar a região cortiçal (C) com duas camadas de células pequenas e pigmentadas, a região subcortical (SC) com 3 a 4 camadas de células maiores e região medular com grandes células, entremeadas por rizines (Figura 1B) (Santelices e Hommersand, 1997). Esta espécie é produtora de agarana e também é utilizada na dieta humana na Coreia e Japão (Boo *et al.*, 2010).

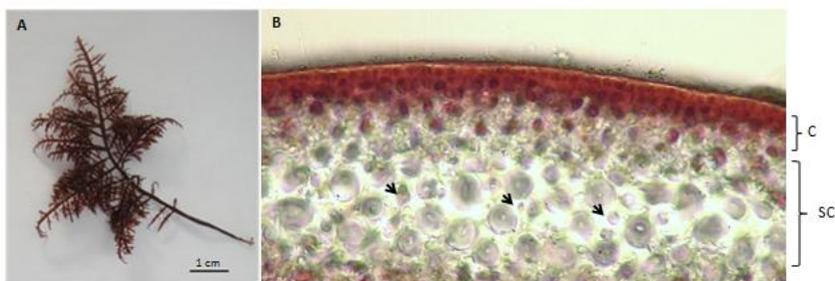


Figura 1. Morfologia *Pterocladia capillacea*. **A** - Talo de *P. capillacea*. **B** - Corte transversal, mostrando células corticais C, células subcorticais SC e rizines (setas) (Fonte: Smithsonian Tropical Research Institute's).

1.3 Metais Pesados

Metais ocorrem naturalmente no meio ambiente. São elementos de origem mineral e componentes essenciais dos ecossistemas globais, sendo encontrados no ambiente em diferentes estados de oxidação e número de coordenação, e essas diferenças estão relacionadas com a sua toxicidade. O termo metal pesado é utilizado para os elementos metálicos com densidade atômica maior que 4g/cm^3 . Os metais pesados também são elementos que ocorrem naturalmente na crosta terrestre e são persistentes contaminantes ambientais, uma vez que não podem ser degradados ou destruídos. O arsênio, cádmio, cromo, cobre, níquel, chumbo e mercúrio são metais pesados poluentes mais comuns; destes, o mercúrio e cádmio são de grande preocupação ambiental (Duruibe *et al.*, 2007).

O aumento da carga de metais pesados no ambiente na forma tóxica deve-se principalmente à ação antropogênica como o aumento da atividade industrial, da mineração, da emissão de efluentes domésticos, das atividades náuticas, do escoamento fungicida agrícola, e dos depósitos de lixo doméstico (McLaughlin, 1999). A presença de metais muitas vezes está associada à localização geográfica, seja na água ou no solo, e pode ser controlada, limitando-se o uso de produtos agrícolas e proibindo a produção de alimentos em solos contaminados com metais pesados. Podemos classificar os metais em: (i) elementos essenciais: sódio, potássio, cálcio, ferro, zinco, cobre, níquel e magnésio; (ii) microcontaminantes ambientais: arsênio, chumbo, cádmio, mercúrio, alumínio, titânio, estanho e tungstênio; (iii) elementos essenciais e simultaneamente microcontaminantes: cromo, zinco, ferro, cobalto, manganês e níquel (Instituto de Ciências Biomédicas, ICB – USP,2013).

1.4 Cádmio

Segundo a Organização Mundial da Saúde (World Health Organization, 2010) o cádmio é um metal encontrado na natureza associado a sulfetos de minérios de zinco, cobre e chumbo. As fontes naturais de cádmio na atmosfera são de atividade vulcânica, erosão de rochas sedimentares e fosfáticas e também de incêndios florestais. Segundo a Companhia Ambiental do Estado de São Paulo (CETESB, 2012) determinados sais e complexos de cádmio são solúveis e apresentam significativa mobilidade na água, enquanto que as formas não solúveis ou adsorvidas ao sedimento apresentam pouca mobilidade. O alimento é a principal fonte de exposição ao cádmio para a população geral e não fumante (World Health Organization, 2010).

Segundo Fasset (1975), a preocupação com cádmio como um contaminante ambiental era recente, e embora as propriedades tóxicas já fossem conhecidas há mais de cem anos, o uso desse metal era pequeno, principalmente como pigmento. A Alemanha foi o primeiro país a utilizar o cádmio para aplicações industriais até a Primeira Guerra Mundial. As primeiras baterias de níquel-cádmio foram desenvolvidas no início do século XX. No entanto, o uso de cádmio mais significativo foi como um revestimento de proteção do ferro e aço contra a corrosão. Atualmente, o cádmio é utilizado na fabricação de baterias, chips, televisores, pigmentos, como estabilizadores para retardar os processos

de degradação em cloreto de polivinila (PVC). Em humanos, estudos bioquímicos e toxicológicos mostraram que mesmo em pequenas quantidades, o cádmio absorvido pelo organismo humano tende a ser mantido por um longo período e podem provocar doenças pulmonares, renais e câncer (Fasset, 1975; Jarup, 2002).

O estudo de Tureck *et al.*, (2006) detectaram concentrações de cádmio de até 3,08 ppm em tecidos de moluscos cultivados na Baía da Babitonga, e concentrações de até 0,21 ppm na água em São Francisco do Sul, litoral norte de Santa Catarina. O aumento das concentrações nos tecidos das ostras coincidiu com os meses de salinidade baixa, sendo que esse fator pode aumentar a taxa de assimilação de Cd em organismos marinhos. Ferreira (2009) detectou valores de cádmio na Baía de Sepetiba no Rio de Janeiro variando de 0,0001 a 0,0113 ppm. Segundo a Resolução do Conselho Nacional do Meio Ambiente, CONAMA N.º 003, de 5 de junho de 1984, para ser considerada como área destinada à proteção das comunidades aquáticas e à criação natural e/ou intensiva (Aquicultura) de espécies destinadas à alimentação humana, a concentração máxima de cádmio na água deve ser de 0,005 ppm.

1.5 Metais e plantas

As plantas, assim como outros organismos, possuem diferentes mecanismos fisiológicos para manter concentrações de metais pesados considerados essenciais e minimizar a exposição aos metais pesados não essenciais (Manara, 2012). O aumento gradativo das ações industriais nos últimos anos promoveu a poluição de águas estuarinas, rios, lagos e águas costeiras com grandes impactos sociais e econômicos. Segundo Clemens (2006), não existe uma correlação entre teor de metais do solo e teor de metais presentes nas plantas, devido principalmente à solubilidade do metal no solo e/ou água, por exemplo, o metal chumbo (Pb), que pode localmente se apresentar em enormes quantidades e ser pouco absorvido pelas plantas, devido à baixa solubilidade e forte interação com as partículas do solo. Em algas, diversos fatores abióticos podem influenciar a taxa de absorção do metal, como por exemplo: temperatura, salinidade, pH, concentração do metal e fotoperíodo.

Do ponto de vista ecotoxicológico, as algas têm dois usos importantes nas pesquisas realizadas com metais pesados: um de biorremediador e outro, de bioindicador. A capacidade de acumular íons

metálicos depende da capacidade intrínseca da espécie de alga e das espécies metálicas consideradas. Isso porque as superfícies das células das algas apresentam, em geral, grande afinidade pelos íons metálicos. O desempenho das algas como sorventes biológicos depende, ainda, da quantidade de biomassa, do pH da solução e da cinética da reação, além de outros fatores, como a competição pelos sítios de ligação. No que tange à biorremediação, muitas algas possuem a capacidade de produzir quelatinas para realizar a detoxificação dos metais pesados (Küpper, 2002), o que poderia ser uma das causas da sobrevivência destes organismos nestes ambientes (Hu *et al.*, 1996). A utilização de algas na bioadsorção de metais pesados com o intuito de retirá-los dos ambientes marinhos vem sendo estudada (Hamdy, 2000; Andrade *et al.*, 2002; Sheng, 2004; Oliveira *et al.*, 2005; Calfa e Torem, 2007; He *et al.*, 2008).

