



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR, EMBRIOLOGIA E GENÉTICA  
PÓS – GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E DO DESENVOLVIMENTO

**RODRIGO WILLAMIL DOS SANTOS**

***Avaliação dos efeitos de cádmio na fisiologia e morfologia de *Gracilaria domingensis****

Florianópolis, Fevereiro de 2011.

**RODRIGO WILLAMIL DOS SANTOS**

**Avaliação dos efeitos de cádmio na fisiologia e morfologia de *Gracilaria domingensis***

Dissertação de Mestrado apresentado ao Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento, Departamento de Biologia Celular, Embriologia e Genética da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Biologia Celular e do Desenvolvimento.

**Orientadora: Dra. Zenilda Laurita Bouzon**

Florianópolis, Fevereiro de 2011.

“Se deseja saber que causas foram feitas no passado, observe os resultados que se manifestam no presente. E se deseja saber que resultados serão manifestados no futuro, observe as causas que estão sendo feitas no presente”.

*(Nitiren Daishonin)*

**À minha mãe, meu filho, aos familiares e amigos.**

## **AGRADECIMENTOS:**

Tenho um enorme sentimento de gratidão à grande mestre, professora Dr.<sup>a</sup> Zenilda Laurita Bouzon, pelo carinho, dedicação e apoio nesta importante etapa da minha vida. Foi uma honra e um privilégio poder ser seu orientando. **Zê muito obrigado!**

Às professoras Dr.<sup>a</sup> Luciane Ouriques e Dr.<sup>a</sup> Leila Hayashi, pelo incentivo, pelas dúvidas solucionadas... **Muito obrigado!**

Aos amigos que fiz no Laboratório de Algas Marinhas (LAMAR). Uns me ajudaram em montagens de blocos de microscopia, outros na parte prática dos experimentos, preparação da sala de cultivo, entre outros. Carmem, Gabriel, Marthiellen, Ticiane e as IC's Beatriz e Carime. **Muito obrigado!** Agradeço especialmente o “amigo-irmão” Éder, que nunca negou ajuda, ensinando metodologias, auxiliando coletas, ajudando na parte prática e teórica na vida de mestrando. Você com certeza foi parte fundamental neste projeto. **Éder muito obrigado!**

Agradeço também ao Professor Dr. Paulo Horta pelos enriquecimentos no projeto e o apoio dado com o empréstimo e a utilização do fluorímetro de amplitude modulada (PAM). Outros auxiliares nesta árdua tarefa foram o Edu Bastos e o Fernando. **A todos vocês obrigado!**

Agradeço também ao LCME e todos os seus funcionários pelo auxílio nas microscopias eletrônicas, ao FluorBEG no auxílio à captura de imagens de microscopia de luz e a CAPES-REUNI pela bolsa de pesquisa que me permitiu ter dedicação exclusiva a este trabalho.

Aos meus avôs, *in memoriam*, Cutelo (Estevão) e Diloca (Adelino) que plantaram em meu ser a semente do amor à natureza. **Muito obrigado!**

Evidentemente a minha caminhada até chegar aqui dependeu de meus familiares: Nair, minha mãe, sempre lutando em prol da minha felicidade. Genésio, meu pai de coração, sempre me auxiliando, inclusive financeiramente. À Joseane, minha maninha, que serve de inspiração para a luta acadêmica. Ao meu irmão Carlitos que sempre ajudou quando eu mais precisava. Ao meu filho, Dalton, pela compreensão aos meus momentos de ausência. À vó Tita minha primeira professora. À Tia Noemi sempre por perto me auxiliando direta ou indiretamente. Ao tio Edevaldo e ao primo-amigo Elisson, pela amizade e torcida. A todos os familiares que torceram por mim. Meu muitíssimo obrigado. À minha amada, Graziela, que me apoiou e incentivou meu trabalho dia-a-dia. À Beatriz pelo amor de filha. **Muito obrigado!**

Ao Budismo de Nitiren Daishonin, a BSGI e todos os companheiros, pelos incentivos e a transformação positiva em minha vida. **Muito obrigado!**

## RESUMO

*Gracilaria domingensis* (Kützting) Sonder *ex* (Dickie) é distribuída por todo o litoral brasileiro e possui o potencial econômico para extração de polissacarídeos de parede celular sulfatados como o ágar. Considerando que existe um aumento gradativo das ações industriais que promovem a poluição de águas costeiras por metais pesados, dentre este o cádmio, verificou-se que este metal causa danos em macroalgas marinhas como decréscimo na fotossíntese e na taxa de crescimento. O presente trabalho teve como objetivo avaliar, através de bioensaio, as alterações morfológicas, ultraestruturais e fisiológicas de *G. domingensis* em diferentes concentrações de cádmio. As amostras foram cultivadas com irradiância fotossinteticamente ativa (PAR) ao dia de 80  $\mu\text{mol}$  fótons  $/\text{m}^{-2}$ . A temperatura de 24 °C ( $\pm 2$  °C) e o fotoperíodo de 12 h, com aeração contínua, em água do mar com meio von Stosch, 4 mL por litro e salinidade de 34 ups. Foi utilizado cloreto de cádmio nas concentrações de 100  $\mu\text{M}$ , 200  $\mu\text{M}$  e 300  $\mu\text{M}$ , durante 16 dias. As amostras foram processadas para microscopia de luz, microscopia eletrônica de transmissão e varredura. A avaliação fisiológica foi feita através da taxa de crescimento, eficiência fotossintética e quantificação dos pigmentos. Nos tratamentos com cádmio houve decréscimo na taxa de crescimento. Observou-se despigmentação gradativa das amostras conforme aumento de concentração de cádmio. Este resultado está correlacionado com a diminuição da concentração de pigmentos fotossintetizantes (FE, FC, AFC e Cl *a*) e decréscimo na taxa de transferência de elétrons. As células corticais foram alteradas morfológicamente quando expostas ao cádmio, onde observou-se redução de tamanho das células, aumento na espessura da parede concomitante ao aumento de carboidratos ácidos. O número de grãos de amido das florídeas, nas células corticais e subcorticais, também aumentaram nas amostras tratadas com cádmio quando comparadas ao controle. As proteínas totais, nas amostras tratadas com cádmio, nos testes histoquímicos, reagiram de forma mais intensa. O cádmio foi localizado nas células corticais e subcorticais especificamente nas paredes celulares. A parede celular, especialmente das células corticais das amostras tratadas com cádmio, apresentou alterações na ultraestrutura com aumento da espessura e presença de granulações elétron-densas, que também foram observadas nos vacúolos destas células. A alteração ultraestrutural mais marcante foi observada nos cloroplastos das células corticais e subcorticais, com desorganização dos tilacóides juntamente com o aumento no número de plastoglóbulos. Além disso, houve formação de corpos membranosos e inúmeras vesículas no citoplasma. Os experimentos apresentados neste trabalho forneceram subsídios para concluir que a presença de cádmio no meio ambiente irá alterar de forma significativa os produtores primários, base da cadeia alimentar, onde estão inseridas as macroalgas.