As algas marinhas são utilizadas como biomassa para bioadsorção, pois apresentam um custo baixo em relação a outras técnicas (Calfa e Torem, 2007). As paredes celulares das algas marinhas possuem uma alta capacidade em bioadsorver metais pesados em baixa concentração nos efluentes líquidos industriais (Amado-Filho *et al.*, 1997). Ahalya *et al.* (2003) afirmam que a presença de grupos carboxilas e sulfatos presentes na parede celular de algumas algas permitem o sequestro e precipitação de metais pesados na parede celular. Alessandretti *et al.* (2005) denotam que frequentemente as paredes celulares das algas são porosas, o que facilita a entrada de íons metálicos. Os íons metálicos em meios aquosos, ligam-se a complexos orgânicos como citratos e aminoácidos, e desta forma passam pelas membranas biológicas (Alessandretti *et al.*, 2005).

No que se refere ao uso de algas como bioindicador, Malea e Haritonidis (1999) evidenciaram que *Gracilaria verrucosa* (Hudson) Papenfuss no Golfo de Thermaikos, Grécia, apresentou variações nas quantidades de metais pesados em seus tecidos conforme variação da concentração presente no ambiente. As Rhodophyta, portanto, podem servir de biomonitorios por acumularem estas substâncias (Domouhtsidou e Dimitiadis., 2000; Küpper, 2002), uma vez que são ricas em ágar e carragenana, apresentando uma grande capacidade de sequestrar íons metálicos (Hamdy, 2000; Hashim e Chu, 2004). Desta forma, o fato das algas servirem de produtores para muitas cadeias alimentares pode auxiliar na contaminação de outros organismos (Roberts *et al.*, 2006). Em um estudo realizado com *Gracilaria*

tenuistipitata (C.F.Chang e B.M.Xia), foi observado que esta espécie, por estar em regiões costeiras, é uma das que mais acumula metais pesados como o cádmio, sendo este um dos metais pesados de maiores perigos de toxicidade para organismos aquáticos (Hu *et al.*, 1996). Estudos de bioadsorção de cádmio mostraram que algas vermelhas tais como: *G. edulis* (S.G.Gmelin) P.C.Silva, *G. Changii* (B.M.Xia e I.A.Abbott) I.A.Abbott, J.Zhang e B.M.Xia, *G. salicornia* (C.Agardh) E.Y.Dawson e *Laurencia obtusa* (Hudson) J.V.Lamouroux são eficientes na absorção de cádmio, porém menos eficientes que algumas algas pardas como *Sargassum siliquosum* J.Agardh e *S. Asperifolium* Hering e G.Martens ex J.Agardh (Hamdy, 2000; Hashim *et al.*, 2004). Bouzon *et al.* (2012) observaram aumento na parede celular, acumulação de plastoglobuli e destruição da organização interna dos cloroplastos, e redução no conteúdo de pigmentos fotossintéticos de *Hypnea musciformis* (Wulfen) J. V. Lamouroux após 7 dias de tratamento em cádmio. Respostas semelhantes foram observadas por Gouveia *et al.* (2013) no trabalho realizado com *Gracilaria domingensis* (Kützting) Sonder ex Dickie sob condições de estresse por cobre e chumbo; além disso, houve redução na atividade mitocondrial da NADH desidrogenase. Santos *et al.* (2012) constataram redução na performance fotossintética e na taxa de transporte de elétrons, e aumento na atividade da glutatona redutase em *Gracilaria domingensis* após exposição ao cádmio. O estudo realizado por Amado Filho *et al.* (1997) verificaram redução na taxa de crescimento, acumulação de zinco na alga proporcional ao aumento da concentração de metal na água e depósitos de zinco em diferentes camadas da parede celular de *Padina gymnospora* (Kützting) Sonder. Andrade *et al.* (2004) investigaram o efeito do cobre sobre a ultraestrutura da Chlorophyta *Enteromorpha flexuosa* (Wulfen) J.Agardh, onde observou destruição dos cloroplastos, vacuolização do citoplasma e presença de várias pequenas vesículas associadas aos corpos de Golgi, que também se apresentou alterado quando comparado ao controle.

O cádmio é um contaminante ambiental com alto potencial para bioacumulação e com grande persistência no corpo de organismos aquáticos. Níveis tóxicos deste elemento podem levar à desnaturação de proteínas e ao estresse oxidativo, resultando em danos às membranas, redução na atividade enzimática e fotossíntese, dentre várias outras mudanças metabólicas. Organismos fotossintéticos reduzem a concentração de EROS através de enzimas como a superóxido

dismutase (SOD), catalase (CAT), e ascorbato peroxidase (APX) e de componentes de baixo peso molecular como ascorbato, glutatona, fitoquelatinas, flavonoides e carotenoides (Collén *et al.*, 2003; Gratão *et al.*, 2005).

1.6 Salinidade e metais pesados

Crescimento e distribuição de algas marinhas são controlados principalmente pela luz, temperatura, nutrientes, o movimento da água e salinidade. Salinidade é tipicamente um local, em vez de um global, parâmetro e é altamente variável em regiões costeiras, especialmente nas zonas entre marés, estuários e piscinas naturais (Kirst, 1989). A principal forma dos elementos metálicos acumulados por organismos aquáticos são os íons livres, e alterações em variáveis como salinidade, pH e temperatura pode conduzir a um aumento na proporção de concentrações de íons livres, tendo como consequência aumento da toxicidade do metal. Neste sentido, espera-se que as respostas de toxicidade de um organismo submetido a condições marinhas normais (30-35 psu) se diferem daquelas cultivadas em condições de salinidade mais baixa ou alta (Oh *et al.*, 2012).

Segundo Mamboya *et al.*, (2009) ao se comparar níveis de poluição por metais pesados em duas áreas diferentes, usando algas como bioindicadores, devem ser realizadas medições de salinidade e os possíveis efeitos da salinidade deve ser considerada ao avaliar os dados. Fritioff *et al.* (2004) investigaram o efeito da temperatura e salinidade na taxa de absorção em *Elodea canadensis* (Michx) e *Potamogeton natans* (Linnaeus), a taxa de absorção dos metais submetidos a alta temperatura ou baixa salinidade foi o dobro daqueles tratados em baixa temperatura e/ou salinidade elevada. De acordo com Connan e Stengel (2011), a salinidade reduzida pode aumentar toxicidade do cobre sobre a fisiologia das macroalgas pardas *Ascophyllum nodosum* (Linnaeus) Le Jolis e *Fucus vesiculosus* (Linnaeus) em um curto intervalo do tempo. A absorção de cobre pela alga verde *Ulva reticulata* (Forsskål) foi maior em tratamentos submetidos às salinidades mais baixas (Mamboya *et al.*, 2009).

2. JUSTIFICATIVA

Considerando que os metais pesados são continuamente lançados no ambiente aquático por via natural ou por via antrópica, desta forma podem causar efeitos tóxicos nos diferentes organismos e no ecossistema, e que as algas representam um importante elo na cadeia alimentar podendo representar vias críticas de transferência desses elementos para o ser humano, propomos analisar o efeito do cádmio, de forma isolada e interativa, sobre a arquitetura celular e fisiologia da macroalga *P. capillacea*. Desta forma foi possível verificar as alterações bioquímicas, fisiológicas e morfológicas e decorrentes da exposição a cádmio. O presente trabalho fornecerá, também, como parâmetros para possíveis cultivos de *P. capillacea*, bem como fonte de dados para outras pesquisas relacionadas à ultraestrutura, bioquímica e a fisiologia de algas com os tratamentos acima citados. Com os antecedentes descritos, o presente amplia os conhecimentos nas alterações em *P. capillacea*, alga de importância econômica e ecológica, fonte de ficocolóides amplamente utilizados na indústria alimentícia e de cosméticos. Consequentemente, esse trabalho visa à produção de um modelo de estudo com *P. capillacea* tendo em vista os escassos conhecimentos referentes às alterações celulares decorrentes de impactos ambientais por metais pesados.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivos Gerais

➤ Avaliar o efeito dos possíveis efeitos biológicos de cádmio (metal pesado) e salinidade na bioquímica (i.e., perfil metabólico), na fisiologia, na morfologia e na organização celular da macroalga produtora de agar *P. capillacea*, analisando os efeitos *in vitro*.