## ABSTRACT

*Gracilaria domingensis* is distributed along the Brazilian coast and has the economic potential for extraction of sulfated polysaccharides from cell wall, such as agar. Whereas there is a gradual increase of industrial activities that promote pollution of coastal waters by heavy metals, including cadmium, studies related that this metal causes damage in seaweeds, decreasing photosynthesis and growth rate. This study aimed to evaluate, through bioassay, the morphological, physiological and ultrastructural alterations in plants of *G. domingensis* cultivated at different concentrations of cadmium. Samples were grown in 80  $\mu\text{mol photons m}^{-2}$  photosynthetically active irradiance (PAR) per day. The temperature of 24 °C ( $\pm 2$  °C) and 12 h photoperiod, with continuous aeration in sterilized seawater enriched with 50% von Stosch solution and 34 ups salinity. Cadmium chloride was added in the culture medium in concentrations of 100  $\mu\text{M}$  200  $\mu\text{M}$  and 300  $\mu\text{M}$ , for 16 days. The samples were processed for light microscopy, transmission and scanning electron microscopy. The physiological assessment was made using the growth rate, photosynthetic efficiency and pigments quantification. Low growth rates were observed in the treatments with cadmium when compared to control. Gradual depigmentation of the samples was observed as concentration of cadmium increased. This result was correlated with the decrease of photosynthetic pigments concentrations (PE, PC, APC and Chl *a*) and the decrease of electron transfer rate. The cortical cells were morphologically altered when exposed to cadmium, presenting reduction in cell size, and increase in cell wall thickness with concomitant increase of acid carbohydrate concentration. Floridean starch grains, cortical and subcortical cells, also increased in samples treated with cadmium when compared to control. Histochemical analyses showed that total proteins of samples treated with cadmium reacted with more intensity. The cadmium was located in the cell walls, starch grains and cytoplasm of subcortical and cortical cells. Changes in the ultrastructure of the cell wall, as expansion of thickness and the occurrence of electron-dense granules, in the samples treated with cadmium, particularly in cortical cells, were observed. Electron-dense granules were also observed in the vacuoles of these cells. The most significant ultrastructural change was observed in the chloroplasts of cortical and subcortical cells, which showed disorganization of thylakoids and increase of plastoglobuli number. Furthermore, the formation of membranous bodies and numerous vesicles was observed in the cytoplasm. The results presented here provide subsidies to conclude that the presence of cadmium in the environment will change significantly the primary producers in the food chain, where the seaweeds are inserted.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Porções apicais de <i>G. domingensis</i> utilizadas no experimento com cádmio.....	<b>14</b>
<b>Figura 2:</b> Taxas de crescimento dos segmentos apicais do controle e de diferentes tratamentos com cádmio todos cultivados durante 16 dias.....	<b>16</b>
<b>Figura 3:</b> Taxa Relativa de transporte de elétrons versus luz fotossintética emitida e medida pelo PAM nas amostras de <i>G. domingensis</i> .....	<b>17</b>
<b>Figura 4:</b> Seções transversais de <i>G. domingensis</i> coradas com azul de toluidina (AT-O).....	<b>19</b>
<b>Figura 5:</b> Seções transversais de <i>G. domingensis</i> coradas com ácido periódico de Shiff (PAS).....	<b>20</b>
<b>Figura 6:</b> Seções transversais de <i>G. domingensis</i> coradas com azul brilhante de coomassie (CBB).....	<b>21</b>
<b>Figura 7.</b> Talos de <i>G. domingensis</i> observados no MEV.....	<b>23</b>
<b>Figura 8.</b> Espectro de raios-X (EDS) para detecção de cádmio na superfície externa da parede celular dos ápices de <i>G. domingensis</i> das plantas controle e tratadas com cádmio em diferentes concentrações.....	<b>24</b>
<b>Figura 9:</b> Espectro de raios-X (EDS) para detecção de cádmio nas paredes celulares das células corticais, em corte transversal, de <i>G. domingensis</i> do controle e tratadas com cádmio em diferentes concentrações.....	<b>24</b>
<b>Figura 10:</b> Espectro de raios-X (EDS) para detecção de cádmio na região citoplasmática das células corticais, em corte transversal, de <i>G. domingensis</i> do controle e tratadas com cádmio em diferentes concentrações.....	<b>24</b>
<b>Figura 11:</b> Análise com Raios-X para detecção de cádmio nos amidos de células corticais em corte transversal de <i>G. domingensis</i> do controle e tratadas com cádmio em diferentes concentrações.....	<b>25</b>
<b>Figura 12:</b> Plantas controle de <i>G. domingensis</i> visualizadas no MET.....	<b>27</b>
<b>Figura 13:</b> Micrografias de <i>G. domingensis</i> tratadas com 100 µM de cádmio por 16 dias, observadas no MET.....	<b>28</b>
<b>Figura 14:</b> <i>G. domingensis</i> tratadas com 200 µM de cádmio por 16 dias observadas no MET.....	<b>30</b>
<b>Figura 15:</b> <i>G. domingensis</i> tratadas com 300 µM de cádmio por 16 dias e observadas no MET.....	<b>31</b>



**LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

Amido das florídeas (A)  
Azul de Toluidina (AT-O)  
Azul brilhante de Coomassie (CBB)  
Ácido periódico de Schiff (PAS)  
Aloficocianina (AFC)  
Célula cortical (CC)  
Célula subcortical (SC)  
Clorofila *a* (Cl *a*)  
Cloroplasto (C)  
Ficocianina (FC)  
Ficoeritrina (FE)  
Fluorímetro de Pulso Modulado (PAM)  
Microscopia de Luz (ML)  
Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)  
Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)  
Mitocôndria (M)  
Núcleo (N)  
Nucléolo (Nu)  
Parede celular (PC)  
Plastoglóbulos (P)  
Radiação Fotossinteticamente Ativa (PAR)  
Vacúolo (V)

## SUMÁRIO

	<b>RESUMO</b> .....	VI
	<b>ABSTRACT</b> .....	VII
	<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	VIII
	<b>LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS</b> .....	IX
	<b>SUMÁRIO</b> .....	X
<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	1
<b>1.1</b>	Aspectos Gerais das Algas.....	1
<b>1.1.1</b>	Aspectos Gerais da Divisão Rhodophyta.....	1
<b>1.1.2</b>	O Gênero <i>Gracilaria</i> Greville.....	2
<b>1.2</b>	Metais Pesados e as Macroalgas Marinhas.....	3
<b>1.2.1</b>	O Cádmio.....	4
<b>2</b>	<b>JUSTIFICATIVA</b> .....	5
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	6
<b>3.1</b>	Objetivo Geral.....	6
<b>3.2</b>	Objetivos Específicos.....	6
<b>4</b>	<b>METODOLOGIA</b> .....	7
<b>4.1</b>	Coleta e Processamento do Material Biológico.....	7
<b>4.2</b>	Condições de Cultivo.....	7
<b>4.3</b>	As Taxas de Crescimento.....	8
<b>4.4</b>	Extração e Dosagem dos Pigmentos Fotossintetizantes.....	8
<b>4.4.1</b>	Extração e Dosagem da Clorofila <i>a</i> .....	8
<b>4.4.2</b>	Extração e Dosagem das Ficobiliproteínas.....	9
<b>4.5</b>	Medida da Taxa Relativa de Transporte de Elétrons .....	10
<b>4.6</b>	Processamento para Análise em Microscópio de Luz.....	10
<b>4.6.1</b>	Azul de Toluidina (AT-O).....	11
<b>4.6.2</b>	Ácido Periódico de Schiff (PAS).....	11
<b>4.6.3</b>	Azul Brilhante de Coomassie (CBB).....	11
<b>4.7</b>	Processamento para Análise em Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV).....	11
<b>4.8</b>	Processamento para Análise em Microscópio Eletrônico de Transmissão (MET).....	12
<b>4.9</b>	Tratamento da Vidraria e Materiais de Descarte após sua Utilização.....	13
<b>4.10</b>	Análise de Dados.....	13
<b>5</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	14

5.1	Efeito do Cádmio na Morfologia Externa dos segmentos apicais de <i>G. domingensis</i> .....	14
5.2	Taxa de Crescimento.....	14
5.3	Pigmentos.....	16
5.4	Taxa Relativa de Transporte de Elétrons .....	17
5.5	Microscopia de Luz (ML).....	18
5.6	Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	22
5.7	Detecção de Cádmio por EDS.....	23
5.8	Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET).....	25
6	<b>DISCUSSÃO</b> .....	32
7	<b>CONCLUSÃO</b> .....	35
8	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	36

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. Aspectos Gerais das Macroalgas

As macroalgas constituem um grupo de organismos fotossintetizantes, não vasculares, dotados de estruturas reprodutivas que produzem esporos e são desprovidas de sementes e flores (South & Whittick, 1987). Várias características são semelhantes às plantas como: pigmentos acessórios à fotossíntese como os carotenóides (fucoxantina e  $\beta$ -caroteno), a clorofila *a* como principal pigmento fotossintético bem como as mesmas vias metabólicas básicas para sua síntese. Além destas semelhanças, as proteínas e os polissacarídeos biossintetizados também podem ser comparados com os das plantas. Também são encontrados nas algas pigmentos acessórios do tipo ficobiliproteínas (ficoeritrina, ficocianina e aloficocianina) (South & Whittick, 1987).

As macroalgas são agrupadas de acordo com critérios como: morfologia, ciclo de vida, composição da parede celular, natureza química dos produtos de reserva energética, bioquímica, biologia molecular, pigmentos fotossintéticos e a estrutura celular (Graham & Wilcox, 2000) em Chlorophyta, Ochrophyta e Rhodophyta (Wynne, 2005).

#### 1.1.1. Aspectos Gerais da Divisão Rhodophyta

É considerado o grupo de macroalgas com maior número de espécies, se comparadas com as Chlorophyta e Phaeophyceae (Woelkerling, 1990). As Rhodophyta são divididas em quatro classes: Florideophyceae, Compsopogonophyceae, Bangiophyceae e Rhodellophyceae (Wynne, 2005). A maioria é constituída por organismos pluricelulares marinhos (Lee, 1989; van den Hoek *et al.*, 1989).

Abundantes na região equatorial, porém ocorrem em todas as latitudes. São encontradas desde a região entre marés, onde predominam, e em profundidades até 200m (Lee, 1989).

As Rhodophyta possuem células eucarióticas, ausência de flagelos, presença de pigmentos acessórios como ficoeretrina (pigmento vermelho), ficocianina e aloficocianina (pigmentos azuis). Estes pigmentos acessórios estão organizados em estruturas denominadas ficobilissomos (Gantt, 1981; Zuber, 1986). O pigmentos fotossintetizante desta divisão, assim como nas plantas é a clorofila *a*. Quanto aos cloroplastos, estes não possuem tilacóides agregados e não se apresentam externamente ao reticulo endoplasmático (Woelkerling, 1990).

Os ficobilissomos auxiliam a clorofila *a* no fotossistema II (PS II) energizando-a, pois os pigmentos acessórios captam energia luminosa e a transferem ao PS II (Gantt, 1981; Talarico, 1996). Outra característica das Rhodophyta é a presença do amido das florídeas, principal produto de reserva, também conhecido como rodamilo (Raven, 1999).

Na divisão Rhodophyta existem várias famílias e gêneros com importância econômica, pois são produtoras de carragenana e ágar, por exemplo. Dentro desta divisão existem espécies do gênero *Gracilaria* (Greville) que são cultivadas para extração de polissacarídeos de parede celular sulfatados como a agarana (Bird *et al.*, 1986; Kain & Destombe, 1995; Oliveira & Plastino, 1994), sendo este grupo o maior responsável pela extração de ágar no mundo (Guimarães *et al.* 1999; Joly, 1977; Oliveira & Plastino, 1994).

### 1.1.2. O Gênero *Gracilaria* Greville

O gênero *Gracilaria* bem como outras espécies da divisão Rhodophyta apresentam ciclo de vida trifásico, onde as gerações são alternadas em haplóide, diplóide e uma fase diplóide que parasita a planta haplóide feminina (Joly, 1977, South & Whittick, 1987). Este grupo apresenta uma ampla distribuição, principalmente entre os trópicos, onde são encontrados em regiões protegidas de ondas e possuem alta tolerância às variações ambientais como salinidade, temperatura e circulação de água (Oliveira & Plastino, 1994). Existem no Brasil diferentes espécies de *Gracilaria*, entre elas a *G. domingensis* (Kützinger) Sonder *ex* (Dickie), produtora de ágar e que pode ser utilizada na dieta humana (comida *in natura*) (Guimarães *et al.*, 1999). *G. domingensis* é amplamente distribuída no litoral brasileiro, ocorrendo desde o Estado do Maranhão até o litoral de Santa Catarina (Nunes, 2005). O talo desta espécie pode possuir um comprimento em torno de 30 cm com o eixo achatado, sem constrição na base dos cistocarpos e dos ramos, estes últimos apresentam-se lateralmente ao eixo, os espermatângios possuem conceptáculos profundos (Oliveira, 2003).

## 1.2. Metais Pesados e as Macroalgas Marinhas

Nos últimos anos o aumento gradativo das ações industriais promoveu a contaminação de águas estuarinas, rios, lagos e águas costeiras por vários poluentes, entre eles os metais pesados (Calfa & Torem, 2007). A pesquisa de métodos para diminuir os níveis de poluição causados pela presença de metais pesados em efluentes líquidos, bem como seus efeitos em organismos aquáticos tornou-se extremamente importante (Amado-Filho *et al.*, 2008; Hashim & Chu, 2004). Muitas algas possuem a capacidade de produzir quelatinas para realizar a detoxificação dos metais pesados (Küpper, 2002), sendo uma das causas para que as algas possam sobreviver nestes ambientes (Hu *et al.*, 1996). Grupos carboxilas e sulfatos presentes nos polissacarídeos de algas marinhas das divisões Rhodophyta, Chlorophyta e a classe Phaeophyceae podem atrair e seqüestrar metais pesados (Ahalya *et al.*, 2003; 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 (Ahalya *et al.*, 2003; Alessandretti *et al.*, 2005; Andrade *et al.*, 2002; Calfa & Torem 2007; Hamdy, 2000; He *et al.*, 2008; Oliveira *et al.*, 2005; Sheng, 2004). Esta técnica apresenta um custo baixo em relação a outras técnicas de retirada de metais pesados (Ahalya *et al.*, 2003; Calfa & Torem, 2007). As paredes celulares das algas marinhas possuem polissacarídeos polianiônicos específicos que permite o seqüestro e precipitação de metais pesados mesmo em baixa concentração em efluentes líquidos industriais (Amado-Filho *et al.* 1997; Amado-Filho *et al.*, 1999; Silva *et al.* 2003). Alessandretti *et al.* (2005) avaliaram que freqüentemente as paredes celulares das algas são porosas, o que facilita a entrada de íons metálicos. Entretanto, o fato das algas servirem de produtores para muitas cadeias alimentares pode auxiliar na contaminação de outros organismos (Roberts *et al.*, 2006). Por outro lado, os íons metálicos, em meios aquosos se ligam a complexos orgânicos como citratos e aminoácidos e desta forma passam pelas membranas biológicas (Alessandretti *et al.*, 2005; Muse, 1999), o que por sua vez podem provocar alterações na ultraestrutura das algas (Talarico, 2002; Andrade *et al.*, 2004). Mesmo metais pesados essenciais na constituição de metaloenzimas como, por exemplo, o cobre, quando presentes em altas concentrações provocam danos às algas (Vallee & Ulmer, 1972). O cobre promoveu desorganização dos tilacóides de *Entheromorpha flexuosa* Wulfen (Andrade *et al.*, 2004), bem como, o decréscimo na taxa de crescimento de *Ulva fasciata* Delile (Lee *et al.*, 2005), *Kirchneriella aperta* Teiling Brunthaler (Lombardi & Vieira, 1999) e *Padina boergensenii* Allender & Kraft (Mamboya *et al.*, 1999). A interferência de cada metal pesado

na alga depende do metal, da concentração deste metal, tempo de exposição (Mamboya *et al.*, 1999) e dos mecanismos de quelação e detoxificação de cada alga (Lombardi *et al.*, 1998). Vallee & Ulmer (1972) acrescentam que os metais pesados não essenciais à formação de compostos orgânicos, como o chumbo e o cádmio, são extremamente tóxicos mesmo em pequenas concentrações, pois competem por sítios de ligação de metais essenciais. Metais pesados como o cádmio, estando presente no meio marinho, serão seqüestrados do meio por algas ricas em compostos sulfatados como ágar e carragenana (Hamdy, 2000; Hashim & Chu, 2004). Neste aspecto as Rhodophyta podem servir de biomonitores por acumularem metais pesados como cádmio, chumbo e cobre, devido à presença em grande proporção de ágar e carragenana na parede celular (Domouhtsidou *et al.*, 2000; Küpper *et al.*, 2002).