3.2. Objetivos Específicos

- Determinar as taxa de crescimento de *P. capillacea* após o cultivo com as diferentes salinidades e concentrações de cádmio;
- Analisar as alterações ultraestruturais causadas por cádmio nas porções vegetativas de *P. capillacea*, em especial na organização de cloroplastos e mitocôndrias;
- Avaliar as alterações na parede celular das algas expostas aos tratamentos através da Microscopia Eletrônica de Transmissão e de Varredura;
- Detectar a presença de cádmio e alterações na composição da parede celular através da microscopia eletrônica de varredura e microanálises;
- Determinar as concentrações dos pigmentos fotossintetizantes (clorofila *a*, ficobiliproteínas e flavonóides);
- Analisar a capacidade de bioacumulação de cádmio em *P. capillacea*;
- Elaborar modelos matemáticos para absorção em diferentes salinidades;
- Comparar o perfil metabólico via espectroscopia vibracional de infravermelho médio com transformada de Fourier (FTIR), com ênfase em compostos lipídicos, protéicos, glicídicos (amido) e fenólicos.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Coleta e processamento do material biológico

Os espécimes de *P. capillacea* foram coletados na praia da Armação (27°44'42"S, 48°30'27"W) localizada na costa sudeste da Ilha de Santa Catarina (Figura 2). As algas foram coletadas em dezembro de 2012 e em janeiro e fevereiro de 2013, e transportadas para o Laboratório de Biologia Celular Vegetal (LABCEV), da UFSC em caixas de isopor, no escuro de forma a evitar que ocorra fotooxidação. Os experimentos foram repetidos oito vezes para obtenção de biomassa para as diferentes análises. No laboratório foram triadas e limpas de forma a remover epífitas e pequenos crustáceos. No laboratório as algas foram limpas em água do mar filtrada e esterilizada. Porções apicais saudáveis foram selecionadas e cultivadas em água do mar, acrescida de meio von Stosch (50%; Edwards, 1970) durante 14 dias em condições controladas: temperatura de $24 \pm 2^\circ\text{C}$, com salinidade de 35 ups (unidade padrão de salinidade), aeração constante, irradiância de $80 \pm 10 \mu\text{mol f\u00f3tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ (l\u00e2mpadas fluorescentes, Philips C-5 Super 84 16W/840), e fotoper\u00edodo de 12 horas, iniciando as 8h.

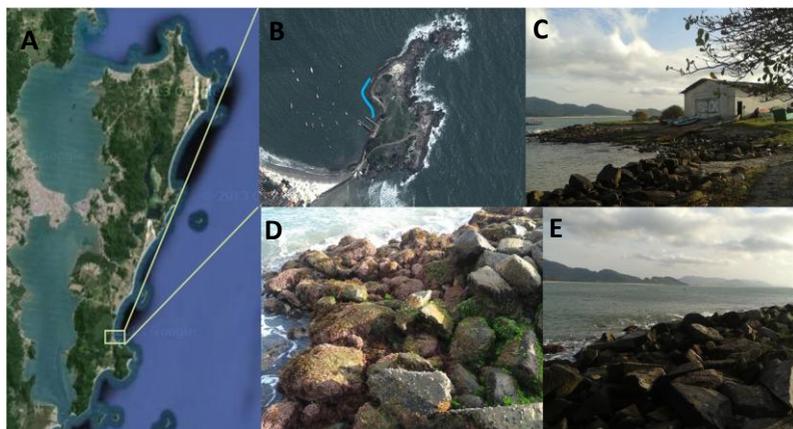


Figura 2- Local de coleta dos espécimes. **A-** Ilha de Santa Catarina. **B-** Ponta das Campanhas, praia da Armação. **C-E** – Cost\u00e3o de coleta. **D-** Algas expostas durante a mar\u00e9 baixa.

4.2 Desenho experimental

Após o período de limpeza e aclimação porções de aproximadamente 1.0g de *P. capillacea* foram cultivados em frascos do tipo Erlenmeyer de 500mL contendo água do mar acrescida meio von Stosch 50% (Edwards, 1970; sem ácido etilenodiamino tetra-acético - EDTA) e concentrações crescentes de cloreto de cádmio (CdCl_2): 0 (controle), 0,17, 0,35, 0,70, 1,4, 2,8, 5,6, e 11,2 ppm, nas mesmas condições de cultivo descritas na aclimação. O efeito do cádmio sobre as algas foi letal após 7 dias cultivo na concentração de 1,4 ppm que provocou a redução acima 50% na taxa de crescimento, branqueamento e despigmentação, quando comparada ao controle. Os experimentos subsequentes foram realizados em salinidades de 25, 35 e 45 ups nas concentrações de 0 (controle), 0,17,0,35, e 0,70 ppm, totalizando 12 tratamentos, conduzidos em quadruplicata (Figura 3).



Figura 3- Desenho experimental. Colunas representam salinidades em que as algas foram cultivadas e linhas as concentrações de cádmio. Cada tratamento foi realizado em quadruplicata (n=4).

4.3 Análise das taxas de crescimento

As taxas de crescimento (Tcs) de *P. capillacea* foram avaliadas através de medidas de peso da matéria fresca calculada através da equação de Lignell e Pedersén (1989):

$$Tc \text{ [\% dia}^{-1}\text{]} = [(P_f/P_i)^{1/t} - 1] \times 100.$$

Onde P_f é o peso final; P_i é o peso inicial; t é a quantidade de dias em que o experimento foi conduzido (7 dias).

4.4 Conteúdo de cádmio

As concentrações de cádmio na água e na alga (inicial e final) foram analisadas por espectrometria induzida por emissão atômica por plasma acoplado (Spectro ARCOS ICP-OES; SPECTRO Analytical Instruments GmbH, Germany), através de um reagente de grau analítico Cd 214.2438 nm, com limite de detecção de 0,001 ppm. As amostras de alga de aproximadamente 300 mg foram lavadas em água destilada, secas a 65°C e digeridas em ácido nítrico. As amostras de água (50 mL) foram digeridas usando ácido nítrico. A absorção total de cádmio foi expressa em % de mg de cádmio em 500 mL de água do mar, e mg de cádmio presente em 750mg de peso úmido de alga. O fator de bioconcentração foi calculado com a concentração de metal presente na biomassa da planta dividida pela concentração inicial de cádmio presente do meio de cultura.

4.5 Extração e dosagem dos pigmentos fotossintetizantes

No final dos experimentos amostras com aproximadamente 1g de peso fresco de *P. capillacea* foram congeladas em nitrogênio líquido e mantidas a -40°C para análises posteriores de clorofila *a* e ficobiliproteínas, conforme protocolo estabelecido por Schmidt *et al.* (2010a). Clorofila *a* foi extraída em 3 mL de dimetilsulfóxido (DMS, Merck, Darmstadt, FRG) a 40°C, durante 30 minutos, com auxílio de um homogenizador de tecidos (Hiscox e Israelstam, 1979; Schmidt *et al.*, 2010b), e quantificada através de espectrofotômetro de UV/vis (Hitachi, Model 100-20; Hitachi, Co., Japão), de acordo com Wellburn (1994).

Para análise do conteúdo de ficobiliproteínas, as amostras foram trituradas em nitrogênio líquido até formar um pó, e a extração foi realizada em tampão fosfato 0,1M e pH 6,4, a 4°C no escuro. Os níveis de alofococianina (AFC), ficocianina (FC) e ficoeritrina foram determinados por espectrofotometria de UV/vis e calculados usando as equações de Kursar *et al.* (1983).

4.6 Flavonóides

Extratos foram obtidos da biomassa fresca (1g, n=4) de *P. capillacea* embebido em 10 ml de metanol 80%. Os extratos foram

filtrados através de membrana de celulose para remoção de partículas, e alíquotas de 2 mL foram centrifugadas por 5min a 4.000 rpm. O conteúdo total de flavonóide foi determinado pelo método colorimétrico com cloreto de alumínio (AlCl_3) (Zacarias *et al*, 2007). Alíquotas de 0,5mL do extrato foram adicionado a 2,5mL de etanol e 0,5mL em cloreto de alumínio hexahidratado ($\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), incubados em temperatura ambiente por 1h e a absorbância foi mensurada a 420 nm (Hitachi, Model 100-20). A quantificação de flavonóide foi calculada baseada na curva padrão de quercetina ($10 - 200 \mu\text{g mL}^{-1}$; $y = 0,010x$; $r^2 = 0,999$).

4.7 Perfil metabólico por espectroscopia vibracional de infravermelho médio com transformada de Fourier (IR)

Amostras de *P. capillacea* (1 g) foram secas a 45°C durante 24 h foram então maceradas em cadinho até formar pó e utilizadas para confeccionar pastilhas de brometo de potássio (KBr). Os espectros foram registrados entre $4,000 \text{ cm}^{-1}$ e 400 cm^{-1} , utilizando 64 varreduras com uma resolução de 4 cm^{-1} , por um espectrômetro Bomem (MB-100) com um detector DTGS. Um espectro padrão foi previamente adquirido, e as amostras (100 mg) foram espalhadas e medidas diretamente depois pressionando-os no cristal. Três réplicas (128 scans co-adicionados antes da transformada de Fourier) foram recolhidas para cada amostra, localizando, um total de 130 espectros. Os espectros foram normalizados, e a linha de base foi corrigida na região de interesse (3000 cm^{-1} a 600 cm^{-1}), traçando uma linha reta antes do melhoramento de resolução (k fator de 1,5), utilizando Fourier auto-deconvolution (Opus v 5.0, Bruker BioSpin, Alemanha).

4.8 Processamentos para análise em microscopia

O processamento do material foi realizado no LABCEV e quando necessário no Laboratório Central de Microscopia Eletrônica (LCME). O processamento do material para microscopia eletrônica de transmissão (MET) e varredura (MEV) foi realizado segundo os protocolos estabelecidos por Bouzon e Schmidt (2012).

4.8.1 Microscopia eletrônico de varredura (MEV)

Por observação ao microscópio eletrônico de varredura (MEV), as amostras de cerca de 5 mm de comprimento foram fixados durante a noite com 2,5% de glutaraldeído em tampão de cacodilato de sódio 0,1M (pH 7,2) acrescido de 0,2 M de sacarose. As amostras foram desidratadas em séries crescentes de etanol e secas sobre o ponto crítico EM-DPC-030 (Leica, Heidelberg, Alemanha) e em seguida revestido com ouro antes da análise, segundo Schmidt *et al.* (2012b). As amostras foram examinadas no MEV JSM 6390 LV (JEOL Ltd., Tóquio, Japão, em 10 kV). A presença de cádmio na parede celular foi verificada usando SEM (NORAN System 7, Thermo Scientific Instruments) acoplada a uma energia dispersiva de raios-X espectrômetro (SEM-EDX), sem a pós-fixação das amostras em tetróxido de ósmio e revestido com ouro.

4.8.2 Microscopia eletrônica de transmissão (MET)

O procedimento de fixação para observações no MET foi idêntico aos utilizados para MEV. Na fixação para microscopia de transmissão, no entanto, o material foi pós-fixado com tetróxido de ósmio a 1% durante 4 horas, desidratados em séries crescentes de acetona, e embebidas em resina de Spurr. As secções ultrafinas foram contrastadas com acetato de uranila aquoso seguido por citrato de chumbo. Quatro réplicas foram feitas para cada grupo experimental, duas amostras por replicas foram então examinadas sob MET JEM 1011 (JEOL Ltd., Tóquio, Japão, a 80 kV).

4.8.3 Análise e interpretação dos dados

Os dados foram analisados por análise de variância bifatorial (ANOVA) e teste *a posteriori* de Tukey. Análises de variância unifatorial (ANOVAs) foram também realizadas a fim de avaliar o efeito da salinidade isolado ou cádmio, e em seguida comparadas pelo teste de Tukey *a posteriori*. Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando o pacote de software Statística (versão 10.0), considerando $p \leq 0,05$. Para efeito da análise quimiométrica, foi considerada a janela espectral de interesse ($3000-600 \text{ cm}^{-1}$), a correção da linha de base, a normalização e deconvolução dos espectros, que

foram processados com auxílio do programa OPUS v 5.0 (Bruker BioSpin).

CAPITULO 1

The effect of cadmium under different salinity conditions on the cellular architecture and metabolism in the red alga *Pterocladia capillacea*.

Efeito do cádmio em diferentes condições de salinidades sobre a arquitetura e metabolismo da alga vermelha *Pterocladia capillacea*.

5 DISCUSSÃO

No presente estudo foi constatado que os espécimes de *Pterocladia capillacea* expostos a três concentrações de cádmio (0,17, 0,35 e 0,70 ppm), cultivados com salinidades de 25, 35 e 45 ups durante 7 dias mostraram diferentes mecanismos de resposta ao cádmio, ao estresse salino e a interação entre estes.

As plantas cultivadas sem adição de metal nas salinidades de 25 e 35 ups não apresentaram diferenças significativas nas taxas de crescimento (TCs, 2,93% dia⁻¹ e 3,55% dia⁻¹, respectivamente). No entanto, quando cultivada a 45 ups houve uma redução significativa nas taxas de crescimento (2,09% dia⁻¹), demonstrando que a espécie é mais sensível a altas salinidades. Alterações na salinidade podem alterar a pressão de turgescência e levar a gasto maior de energia para manter a turgescência osmótica e preservar a integridade celular (Kirst, 1990). Apesar das diferenças observadas nas taxas de crescimento não terem sido significativas estatisticamente entre 25 e 35 ups, sem adição de metal, foi observado uma tendência de diminuição em 25 ups. Provavelmente, se o experimento fosse mantido por um período mais longo a integridade fisiológica e celular poderia ser comprometida.

Esta capacidade de tolerar baixas salinidades pode estar relacionada com a condição ambiental característica da localidade em que a alga foi coletada, nesta região há precipitação por períodos constantes. Taxas de crescimento baixas também foram relatado por Yokoya e Oliveira (1992) para *Gracilaria verrucosa*, *Gracilaria* sp., *Hypnea cornuta*, *H. musciformis*, *Meristiella echinocarpa*, e *Pterocladia capillacea* quando cultivadas em 40-60 ups, onde as as melhores taxas de crescimento, para estas espécies, foram observadas quando cultivadas entre 30-35, com variações entre as espécies.

O cádmio teve efeito negativo nas taxas de crescimento em todos os tratamentos, independentemente da condição de salinidade. Parece que o efeito interativo de cádmio e a salinidade é impulsionado principalmente pela influência tóxica do cádmio. O cádmio é considerado elemento não essencial para o crescimento, desenvolvimento e processos metabólicos nas macroalgas (Xia *et al.*, 2004; Kumar *et al.*, 2010). Desta forma, a redução das taxas de crescimento pode estar relacionada à realocação de energia para evitar estresse por cádmio ou desencadear processos ativos para excluir ou imobilizar o cádmio de forma a minimizar o impacto do metal.