### 1.2.1. O Cádmio

O elemento químico cádmio é um metal de transição, na forma metálica apresenta-se cinza-esbranquiçado, mole e de fusão baixa se comparado a outros metais (Russel, 1981). Utiliza-se cádmio na manufatura de baterias, placas eletrônicas, pigmentos, estabilizador de catálises, como semicondutor em televisores e como componente de ligas metálicas (Hashim & Chu, 2004; Hu *et al.*, 1996), bem como no revestimento de ferro formando uma camada bem lisa que é auto restaurável quando sofre arranhões (Russel, 1981). O cádmio não faz parte de moléculas orgânicas, entretanto, quando presente, pode estar relacionado ao decréscimo na fotossíntese, na absorção de cálcio e na taxa de crescimento em macroalgas marinhas (Diannelidis & Delivopoulos, 1997; Visviki & Rachlin, 1992). Este metal pode ligar-se a metaloproteínas e metaloenzimas, que são enzimas e proteínas com sítios de ligação metálicos, neutralizando suas funções, percebe-se uma grande afinidade para ligar-se a grupos sulfatados. O cádmio também prejudica a conformação do DNA e RNA e possui efeitos teratogênicos (Vallee & Ulmer, 1972). O cádmio pode interferir na absorção de nutrientes importantes para as plantas como cálcio, magnésio, fósforo e potássio. Em milho foi verificada clorose devido ao cádmio ter provocado mudança na proporção de Fe/Zn (Das *et al.*, 1997). O cádmio é um poderoso inibidor enzimático (Lockwood, 1976), foi observada formação de grânulos de cádmio no interior das mitocôndrias de três espécies de algas verdes (Silverberg, 1976). Em um estudo realizado com *Gracilaria tenuistipitata* C. F. Chang & B. M. Xia observou-se que, esta espécie por estar em regiões costeiras, é uma das que mais acumula metais pesados como o cádmio, sendo este um dos metais de maior perigo de toxicidade para organismos aquáticos (Hu *et al.*, 1996). Estudos de bioadsorção de cádmio

mostraram que as algas vermelhas tais como: *G. edulis* (S.G. Gmelin) P. C. Silva, *G. changii* (B. M. Xia & I. A. Abbott) I. A. Abbott, J. Zhang & 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 Phaeophyceae como *Sargassum siliquosum* J. Agardh e *S. asperifolium* Hering & G. Martens ex J. Agardh (Hamdy, 2000; Hashim & Chu, 2004). O cádmio diminuiu a taxa de crescimento de *G. tenuistipitata* (Collén *et al.*, 2003) e *G. lemaneiformis* Bory de Saint-Vincent, Greville 1830 (Xia *et al.*, 2004) e *Ulva lactuca* (Kumar *et al.*, 2010). Foi visto que cádmio induziu stress oxidativo em cloroplastos de algas (Pinto *et al.*, 2003), peroxidação de lipídios e indução de stress oxidativo em *G. tenuistipitata* (Collén *et al.*, 2003). Foi verificado ainda que cádmio, em *G. lemaneiformis*, danificou as ficobiliproteínas interferindo na absorção de energia luminosa e sua conseqüente transferência para os centros de reação do fotossistema I e II (PSI e PSII) (Xia *et al.*, 2004).

## 2. JUSTIFICATIVA

As algas marinhas constituem recurso renovável de grande significado econômico, ainda pouco aproveitado no Brasil, especialmente as Rhodophyta. Neste grupo de algas destaca-se o gênero *Gracilaria* que apresenta demasiada importância como produtora de ágar e representa espécie potencial a ser cultivada no litoral catarinense. Por outro lado, 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. Como as algas representam um importante elo na cadeia alimentar, podem representar vias críticas de transferência desses elementos para o homem, bem como outros seres interferindo na biodiversidade. Assim, a proposta de analisar a interação de cádmio com a macroalga *G. domingensis* permitirá um aprofundamento dos estudos referentes ao potencial efeito deletério deste metal pesado sobre os organismos aquáticos, bem como compreender mecanismos adaptativos. Desta forma, será possível verificar as alterações morfológicas e fisiológicas decorrentes da presença deste metal. O presente trabalho poderá servir também como parâmetro para possíveis cultivos de *G. domingensis*, como fonte de dados para outras pesquisas relacionadas à ultraestrutura de algas quando tratadas com cádmio, além de subsidiar estudos relacionados aos efeitos do cádmio na biodiversidade.



### 3. OBJETIVOS

#### 3.1. Objetivo Geral:

- Avaliar os efeitos biológicos do metal pesado cádmio na fisiologia, morfologia e organização celular da macroalga vermelha *G. domingensis*.

#### 3.2. Objetivos Específicos:

- Verificar a interferência do cádmio na taxa de crescimento da alga em estudo.
- Demonstrar as possíveis alterações nos pigmentos fotossintetizantes, clorofila *a* e ficobiliproteínas, das plantas tratadas com cádmio.
- Avaliar comparativamente a taxa relativa de transporte de elétrons das clorofilas das plantas tratadas com metais pesados com as plantas controle.
- Analisar os tecidos tratados com metais pesados através de métodos citoquímicos.
- Avaliar as alterações superficiais provocadas por cádmio nas amostras.
- Detectar a presença por meio de análise de raios-X do cádmio nas células das amostras.
- Identificar as possíveis alterações na organização subcelular das amostras tratadas com o cádmio.

## 4. METODOLOGIA

### 4.1. Coleta e Processamento do Material Biológico

O estudo foi realizado no Laboratório de Algas Marinhas (LAMAR), Departamento de Biologia Celular, Embriologia e Genética (BEG), Centro de Ciências Biológicas (CCB), UFSC. As amostras de *G. domingensis* foram coletadas na praia de Ponta das Canas Florianópolis-SC (27°23'34"S e 48°26'11"W) no dia 14 de agosto de 2010, transportadas em sacos plásticos contendo água do mar, e reacondicionadas em sacos pretos para evitar a fotooxidação até a chegada ao Laboratório de Algas Marinhas (LAMAR), onde os talos foram lavados com água do mar filtrada e esterilizada, e removidos as epífitas.

### 4.2. Condições de Cultivo

As amostras de *G. domingensis* foram aclimatadas durante quatorze dias as condições de laboratório. Neste período as algas foram cultivadas em frascos erlenmeyer de 500 mL, contendo porções apicais da alga em estudo, com irradiância fotossinteticamente ativa (PAR) de  $80 \mu\text{m} \text{ fótons } / \text{m}^2 \text{ S}^{-1}$  (Li-cor light meter 250, Estados Unidos da América, USA). A temperatura de  $24 \text{ }^\circ\text{C}$  ( $\pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ ) e o fotoperíodo de 12 horas, sendo que o período de luz iniciou às 8 horas da manhã, com aeração contínua. A água do mar utilizada foi esterilizada em sistema de passagem em radiação ultravioleta. Após a esterilização essa água foi enriquecida com o meio von Stosch 50% (Edwards, 1970). Com salinidade de 34 ups (unidades padrão de salinidade).

Após o período de aclimação, as algas foram pesadas em balança de precisão, sendo separado um número de porções apicais que no conjunto pesavam 0.5g, para cada amostra do tratamento. Foram então colocadas em frascos erlenmeyer de 500 mL para serem tratadas com cloreto de cádmio ( $\text{CdCl}_2$ ) com três concentrações 100, 200 e 300  $\mu\text{M}$ , de acordo com Xia *et al.* (2004) e Talarico (2002), para algas vermelhas. Para cada tratamento e amostra controle foram feitas quatro réplicas. As plantas tratadas e controle foram submetidas às condições de cultura descritas acima durante 16 dias.