Respostas semelhantes foram relatadas para Rodophyta em *Hypnea musciformis* (Bouzon *et al.*, 2012), *G. domingensis* (Santos *et al.*, 2012), e *G. lemaneiformis* (Xia *et al.*, 2004), e para as Chlorophyta *Ulva linza* e *U. prolifera* (Jiang *et al.*, 2013) quando tratadas com cádmio. Jiang *et al.* (2013) também estudaram o efeito do cádmio sobre o ajuste osmótico de *U. linza* e *U. prolifera*, e como resultado foi demonstrado que baixas concentrações de cádmio aumentam a capacidade de ajuste osmótico das espécies trabalhadas. Aparentemente o cádmio modificou a capacidade de tolerância osmótica em *P.capillacea*, e o sinergismo alterou a resposta da alga ao elevar-se a salinidade.

A absorção de cádmio por *Pterocladia capillacea* foi maior quando cultivada em 0,17ppm em 25 ups, absorvendo cerca de 75,6%. A absorção reduziu com o aumento da concentração de metal e salinidade. A acumulação de cádmio no presente estudo foi maior do que o observado para outras espécies de algas vermelhas, como Tonon *et al.* (2011), que relataram a absorção de 9,1% por *G. tenuistipitata*. Como as algas vermelhas possuem polissacarídeos sulfatados nas paredes celulares, ágar ou carragenana, o metal pode se ligar aos compostos sulfatados levando a uma imobilização.

As taxas de absorção e fator de bioacumulação em *P. capillacea* foram menores na salinidade de 45 psu. Esta resposta pode ser devido a interações entre os íons metálicos e íons cloreto em concentrações mais elevadas de salinidade (Amado Filho *et al.*, 1997; Mamboya *et al.*, 2009). Segundo Fritioff (2005) Cd e Zn podem formar complexos com íons de cloreto presentes na água, e com o aumento da salinidade e conseqüentemente aumento da concentração de íons presentes na água do mar, aparentemente houve uma redução da biodisponibilidade de cádmio, e dessa forma a alga acumulou menos o metal. Wang e Dei (1999) observaram que na alga verde *U. lactuca* ocorreu aumento na taxa de absorção de Cd, Cr, Se, e Zn com a diminuição da salinidade 28-10 psu.

Avaliando o efeito da salinidade sobre os pigmentos fotossintetizantes, observou-se que a salinidade provocou pequenas alterações, sendo o acréscimo de cádmio ao meio de cultivo o responsável por alterações estatisticamente significativas. No entanto, para clorofila *a*, a interação entre cádmio e salinidade foi responsável por redução significativa na concentração do pigmento. Essa resposta pode ter ocorrido devido ao rompimento de membranas do tilacóide, mas a concentração de ficobiliproteínas nas plantas cultivadas a 35 ups

em 0,70ppm de Cd foi elevada, o que pode sugerir o desenvolvimento de um possível mecanismo de defesa para toxicidade sob esta condição.

Nas algas cultivadas na ausência dos agentes estressantes (35 psu e 0 ppm de cádmio) o teor de flavonóides foi menor quando comparado às algas submetidas a condições de estresse, indicando que este composto atua efetivamente como elemento de proteção. Além disso, em salinidades de 25 ou 45 psu e 0 ppm de Cd a produção de flavonóides foi elevada, indicando que salinidades baixas ou altas podem ser consideradas uma condição de estresse, que é atenuado pela produção deste composto antioxidante.

A parede celular *P. capillacea* (controle) mostrou uma textura microfibrilar, com microfibrilas estruturadas em camadas concêntricas com diferentes graus de compressão. Nos tratamentos sem adição de metal, as células apresentaram paredes celulares espessas, numerosos cloroplastos e grãos de amido, semelhante ao observado em 35 ups, evidenciando que o estresse por salinidade não teve efeito na organização celular de *P. capillacea* cultivada durante 7 dias em 25 e 45 ups. Observações das plantas expostas ao cádmio mostraram aumento da parede celular e a presença de precipitados entre as microfibrilas na salinidade de 35 e 45, em todas as concentrações de cádmio. O aumento da espessura da parede da celular das plantas expostas ao cádmio pode ser interpretado como um mecanismo de defesa mecânica, já que a espécie estudada possui ágar na composição da parede celular, onde os metais podem interagir e se ligar. No caso do ágar, a capacidade de ligação do metal está associada com o grau de sulfatação de moléculas de hidratos de carbono (Diannelidis e Delivopoulos, 1997; Bouzon *et al.*, 2012).

Nas análises das paredes celulares das plantas tratadas observadas MEV-EDS-, foi detectada a presença de cádmio, indicando que há acumulação e ligação do metal nas paredes celulares. As alterações observadas na superfície do talo dos tratados podem ser indicação de modificação na estrutura dos grupos sulfatados presentes no ágar. Por outro lado, o efeito negativo de cádmio parece ser uma influência direta, considerando que este metal penetra nas células, e não causa apenas um efeito tóxico extracelular. Alterações nos tratamentos sem metal, somente submetidos a estresse por salinidade, evidenciam o desequilíbrio da pressão osmótica, redução o volume celular, e podem modificar o potencial de água da planta em resposta à mudança de salinidade (Eggert *et al.*, 2007; Hayashi *et al.*, 2011). Aumento na composição dos elementos N e Ca foi verificado na superfície das

plantas tratadas, e esta mudança pode ser associada com uma barreira contra a presença de cádmio, podendo ter ocorrido deposição na parede celular na forma de carbonato de cálcio e nitrogênio. Segundo Sharma e Dubey (2005), a ligação com o ficocolóide restringe captação do metal e estabelece uma barreira importante para proteger as células.

Apesar do aumento na espessura da parede, *P. capillacea* não foi capaz de impedir a entrada de cádmio nas células, sendo a presença do metal observada nos vacúolos e no citoplasma. A presença de precipitados nos vacúolos de *P. capillacea* expostos ao cádmio pode estar associada à tentativa de imobilização para minimizar o efeito tóxico do cádmio. Além das alterações na parede celular, os cloroplastos em plantas expostas ao cádmio mostraram mudanças estruturais especialmente alterações na forma e na organização dos tilacóides, podendo ser interpretado com efeito tóxico de cádmio promovendo formação de espécies reativas de oxigênio (EROS) reativas, que podem causar a peroxidação das membranas lipídicas. Talarico (2002) demonstrou algumas mudanças na organização na ultraestrutura da rodófito *Audouinella saviana* (Meneghini) Woelkerling após exposição ao cádmio, que apresentou parede mais espessa, presença de pequenos vacúolos contendo complexos de metal. Em *H. musciformis* (Bouzon *et al.*, 2012) e *G. domingensis* (Santos *et al.*, 2012) os cloroplastos apresentaram, também, forma irregular e tilacóides rompidos. Nas algas submetidas ao cádmio, foi observado um aumento na quantidade de plastoglobuli nos cloroplastos, corroborando com observado por Santos *et al.* (2012) em *Gracilaria domingensis*, Bouzon *et al.* (2012) em *Hypnea musciformis*, e Diannelidis e Delivopoulos (1997) em *Ceramium ciliatum* (J.Ellis) Ducluzeau quando tratadas com cádmio. Este aumento no número de lípidos pode ser considerado como uma mudança no metabolismo, o que, por sua vez, resulta em uma redução da divisão celular e uma diminuição nas taxas de crescimento.

A análise do perfil metabólico através de FTIR acoplado ao PCA indicou discrepâncias no metabolismo lipídico e de carboidratos de *P. capillacea*, principalmente considerando-se o efeito da exposição à alta salinidade, ou seja, 45 ups. Os resultados do FTIR podem ser correlacionados com os resultados encontrados pela análise MET, que revelou mudanças na quantidade de grãos de amido e acúmulo de lipídios nas células de *P. capillacea* expostos a alta salinidade e cádmio. Assim, diferentes níveis de estresse de salinidade e exposição ao Cd pode levar plantas a mostrar perfis metabólicos específicos. Estes

resultados são importantes para expandir a compreensão dos efeitos do estresse causado por metais pesados e salinidade, e dar idéias de outras classes de compostos, ou seja, metabólitos primários, a serem investigados em detalhes.