Para a adição de cádmio, foi feita uma solução estoque de cádmio de 10 mM de concentração utilizando-se 0,3666g de cloreto de cádmio dissolvido em 200 mL de água do mar filtrada e esterilizada. Diluiu-se 5 mL da solução mãe de cádmio de 10 mM em 500 mL de água do mar esterilizada e enriquecida com meio von Stosch (proporção descrita

anteriormente) para obtenção da cultura com concentração de 100 µM. Conseqüentemente para as concentrações de 200 µM e 300 µM utilizaram-se 10 mL e 15 mL da solução estoque, respectivamente.

### **4.3. As Taxas de Crescimento (TC).**

A taxa de crescimento dos segmentos apicais de *G. domingensis* foi avaliada através de medidas de peso da matéria fresca, a cada quatro dias, durante os dezesseis dias de tratamento. As taxas de crescimento foram obtidas a partir do aumento da massa fresca e apresentadas como porcentagem de crescimento diário, sendo calculada segundo a seguinte equação:

$TC (\% \text{ dia}^{-1}) = [(Mf / Mi) 1 / t - 1] \times 100$  (Penniman *et al.*, 1986) onde:

Mi = massa inicial em gramas

Mf = massa em gramas após 16 dias

t = tempo interno em dias

### **4.4. Extração e Dosagem dos Pigmentos Fotossintetizantes**

Para a extração dos pigmentos fotossintetizantes, as amostras provenientes dos tratados com cádmio e dos controles foram armazenadas em nitrogênio líquido. As extrações foram realizadas no Laboratório de Morfogênese e Bioquímica Vegetal (Itacorubi-Florianópolis). As análises foram realizadas em quadruplicatas.

#### **4.4.1. Extração e Dosagem de Clorofila *a***

A extração de clorofila *a* dos talos foi realizada utilizando o método de Hiscox & Israelstam (1979). A extração pigmentar foi realizada a partir de amostras de aproximadamente 250 mg de massa fresca para cada repetição. Aos talos foi acrescido 1 mL de dimetilsulfoxido (DMSO, Merck, Darmstadt, RFA), após, a clorofila foi extraída na solução sem macerar a 65° C por 30 minutos. No extrato líquido foi completado o volume para 3 mL da solução de DMSO. Todo o processo foi realizado no escuro a 4°C.

A dosagem da concentração de clorofila *a* foi realizada com 3 mL das amostras e transferidas para cubetas de vidro de 10mm, para leitura em espectrofotômetro Shimadzu 2301.

A calibragem do aparelho foi realizada com solução de DMSO. Os espectros de absorção foram obtidos registrando-se as absorbâncias no intervalo de 190 a 750 nm (UV-visível) com varredura de 1 segundo.

A determinação da concentração de clorofila *a* foi feita utilizando-se a equação descrita por Wellburn (1994):

$$CI-a = 13,8 A_{665}$$

Na fórmula descrita, a unidade foi  $\mu\text{g/mL}$ . Os valores obtidos foram convertidos em  $\mu\text{g/g}$  de massa fresca, multiplicando-se pelo volume do solvente utilizado e, posteriormente, dividido pela biomassa fresca da amostra. As análises foram realizadas em quadruplicatas.

#### 4.4.2. Extração e Dosagem das Ficobiliproteínas

A extração das ficobiliproteínas foi realizada a partir de amostras de aproximadamente 250 mg de massa fresca para cada repetição. Todo o processo foi realizado no escuro a 4° C. As amostras foram maceradas até a formação de um pó fino em almofariz congelado em nitrogênio líquido. O pó diluído em um total de 4 mL de tampão fosfato, pH 5,5. A solução foi centrifugada a 44000 xg por 20 minutos. O sobrenadante contendo as ficobiliproteínas foi retirado e mantido em tubos de ensaio vedados, até a leitura em espectrofotômetro.

A calibragem do aparelho foi realizada com soluções de tampão de fosfato. Os espectros de absorção foram obtidos registrando-os no intervalo de 190 a 750 nm (UV – visível) com varredura de 1 segundo.

A concentração de ficobiliproteínas foi determinada usando as equações descritas por Kursar *et al.* (1983):

$$AFC \text{ (aloficocianina)} = 181,3 A_{651} - 22,3 A_{614};$$

$$FC \text{ (ficocianina)} = 151,1 A_{614} - 99,1 A_{651};$$

$$FE \text{ (ficoeretrina)} = 155,8 A_{488,5} - 40,0 A_{614} - 10,5 A_{651}$$

Nas fórmulas descritas, a unidade foi  $\mu\text{g/mL}$ . Os valores obtidos foram convertidos em  $\mu\text{g/g}$  de massa fresca, multiplicando-se pelo volume do solvente utilizado e, posteriormente, dividido pela biomassa fresca da amostra. As análises foram realizadas em quadruplicatas.

#### 4.5. Medida da Taxa Relativa de Transporte de Elétrons

Ao término do experimento todas as réplicas de cada tratamento foram analisadas por medidas de fluorescência da clorofila usando um fluorímetro com amplitude de pulso modulado (PAM) (underwaterfluorometer Mergulho-PAM, Walz, Effeltrich, Alemanha). As configurações do PAM foram previamente avaliadas, para as espécies em condições *in vitro* e, uma vez definido, foram mantidas constantes (*gain* = 5 e intensidade de luz = 6). O intervalo dos pulsos de saturação foi 0.8s. Para todos os experimentos, as algas foram adaptadas ao escuro por 30 minutos antes das medições, e logo após, leituras PAM foram tomadas imediatamente. Os dados foram obtidos a partir da aplicação de uma série de oito exposições, para cada um dos quatro tratamentos (um controle e três tratamentos com metais), aumentando-se gradualmente os níveis de irradiância actínica, usando a Curva Rápida de Luz ("Rapid Light Curve" - RLC) opção de Mergulho do PAM. A técnica de RLC é uma aplicação útil para a investigação rápida do aparelho fotossintético e fornece informações sobre o desempenho global de fotossíntese de algas (White & Critchley, 1999).

#### 4.6. Processamento para Análises em Microscópio de Luz (ML)

As amostras foram fixadas em solução de paraformaldeído 2,5% em tampão fosfato 0,2 M, pH 7,2, 12 h, à temperatura de 4° C. Após a fixação, o material foi lavado em tampão fosfato, duas vezes, por 30 minutos em cada troca (Bouzon, 1993). Após a fixação, foram desidratados em uma série de soluções aquosas de etanol em concentrações crescentes (30%, 50%, 70%, 90%, 100%), a cada 30 minutos à temperatura ambiente. Após a desitratção as amostras foram pré-infiltradas com etanol a 100% e historesina glicolmetacrilato (GMA) nas proporção 1:1, durante 4h. Posteriormente, o material foi infiltrado em resina pura por 24 h. A inclusão foi feita em histo-moldes, adicionando-se polimerizador a mesma resina, à temperatura ambiente por 2-3 h (Arnold *et al.*, 1975, modificado).

Ao término do processo de inclusão as amostras foram seccionadas em micrótomo manual de parafina modelo LEICA RM 2135, com navalhas de tungstênio. As secções foram feitas com espessura de 4 µm, coletadas com pinça e distentidos nas lâminas de vidro com gotas de água destilada e secos a 37° em placa quente por 30 minutos.

As amostras do controle e dos diferentes tratamentos com cádmio foram processados para análises histoquímicas.

#### **4.6.1. Azul de Toluidina (AT-O).**

Corante utilizado para identificar polissacarídeos ácidos através da reação de metacromasia. As lâminas contendo as seções foram tratadas com solução aquosa de AT-O 0,5%, acidificadas com HCl 1N para pH 3,0 por 30 segundos, lavadas em água destilada e secas ao ar (Gordon & McCandless, 1973; McCully, 1970). As lâminas foram montadas com bálsamo do Canadá. Os cortes foram observados e fotografados em microscópio de luz Olympus com sistema de captura de imagem, câmara digital (Olympus Q-Color-3C América ind.). Através deste sistema de captura foi mensurado as espessuras das paredes celulares e do citoplasma de todos os tratamentos.

#### **4.6.2. Ácido Periódico de Schiff (PAS).**

Foi utilizado para identificar a presença de polissacarídeos neutros (amido e celulose). As seções foram oxidadas com solução aquosa de ácido periódico a 1% durante 30 minutos, lavadas em água corrente e coradas com reativo de Schiff por 30 minutos. Foram então, lavados em água corrente, secos ao ar e montados com bálsamo do Canadá (Gahan,1984). Os cortes foram observados e fotografados em microscópio de luz Olympus com sistema de captura de imagem, câmara digital (Olympus Q-Color-3C América ind.).

#### **4.6.3. Azul Brilhante de Coomassie (CCB).**

Utilizou-se este teste para marcar a presença de proteínas. As lâminas contendo as seções foram coradas por 45 min em CBB 4 % diluída em solução etanólica acidificada de Clark, posteriormente foram lavadas na mesma solução, seguido de água destilada e secos ao ar (Gahan, 1984). Os cortes foram observados e fotografados em microscópio de luz Olympus com sistema de captura de imagem, câmara digital (Olympus Q-Color-3C América ind.).

#### **4.7. Processamento para Análise em Microscópio Eletrônico de varredura (MEV)**

Para a análise no MEV as amostras do controle e dos diferentes tratamentos foram previamente lavadas com água destilada para retirada do excesso de cádmio. As amostras foram fixadas em solução de glutaraldeído 2.5 % tamponada com cacodilato 0.1 M (pH 7.2) e sacarose 0.2 M. A fixação foi realizada em overnight na geladeira, à temperatura de 4° C.

Posteriormente, o material foi lavado quatro vezes em tampão cacodilato 0.1 M, pH 7.2 (30 minutos cada lavagem) e depois das lavagens os espécimes foram pós-fixados em OsO<sub>4</sub> (tetróxido de ósmio) a 1% em tampão cacodilato 0.1 M, pH 7.2 (1:1), durante 4 h à temperatura ambiente. Em seguida as amostras foram desidratadas em uma série de soluções aquosas de concentrações crescentes de etanol (30%, 50%, 70%, 90% e 100%), sendo 30 minutos em cada etapa; na última série de 100% trocada três vezes. No final da desidratação, os fragmentos das plantas foram transferidas para o ponto crítico, modelo Leica EMCD-030. Depois de seco os materiais foram colados nos suportes metálicos, onde parte das amostras foram seccionadas transversalmente e deitadas sobre a cola no suporte metálicos, e recobertos com ouro (Metalizador Blatec, CED 030). Foram observados e fotografados em microscópio de varredura modelo Jeol 6390 LV no Laboratório Central de Microscopia Eletrônica- LCME da UFSC. Para detecção do cádmio nas células foi preparadas amostras para MEV como já descritas anteriormente, porém não foi utilizado a pós-fixação em OsO<sub>4</sub> (tetróxido de ósmio) e para o recobrimento utilizou-se carbono. Para a análise foi utilizado o Detector EDS-Thermoelectro, aparelho acoplado ao microscópio de varredura (MEV) Jeol modelo 6390 LV aferindo-se uma aceleração de elétrons de 15 KV.

#### **4.8. Processamento para Análise em Microscópio Eletrônico de Transmissão (MET).**

Para a análise no MET as amostras provenientes do controle e dos tratamentos foram fixadas em solução de glutaraldeído 2.5 %, sacarose 0.2 M, tamponada com cacodilato 0.1 M (pH 7.2). A pré-fixação foi realizada em overnight na geladeira. A pré-fixação foi seguida por quatro lavagens (30 minutos cada lavagem) no mesmo tampão e sacarose em concentrações decrescentes. Depois das lavagens os espécimes foram pós-fixados em OsO<sub>4</sub> (tetróxido de ósmio) a 1% em tampão cacodilato 0.1 M, pH 7.2 (1:1), durante 4 h à temperatura ambiente (Pueschel, 1979; Bouzon *et al.*, 2000).

Posteriormente, o material foi lavado três vezes em tampão cacodilato 0.1 M, pH 7.2 (30 minutos cada lavagem) em seguida lavado em água destilada (30 minutos) e desidratado em uma série de soluções aquosas de concentrações crescentes de acetona (30%, 50%, 70%, 90% e 100%), sendo 30 minutos em cada etapa; na última série de acetona 100% trocada três vezes. Após então foram infiltrados com resina Spurr receita *soft* (Spurr, 1969). A infiltração foi realizada em sete etapas, durante quatro dias em resina Spurr diluída em acetona nas proporções de 1:3, 1:2, 1:1, 2:1 e 3:1 todas as concentrações por 12 horas, seguida de resina

pura 24 horas. Logo após a infiltração, o material incluído foi polimerizado em moldes horizontais em estufa a 70° C por 24 h. As seções ultrafinas foram feitas com navalha de diamante e contrastadas em acetato de uranila e citrato de chumbo de acordo com os procedimentos de Reynolds (1963). As amostras dos tratamentos e controles foram observadas e fotografadas em microscópio eletrônico de transmissão (MET) JEOL modelo (JEM) 1011 no LCME.

#### **4.9. Tratamento da Vidraria e Materiais de Descarte após sua Utilização**

Depois de utilizada toda a vidraria, esta ficou de molho em HNO<sub>3</sub> a 10% em overnight, após este processo, ficou submersa em solução de hipoclorito e detergente neutro por duas horas, enxaguada por dez vezes em água e uma vez em água destilada. Por fim, foram esterilizados em estufa modelo J-prolab SE-4 por duas horas a 180°C.

Toda a vidraria deste experimento foi separada das demais vidrarias do laboratório. Os materiais descartáveis e água que tiveram contato com o cádmio foram enviados para empresa de descarte de materiais tóxicos.

#### **4.10. Análise e Interpretação de Dados**

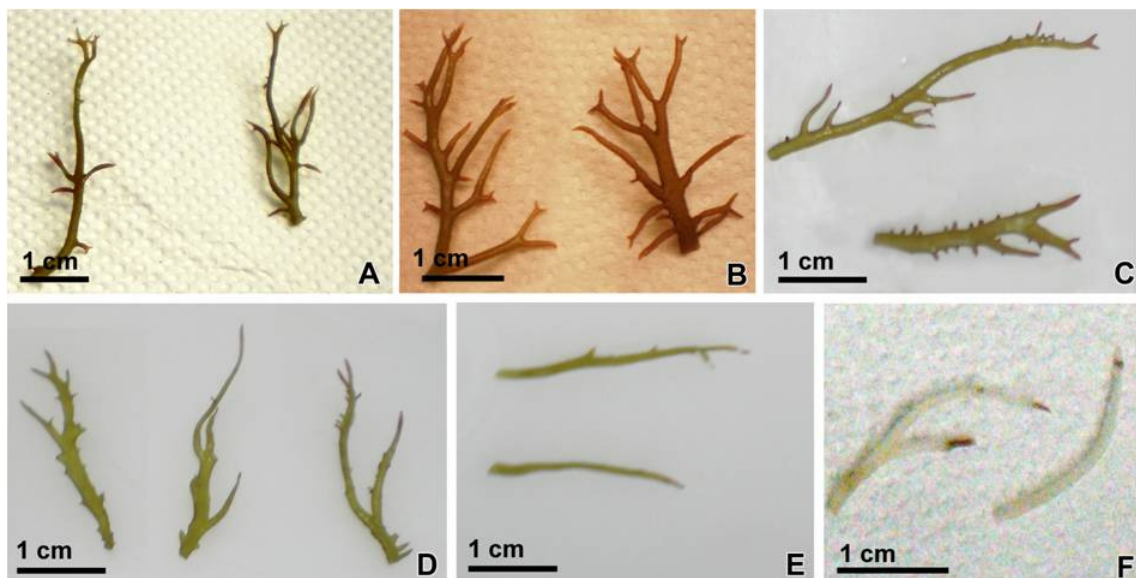
Os dados obtidos foram submetidos à análise da variância-unifatorial ANOVA, seguida do teste *a posteriori* de Tukey para verificar as significâncias das diferenças ( $p < 0,05$ ) entre as taxas de crescimento, pigmentos fotossintetizantes e eficiência fotossintética para os tratamentos com diferentes concentrações de cádmio e controles. Todas as análises foram realizadas no Programa *Statistica* (versão 6.0).