6 CONCLUSÃO

Evidências da toxicidade do cádmio foram constatadas nas concentrações trabalhadas, e pode-se citar redução na taxa de crescimento, elevada bioacumulação, produção de flavonóides, alterações observadas forma e densidade no citoplasma das células corticais, presença de precipitados elétron densos nos vacúolos (deposição de cádmio), alteração nos cloroplastos e mitocôndrias, desestruturação dos tilacóides, aumento no conteúdo de plastoglobulos e redução na quantidade de grãos de amidos. A desorganização em nível estrutural foi mais intensa quanto maior a concentração de cádmio em que a planta foi submetida, corroborando com as respostas fisiológicas obtidas.

Estas drásticas mudanças fisiológicas e ultraestruturais observadas em resposta à exposição ao cádmio, evidenciam o efeito tóxico deste no sistema fotossintetizante, como observado nas análises de pigmentos e organização do cloroplasto. As alterações observadas no aparato fotossintético e nas mitocôndrias dificultam a sustentação do metabolismo para sobrevivência da planta, devido ao comprometimento do metabolismo primário, produtividade primária (fotossíntese) e acúmulo de carboidratos (grânulos de amido), fornecimento de energia (respiração), e disponibilidade de nutrientes (por exemplo, fornecimento de nitrogênio).

7 REFERÊNCIAS

- AEBI, H. Catalase *in Vitro*. **Methods in Enzymology**, v. 105, p. 121-126, 1984.
- AHALYA, N; RAMACHANDRA, T. V; KANAMADI, R. D. Biosorption of heavy metals. **Research Journal of Chemistry and Environment**, v. 7, n. 7, p. 71-79, 2003.
- ALESSANDRETTI, T; RABELO, A. P. B; SOLER, J. G. M. Comparação do potencial de remoção de metais pesados por meio de adsorção usando algas e aguapés. **VI Congresso Brasileiro de Engenharia Química em Iniciação Científica**, 2005.
- AMADO-FILHO, G. M; KARES, C. S; ANDRADE, L. R; VALENTIM, Y. Y; PFEIFFER, W. C. Effects on growth and Accumulation of Zinc in Six Seaweed Species. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 37, p. 223-228, 1997.
- ANDRADE, L. R; FARINA, M; AMADO FILHO, G. M. Effects of copper on *Enteromorpha flexuosa* (Chlorophyta) *in vitro*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 58, p. 117-125, 2004.
- ANDRADE, L. R.; FARINA, M; FILHO, G. M. A. Role of *Padina gymnospora* (Dictyotales, Phaeophyceae) cell walls in cadmium accumulation. **Phycologia**, v. 41, n. 1, p. 39-48, 2002.
- ASHRAF, M.; HARRIS, P.J.C. Potential biochemical indicators of salinity tolerance in plants. **Plant Science**, v. 166, p. 3-16, 2004.
- BOO, S. M; KIM, S. Y; HONG, I. S; HWANG, I. K. Reexamination of the genus *Pterocliadiella* (Gelidiaceae, Rhodophyta) in Korea based on morphology and rbcL sequences. **ALGAE**, v. 25, n. 1, p.1-9, 2010.
- BOUZON, Z.L; FERREIRA, E.C; SANTOS, R; SCHERNER, F; HORTA, P.A; MARASCHIN, M; SCHMIDT, E.C. Influences of cadmium on fine structure and metabolism of *Hypnea musciformis* (Rhodophyta, Gigartinales) cultivated *in vitro*. **Protoplasma**, p. 637-650, 2012.

CABRAL, I. S. R; SHIRAHIGUE, L. D; DE ARRUDA, L. F; CARPES, S. T; OETTERER, M. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, Curitiba, v. 29, n. 2, p. 181-192, jul./dez. 2011.

CALFA, B. A; TOREM, M. L. Biorreagentes - aplicações na remoção de metais pesados contidos em efluentes líquidos por biossorção/bioflotação. **Metalurgia e Materiais**, v. 60, n.3, p. 537-542, 2007.

CASSINA, A; RADI, R. Differential inhibitory action of nitric oxide and peroxyxynitrite on mitochondrial electron transport. **Archives of Biochemistry and Biophysic**, n. 328, p. 309-316, 1996.

CETESB. Cádmió e seus compostos. Disponível em: <http://pessoal.utfpr.edu.br/zanello/arquivos/contsoloresduosmetalicos.pdf>. Acesso em: 13 de março, 2012.

CLEMENS, S. Toxic metal accumulation, responses to exposure and mechanisms of tolerance in plants. **Biochimie**, v. 88, p. 1707-1719, 2006.

COLLÉN, J; PINTO, E; PEDERSÉN, M; COLEPICOLO, P. Induction of Oxidative Stress in the Red Macroalga *Gracilaria tenuistipitata* by Pollutant Metals. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 45, p. 337-342, 2003.

CONNAM, S; STENGEL, D. B. Impacts of ambient salinity and copper on brown algae: 2 Interactive effects on phenolic pool and assessment of metal binding capacity of phlorotannin. **Aquatic toxicology**, v.104, p.1-13, 2011.

DE RUITER, G. A; RUDOLPH, B. Carrageenan biotechnology. **Trends in Food Science Technology**, v.8, p. 389-395, 1997.

DIANNELIDIS, B. E; DELIVOPOULOS, S. G. The effects of zinc, copper and cadmium on the fine structure of *Ceramium ciliatum*

(Rhodophyceae, Ceramiales). **Marine Environmental Research**, v. 44, p. 127-134, 1997

EGGERT, A; NITSCHKE, U; WEST, J. A; MICHALIK, D; KARSTEN, U. Acclimatation of the intertidal red alga *Bangiopsis subsimplex* (Stylonematophyceae) to salinity changes. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 343, p.176 – 186, 2007.

DURUIBE, J.O; OGWUEGBU, M.O; EGWURUGWU, J.N. Heavy metal pollution and human biotoxic effects. **International Journal of Physical Sciences**, v. 2(5), p. 112- 118, 2007.

DOMOUHTSIDOU, G. P; DIMITRIADIS, V. K. Ultrastructural Localization of Heavy Metals (Hg, Ag, Pb, and Cu) in Gills and Digestive Gland of Mussels, *Mytilus galloprovincialis* (L.). **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 38, n. 4, p. 472-478, 2000.

FASSETT, D.W. Cadmium: Biological effects and occurrence in the environment. **Annual Review of Pharmacolog**, v.15, p. 425-435,1975.

FERREIRA, A. P. Avaliação das concentrações de metais pesados no sedimento, água e em *Leucopternis lacernulata* (gavião-pomba). Estudo de caso: Baía de Sepetiba, Rio de Janeiro. **Gaia Scientia**, v. 3, n. 2, p. 23-31, 2009

FLOHE, L; GUNZLER, W.A. Assays of glutathione peroxidase. **Methods in Enzymology**, v. 105, p. 114-121, 1984.

FRITIOFF, A; KAUTSKY, L; GREGER, M. Influence of temperature and salinity on heavy metal uptake by submersed plants. **Environmental Pollution**, v. 133, p. 265–274, 2005.

GEIGENBERGER, P.; STITT, M. Sucrose synthase catalyses a readily reversible reaction *in vivo* in developing potato tubers and other plant tissues. **Planta**, v. 189, n. 3, p. 329-339, 1993.

GONÇALVES, V. Algas Terrestres. Disponível em: http://siaram.azores.gov.pt/flora/fungos-algas/algas/_texto.html. Acesso em: 15 de março, 2012.

GOUVEIA, C; KREUSCH, M; SCHMIDT, E. C; FELIX, M. R. L; OSORIO, L. K. P; PEREIRA, D.T; DOS SANTOS, R; OURIQUES, L.C; MARTINS, R. P; LATINI, A; RAMLOV. F; CARVALHO, T. J. G; CHOW, F; MARASCHIN, M; BOUZON, Z. L. The effects of lead and copper on the cellular architecture and metabolism of the red alga *Gracilaria domingensis*. *Microscopy and Microanalysis*, v. 19, p.513 – 524, 2013.