## 5. RESULTADOS

### 5.1. Efeito do Cádmio na Morfologia Externa dos Segmentos Apicais de *G. domingensis*

Ao início do experimento, as porções apicais de *G. domingensis* (Fig. 1) apresentavam-se avermelhadas com formato cilíndrico achatado (Fig. 1A), após o experimento as porções apicais controle tornaram-se maiores e mais ramificadas (Fig. 1B). Conforme o aumento da concentração de cádmio, as amostras tornaram-se cada vez mais esbranquiçadas e menos ramificadas (Fig. 1C, D e E). Algumas amostras apresentaram despigmentação em quase em toda a sua extensão.



**Figura 1:** Porções apicais de *G. domingensis* utilizadas no experimento com cádmio. **A:** Amostra inicial. **B:** Amostra controle após os 16 dias de cultivo. **C:** Porção apical após tratamento com 100  $\mu\text{M}$  de cádmio durante 16 dias. **D:** Porção apical após tratamento com 200  $\mu\text{M}$  de cádmio durante 16 dias. **E:** Porção apical após tratamento com 300  $\mu\text{M}$  de cádmio durante 16 dias. **F:** Porções apicais despigmentadas após o tratamento com 300  $\mu\text{M}$  de cádmio durante 16 dias.

### 5.2. Taxa de Crescimento

Durante todo o período experimental as taxas de crescimento das amostras controle foram maiores que as dos diferentes tratamentos. Os primeiros quatro dias de cultivo das plantas controle houve um crescimento de 8,2% ao dia, seguido de 8,5% ao dia do quinto ao oitavo dia, 8% ao dia do nono ao décimo segundo. Nos últimos quatro dias observou-se uma

redução na taxa de crescimento das plantas controle que tiveram um índice de 5,8% ao dia (Fig. 2)

Todas as medidas dos tratamentos mostraram-se menores taxas de crescimento quando comparadas ao controle. Com exceção da medida do 12º dia onde nas concentrações de 200 e 300µM a taxa de crescimento foi igual, todas as outras medidas apresentaram as taxas de crescimento decrescente de acordo com o aumento da concentração de cádmio, ou seja, quanto maior a concentração de cádmio menor a taxa de crescimento. Nos primeiros quatro dias de cultivo a taxa de crescimento diária dos tratamentos de 100, 200 e 300 µM de cádmio foram de 3.9%, 2.8% e 2% respectivamente; no oitavo dia foram 2.1%, 1.6% e 0.9% respectivamente; já no décimo segundo dia foram obtidas as taxas de crescimento de 1.4% para o tratamento de 100 µM de cádmio e 0.9% para os tratamentos de 200 e 300 µM de cádmio, finalmente as medidas de taxa de crescimento do décimo sexto dia foi de 1.2%, 1.1% e 0.8% para os tratamentos de 100, 200 e 300 µM de cádmio respectivamente (Fig. 2).

Segundo o teste *a posteriori* de Tukey, nos primeiros quatro dias de cultivo existiu uma diferença na taxa de crescimento significativa entre o controle e os tratamentos com 100 µM de cádmio e 300 µM de cádmio, bem como entre estes tratamentos. Porém através deste mesmo teste não foi identificado uma diferença substancial entre os tratamentos com cádmio 100 µM e 200 µM, o mesmo foi verificado entre 200 µM e 300 µM.

Para o oitavo dia de cultivo há diferença entre o controle e todos os tratamentos, o mesmo foi observado entre os tratamentos de 100 µM e 200 µM em relação ao tratamento com 300 µM de cádmio. Entre o cultivo com 100 µM e 200 µM de cádmio não houve diferença substancial.

Após o oitavo dia de cultivo observou-se a continuidade da diferença na taxa de crescimento do controle em relação aos tratamentos com cádmio, porém as diferenças entre as diferentes concentrações de cádmio não foi substancial.

**Figura 2:** Taxas de crescimento dos segmentos apicais das plantas de *G. domingensis* controle e de diferentes concentrações de cádmio, cultivados durante 16 dias. Valores apresentados em médias (n=4). As barras verticais representam o cálculo do erro padrão. As letras distintas e minúsculas significam as diferenças entre o controle e os tratamentos com diferentes concentrações de cádmio, segundo o teste *a posteriori* de Tukey.

### 5.3. Pigmentos

A quantificação de clorofila *a* mostrou uma maior concentração deste pigmento no controle (88.61µg/g de massa fresca) em relação aos tratamentos com o cádmio nas concentrações de 100 µM (74.37 µg/g de massa fresca), 200 µM (72.63µg/g de massa fresca) e 300 µM (61.3µg/g de massa fresca), inferindo que o cádmio interferiu nas concentrações de clorofila *a*. Através do teste *a posteriori* de Tukey foi observado que existe diferença significativa do controle em relação a cada um dos tratamentos, porém a diferença não foi significativa entre os tratamentos com cádmio.

A quantificação das ficobiliproteínas demonstrou que existe uma maior concentração de aloficocianina (AFC), ficocianina (FC) e ficoeritrina (FE) no controle em relação aos tratamentos com cádmio. Ao analisar no teste *a posteriori* de Tukey observou-se que existe diferença significativa do controle em relação a cada um dos tratamentos e diferença significativa também entre os tratamentos com cádmio.

#### 5.4. Taxa Relativa de Transporte de Elétrons

As análises realizadas com o PAM indicaram que o cádmio interfere no correto funcionamento do fotossistema II. A taxa relativa de transferência de elétrons do controle (Fig. 3) mostrou uma curva bem mais acentuada que nos tratamentos com cádmio. Nestes houve um leve decréscimo nas curvas conforme o aumento de concentração de cádmio.

**Figura 3:** Taxa Relativa de transporte de elétrons *versus* luz fotossintética emitida e medida pelo PAM nas amostras de *G. domingensis*. Os dados representam a média das quatro réplicas realizadas com cada tratamento.

#### 5.5. Microscopia de Luz

As seções transversais das plantas controle de *G. domingensis*, quanto coradas com AT-O, foi possível observar a distribuição das células no interior do talo. A região cortical é formada por células pequenas, uma a duas camadas, que são revestidas externamente por uma mucilagem metacromática. As células aumentam gradativamente de tamanho em direção ao interior do talo formando as regiões subcorticais e medulares. Todas as células, tanto da camada cortical quando as subcorticais e medulares são envolvidas por paredes celulares metacromáticas ao AT-O indicando a riqueza de grupamentos ácidos. Entretanto, no citoplasma destas células predominou a reação ortocromática indicando a ausência de grupamentos ácidos (Fig. 4A). As plantas tratadas com cádmio mantêm a mesma organização interna do talo, porém, apresentaram um aumento da espessura das paredes celulares especialmente na região superior das células corticais. A parede celular destas células

apresentou várias camadas concêntricas com reação metacromática mais intensa nesta região (Fig. 4B-E).