GRAHAM, L. E., GRAHAM, J. M., AND WILCOX, L. W. 2009. **Algae** (2nd edition). Pearson Education, San Francisco, CA.

GRATÃO, P. L; POLLE, A; LEA, P. J; AZEVEDO, R. A. Making the life of heavy metal-stressed plants a little easier. **Functional Plant Biology**, v.32, p. 481-494, 2005.

JÄRUP, L. Cadmium overload and toxicity. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v.17, p.35-39, 2002.

JEFFREY, S.W. AND G. HUMPHREY. New spectrophotometric equations for determining chlorophyll a,b,c1 and c2 in higher plants, algae and natural phytoplankton. **Biochem. Physiol. Pflanzen**, v. 167, p. 191-194, 1975.

HAMDY, A. A. Biosorption of heavy metals by marine algae. **Current Microbiology**. v. 41, p. 232-238, 2000.

HASHIM, M. A; CHU, K. H. Biosorption of cadmium by brown, green and red seaweeds. **Chemical Engineering Journal**, v. 97, p. 249-255, 2004.

HE, P; XU, S; ZHANG, H; WEN, S; DAI, Y; LIN, S; YARISH, C. Bioremediation efficiency in the removal of dissolved inorganic nutrients by the red seaweed, *Porphyra yezoensis*, cultivated in the open sea. **Water Research**, v. 42, p. 1281-1289, 2008.

HERMES-LIMA, M; WILLMORE, W. G; STOREY, K. B. Quantification of lipid peroxidation in tissue extracts based on Fe(III) xylenol orange complex formation. **Free Radical Biology e Medicine**, v. 19, n. 3, p. 271-280, 1995.

HISCOX, J. D; ISRAELSTAM, G. F. A method for the extraction of chlorophyll from leaf tissue without maceration. **Canadian Journal Botany**, v. 57, p.1332-1334, 1979.

HORTA, P.A. Macroalgas do infralitoral do sul e sudeste do Brasil: taxonomia e biogeografia. 2000. 301p. **Tese** (Doutorado em Ciências), Universidade de São Paulo, São Paulo, 2000.

HU, S.; TANG, C. H; WU, M. Cadmium accumulation by several seaweeds. **The Science of the Total Environment**, v. 187, p. 65-71, 1996.

Instituto de Ciências Biomédicas. Universidade de São Paulo. Departamento de microbiologia. Disponível em: <<http://www.icb.usp.br/~mariojac/links.html>>. Acesso: 22 de abril, 2013.

JÄRUP, L. Cadmium overload and toxicity. **Nephrology, Dialysis Transplantation**, v.17, p.35-39, 2002.

JIANG, HE-PING; GAO, BING-BING; LI, WEN-HUI; ZHU, M; ZHENG, CHUN-FANG; ZHENG, QING-SONG; WNAG, CHANG-HAI. Physiological and Biochemical Responses of *Ulva prolifera* and *Ulva linza* to Cadmium Stress. **The Scientific World Journal**, p. 1-11, 2013.

KIRST, G. O. Salinity Tolerance of Eukaryotic Marine Algae. **Annual review of plant physiology and plant molecular biology**, v. 40, p. 21–53, 1989.

KUHNEN, S; LEMOS P. M. M; CAMPESTRINI, L. H; OGLIARI, J. B; DIAS, P. F; MARASCHIN, M. Antiangiogenic properties of carotenoids: a potential role of maize as functional food. **Journal of Functional Foods**, v.1, p. 284-290, 2009.

KÜPPER, H; SETLIK, I; SPILLER, M; KÜPPER, F. C; PRASIL, O. Heavy metal-induced inhibition of photosynthesis: Targets of in vivo heavy metal chlorophyll formation. **Journal Phycology**, v. 38, p. 439-441, 2002.

KURSAR, T.A; VAN DER MEER, J; ALBERTE, R. S. Light-harvesting system of the red alga *Gracilaria tikvahiae*. II. Phycobilisome Characteristics of Pigment Mutants. **Plant Physiology**, v. 73, p.361-369, 1983.

LATINI, A; RODRÍGUEZ. M; BORBA ROSA, R; SCUSSIATO, K; LEIPNITZ, G; REIS DE ASSIS, D; DA COSTA FERREIRA, G; FUNCHAL, C; JACQUES-SILVA, M.C; BUZIN, L; GIUGLIANI, R; CASSINA, A; RADI, R; WAJNER M. 3-Hydroxyglutaric Acid Moderately Impairs Energy Metabolism In Brain of Young Rats. **Neuroscience**, v. 135, p.111-120, 2005.

LIGNELL, A; PEDERSÉN. M. Ágar composition as a function of morphology and growth rate. Studies on some morphological strains of *Gracilaria secundata* and *Gracilaria verrucosa* (Rhodophyta). **Botanica Marina**,v. 32, p.219 – 227, 1989.

LIPPERT, H; IKEN K; RACHOR, E; WIENCKE, C. Epifauna associated with macroalgae in the Kongsfjord. **Polar Biology**, v. 24, p. 512-522, 2001.

LOWRY, O. H; ROSEBOUGH, N. G; FARR, A. L. Protein measurement with the folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, v. 193, p. 265–275, 1951.

MALEA, P; HARITONIDIS, S. Seasonal accumulation of metals by red alga *Gracilaria verrucosa* (Huds.) Papens. From Thermaikos Gulf, Greece. **Journal of Applied Phycology**, v. 11, p. 503-509, 1999.

MAMBOYA, F. A; PRATAP, H. B; MTOLERA, M; BJORK, M. The effect of copper on the daily growth rate and photosynthetic efficiency of the brown macroalga *Padina boergesenii*. In Proceedings of the

Conference on Advances on Marine Sciences in Tanzania, pp. 185-192, 1999.

MANARA, A. Plant Responses to Heavy Metal Toxicity. In *Plants and Heavy Metals*, SpringerBriefs in Biometals, p. 86, 2012.

McHUGH, D.J. A guide to the seaweed industry. **FAO Fisheries Paper**. Roma: FAO, p. 118, 2003.

MCLAUGHLIN M.J; PARKER D.R; CLARKE J.M. Metals and micronutrients—food safety issues. *Field Crops Research*, v.60, p.143–63, 1999.

MENCH, M; VANGRONSVELD, J; DIDIER, V; CLIJSTERS, H. A mimicked *in situ* remediation study of metal contaminated soils with emphasis on cadmium and lead. **Environmental Pollution**, v. 86, p. 279–286, 1994.

MILLAR, A. J. K.; FRESHWATER, D. W. Morphology and molecular phylogeny of the marine algal order Gelidiales (Rhodophyta) from New South Wales, including Lord Howe and Norfolk Islands. **Aust. Syst. Bot**, v. 18, p. 215-263, 2005.

MISRA, H. P; FRIDOVICH, I. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 247, n. 10, p. 3170-3175, 1972.

NORTON, T.A; MELKONIAN, M; ANDERSEN, R.A. Algal biodiversity. **Journal of Applied Phycology**, v. 35, p. 308-326, 1996.

OH, J-J; CHOI, E-M; HAN, Y-S; YOON, J-H; PARK, A; JIN, K; LEE, J-W; CHOI, H; KIM, S; BROWN, M. T; HAN, T. Influence of Salinity on Metal Toxicity to *Ulva pertusa*. **Toxicology and Environmental Health Sciences**, v.4, p. 9-13, 2012.

OLIVEIRA, C. R. de; MATOS, C. H. C.; ROCHA, C. M. C. da. Microgastrópodes Caecidae associados às macroalgas *Padina*

gymnospora (Kuetzing) Sonder e *Hypnea musciformis* (Wulfen) Lamouroux na praia de Candeias (Jaboatão dos Guararapes, PE). *Rev. Bras. Zoo.*, Juiz de Fora, v. 5, n. 2, p. 213-223, 2003.

OLIVEIRA, M. M. F.; KLEINUBING, S. J. e SILVA, M. G. C. Bioadsorção de cádmio em banho finito utilizando alga marinha *Sargassum* sp. **VI Congresso Brasileiro de Engenharia Química em Iniciação Científica**, 2005.

OKAMOTO, O.K; COLEPICOLO, P. Response of Superoxide Dismutase to Pollutant Metal Stress in the Marine Dinoflagellate *Gonyaulax polyedra*. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 119, p. 67-73, 1998.

PAULA, E.J; OLIVEIRA, E.C; BERCHEZ, F; CHOW, F; OLIVEIRA, M. C. Introdução à biologia das criptógamas. São Paulo: Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, Departamento de Botânica, 2007. Disponível em: <http://felix.ib.usp.br/apostila_cripto.pdf>. Acesso em: 31 de março, 2012.

PENNIMAN, C.A.; MATHIESON, A.C; PENNIMAN, C.E. Reproductive Phenology and Growth of *Gracilaria tikvahiae* McLachlan (Gigartinales, Rhodophyta) in the Great Bay Estuary, New Hampshire. *Botanica Marina*, v. 29, p. 147–154, 1986.

PERRONE, C.; FELICINI, G. P; BOTTALICO, A. The prostrate system of the Gelidiales: diagnostic and taxonomic importance. *Botanica Marina*, v. 49, p. 23-33, 2006.

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, p. 1008–1018, 2003.

POMPEU, G. B; GRATAO, P. L; VITORELLO, V. A; AZEVEDO, R. A. Antioxidant isoenzyme responses to nickel-induced stress in tobacco cell suspension culture. **Scientia Agricola**, v. 65, n.5, p.548-552, 2008.

PRESCOTT G. W . The algae: review. Otto Koeltz Science Publishers, Koenigstein, 1969.

RAVEN, P. H; EVERT, R. F; EICHHORN, S. E. **Biologia Vegetal**. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S. A, p. 728, 1996

REYNOLDS, E. S. The use of lead citrate at light pH as an electron opaque stain in electron microscopy. **Journal Cell Biology**, v. 17, p. 208-212, 1963.

ROBERTS, D. A; POORE, A. G. B; JOHNSTON, E. L. Ecological consequences of Cooper contamination in macroalgae: effects on epifauna and associated herbivores. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 25, n. 9, p. 2470-2479, 2006.

SANTELICES, B; HOMMERSAND, M. *Pterocladiaella*, a new genus in the Gelidiaceae (Gelidiales, Rhodophyta). **Phycologia**, v. 36, p. 114-119, 1997.

SANTOS, R., SCHMIDT, E.C., PAULA, M.R., LATINI, A., HORTA, P.A., MARASCHIN, M. ; BOUZON, Z.L. Effects of cadmium on growth, photosynthetic pigments, photosynthetic performance, biochemical parameters and structure of chloroplasts in the agarophyte *Gracilaria domingensis* (Rhodophyta, Gracilariales). **American Journal of Plant Science**, v. 3,p. 1077–1084, 2012

SHARMA, P., DUBEY, R. S. Lead toxicity in plants. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v.17, p. 35–52, 2005.

SHENG, P. X; TING, Y; CHEN, J. P; HONG, L. Sorption of lead, copper, cadmium, zinc and nickel by marine algal biomass: characterization of biosorptive capacity and investigation of mechanisms. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 275, p. 131-141, 2004.

SCHMIDT, E.C; MARASCHIN, M; BOUZON, Z.L. Effects of UVB radiation on the carragenophyte *Kappaphycus alvarezii* (Rhodophyta, Gigartinales): changes in ultrastructure, growth, and photosynthetic pigments. **Hydrobiologia**, v. 649, p. 171-182, 2010 (a).

SCHMIDT, E.C., NUNES, B. G., MARASCHIN, M., BOUZON, Z.L. Effect of ultraviolet-B radiation on growth, photosynthetic pigments, and cell biology of *Kappaphycus alvarezii* (Rhodophyta, Gigartinales) macroalgae brown strain. **Photosynthetica**, v. 48, p. 161-172, 2010 (b).

SCHMIDT, E. C; SANTOS, R ; FAVERI, C ; HORTA, P. A ; MARTINS, R. P; LATINI, A; RAMLOV, F; MARASCHIN, M; BOUZON, Z. L. Response of the agarophyte *Gelidium floridanum* after in vitro exposure to ultraviolet radiation-B: changes in ultrastructure, pigments and antioxidant systems. **Journal of Applied Phycology**, v. 1, p. 1-15, 2012

SILVA, L.M.C.M.; LIMA, V.; HOLANDA, M.L.; PINHEIRO, P.G.; RODRIGUES, J.A.G.; LIMA, M.E.P.; BENEVIDES, N.M.B. Antinociceptive and anti-inflammatory activities of lectin from marine red alga *Pterocliadiella capillacea*. **Biological e Pharmaceutical Bulletin**, v. 33(5): p.830-835, 2010.

SMITHSONIAN TROPICAL RESEARCH INSTITUTE. Disponível em: <http://biogeodb.stri.si.edu/bocas_database/search/species/6643>. Acesso 24 de novembro, 2013.

SOARES, A. M. S; MACHADO, O. L. T. Defesa de plantas: Sinalização química e espécies reativas de oxigênio. **Revista Trópica – Ciências Agrárias e Biológicas**, v.1, n. 1, p. 19, 2007.

SOUZA, José Francisco de. Efeito de metais pesados no desenvolvimento de plântulas de milho (*Zea mays* L.) e rabanete (*Raphanus sativus* L.). 2003. 137 f. **Tese** (Doutorado) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas (São Paulo), 2003.

SPURR, A. R. A low viscosity epoxy resin-embedding medium for electron microscopy. **Journal Ultrastructure Research**, v. 26, p. 31-43, 1969.

TALARICO L. Fine structure and X-ray microanalysis of a red macrophyte cultured under cadmium stress. **Environmental Pollution**, v. 120, p.813–821, 2002.

TONON, A. P; OLIVEIRA, M. C; SORIANO, E. M; COLEPICOLO, P. Absorption of metals and characterization of chemical elements present in three species of *Gracilaria* (Gracilariaceae) Greville: A genus of economical importance. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 21, p. 355–360, 2011.

TURECK, C; OLIVEIRA, T; CREMER, M; BASSFELD, J. Avaliação da concentração de metais pesados em tecido de ostras *Crassostrea gigas* (molusca, bivalve) cultivadas na baía da babitonga, litoral norte de santa catarina. Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente, América do Norte, 16, mar. 2007.

VERAS, D. R. A. Moluscos associados à macroalga *Pterocliadiella caeruleascens* (rhodophyta, pterocliadiaceae) na zona entremarés da Praia da Pedra Rachada, Paracuru, Ceará, Nordeste do Brasil. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza – CE. 78p. 2011.

XIA, B.M; TSENG, C.K; WANG, Y.Q. Studies on Chinese species of *Gelidiella* and *Pterocliadiella* (Gelidiales, Rhodophyta). **Hydrobiologia**, v. 512, p. 201-207, 2004.

WANG, W. X; DEI, R.C.H. Kinetic measurements of metal accumulation in two marine macroalgae. **Marine Biology**, v. 135(1), p. 11-23, 1999.

WELLBURN, A. R. Spectral determination of chlorophyll-*a* and chlorophyll-*b* as well as total carotenoids, Using various solvents with spectrophotometers of different resolution. **Journal of Plant Physiology**, v. 144, p. 307-313, 1994.

WHO. Exposure to cadmium: A major public health concern. Disponível em: <http://www.who.int/ipcs/features/cadmium.pdf>. Acesso em: 22 de abril, 2012.

ZACARIAS, A. A; MORESCO, H. H; HORST, H; BRIGHENTE, I. M. C; MARQUES, M.C.A., PIZZOLLATI, M. G. Determinação do teor de fenólicos e flavonóides no extrato e frações de *Tabebuia heptaphylla*. **30ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química**, Santa Maria, Rio Grande do Sul, 2007.