Quando tratadas com PAS as células em seções transversais das plantas controle, mostraram distribuição quase homogênea de grãos de amido nos diferentes tipos celulares, com uma concentração um pouco mais acentuada nas células subcorticais (Fig. 5A). Em contrapartida, as células das plantas tratadas com cádmio, nas diferentes concentrações, mostraram um aumento crescente de grãos de amido especialmente nas células corticais e subcorticais (Fig. 5B-D). As paredes celulares, tanto das células das plantas controle quanto das tratadas, reagiram fracamente à reação de PAS indicando que não ocorreu aumento na deposição de polissacarídeos neutros na parede celular mesmo após o tratamento com cádmio.

Quando tratadas com CBB, nas plantas controle, o citoplasma das células corticais reagiu de forma mais intensa, indicando uma maior concentração de organelas de natureza protéica nestas células do que nas células subcorticais e medulares (Fig. 6A). Entretanto, nas plantas tratadas com cádmio, este aumento de reação ao CBB foi mais evidente, indicando redução no volume celular e um provável aumento do conteúdo protéico em organelas ou estruturas ricas em proteínas (Figs. 6B-D). Este aumento de intensidade de reação no citoplasma das células corticais foi mais intenso com o aumento da concentração de cádmio nos tratamentos. Esta coloração permitiu, também, observar que as células são multinucleadas tanto das plantas controle quanto nas tratadas.

**Figura 4:** Seções transversais de *G. domingensis* coradas com azul de toluidina (AT-O). **A:** Planta controle com reação metacromática na parede celular (seta) e na mucilagem que envolve o talo (cabeça de seta). **B-D:** Plantas tratadas com 100, 200 e 300 $\mu$ M de cádmio respectivamente. Parede celular (PC) com coloração metacromática observa-se o espessamento lenticulado onde as bandas de deposição da parede celular tornam-se evidentes (seta), **E:** Detalhe da figura **4D** mostrando camadas concêntricas na região apical das células corticais. . Granulações ácidas são observadas no interior celular (asterisco).

**Figura 5:** Seções transversais de *G. domingensis* coradas com ácido periódico de Schiff (PAS). **A:** Controle com células ricas em grãos de amido (cabeça de seta) parede celular fracamente positiva (seta). **B – D:** tratamentos com 100, 200 e 300 $\mu$ M de cádmio respectivamente. As paredes celulares das células corticais (PC) com fraca reação positiva, setas indicam o espessamento lenticulado. Grãos de amido das florídeas densamente acumulado nas células corticais e subcorticais (cabeça de seta).

**Figura 6:** Seções transversais de *G. domingensis* coradas com azul brilhante de coomassie (CBB). **A:** Planta controle com reação positiva concentrada na região parietal das células, nos núcleos (cabeça de seta) e nas conexões intercelulares (setas). **B-D:** Plantas tratadas com 100, 200 e 300 $\mu$ M de cádmio respectivamente com reação citoplasmática intensa especialmente nas células corticais. Reação positiva com núcleo (cabeça de seta) e conexões intercelulares (seta).



### 5.6. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A superfície do talo de *G. domingensis*, das amostras controle, é revestida por uma mucilagem que adquire aspecto enrugado durante preparo para o MEV (Fig. 7A). Com o aumento da concentração de cádmio nas culturas, a camada de mucilagem tornou-se delgada e mais frágil. Esta redução, na espessura, foi observada pela presença de esparsos fragmentos de mucilagem na superfície das amostras dos tratamentos, com concentrações de 100 $\mu$ M, 200 $\mu$ M e 300 $\mu$ M de cádmio no meio de cultura, quando observadas no MEV (Fig. 7B-C-D).

Nas amostras controle, esta mucilagem também pode se romper durante o processamento das amostras, assim sendo, em algumas áreas onde houve o rompimento, foi possível fazer imagens da superfície das células corticais sem mucilagem (Fig. 7A). Estas células corticais, sem mucilagem, são elevadas em forma de domo, com superfície lisa e espaçamento em sulco entre elas (Fig. 7A). Por outro lado, a superfície das células tratadas com cádmio foi possível visualizar um enrugamento gradativo da superfície das paredes celulares das células corticais com o aumento da concentração e também redução na profundidade dos sulcos entre as células (Fig. 7B-D).

Em corte transversal, observou-se que as células corticais das plantas controle são pequenas, com citoplasma denso diferindo das células subcorticais e medulares que são gradativamente maiores, com presença de vacúolo que desloca o conteúdo citoplasmático para a periferia onde foram observados os grãos de amido (Fig. 7I). Nos cortes transversais, das amostras tratadas com cádmio, foi possível perceber um espessamento da parede celular (Fig. 7J, K, L, M). Quando comparadas com as amostras controle (Fig. 7I), com o aumento crescente na concentração de cádmio, ocorreu também um aumento gradativo dos grãos de amido e a descaracterização da região de células subcorticais que estavam bem definidas nas plantas controle (Fig. 7J, K, L, M). Estes resultados corroboram os dados obtidos na microscopia de luz.

**Figura 7:** Talos de *G. domingensis* observados no MEV. A região apical do controle revestida por mucilagem. **B-D:** Ápice das amostras tratadas com 100 $\mu$ M, 200 $\mu$ M e 300 $\mu$ M respectivamente. Observe os fragmentos de mucilagem (setas). **E-H:** Superfície das células corticais sem mucilagem, **E:** Controle e **F-H:** Células corticais 100 $\mu$ M, 200 $\mu$ M e 300 $\mu$ M. **I-L:** Seções transversais do talo, sendo **I**, seção das plantas controle e **J-K** dos diferentes tratamentos em concentrações crescentes de cádmio. Observe o acúmulo de grãos de amido das florídeas (\*) nas células **M:** Ampliação da imagem do corte transversal da figura L mostrando o espessamento da parede das células corticais após o tratamento com 300 $\mu$ M de cádmio. Célula cortical (CC), célula subcortical (CS), célula medular (CM)

### 5.7. Detecção de Cádmio por emissão de raios-X (EDS).

A análise de presença de cádmio nas amostras de *G. domingensis* é qualitativa, tendo em vista que esta análise foi feita somente em áreas específicas de modo superficial. Na mucilagem e na superfície externa das células corticais, a detecção de cádmio em todas as amostras foi negativa. Provavelmente o processamento para o MEV tais como lavagens com tampão e desidratações tenham retirado o cádmio presente na mucilagem, bem como da superfície externa da parede celular das células corticais. Entretanto, nas amostras cortadas transversalmente, com o uso do EDS, constatou-se a presença de cádmio, nas paredes em células corticais tratadas com 300  $\mu$ M de cádmio(Fig. 8D). Outro fator constatado foi o aumento do pico de enxofre das amostras tratadas com cádmio, indicando aumento da concentração dos compostos sulfatados.



**Figura 8:** Espectro de raios-X (EDS) para detecção de cádmio nas paredes celulares das células corticais, em corte transversal, de *G. domingensis* do controle e tratadas com cádmio em diferentes concentrações. **A:** Planta controle com ausência de cádmio. **B:** Tratamento com 100  $\mu\text{M}$ , cádmio positivo. **C:** Tratamento com 200  $\mu\text{M}$ , cádmio positivo. **D:** Tratamento com 300  $\mu\text{M}$ , de cádmio positivo.

### 5.8. Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

Quando observadas no MET as células corticais e subcorticais, das amostras controle, apresentaram a maior parte de seu interior preenchida por cloroplastos e grãos de amido e núcleo (Fig. 9A). Estas células são envolvidas por uma espessa parede celular constituída por microfibrilas concêntricas de celulose, com diferentes elétrons-densidades, embebidas em uma matriz amorfa elétron-transparente (Fig. 9B). Os cloroplastos são alongados e se moldam à morfologia celular (Fig. 9C). Possuem uma estrutura típica dos cloroplastos das algas vermelhas, com tilacóides paralelos livres sem formar pilhas (Fig. 9C e D). Glóbulos elétron-densos, osmiófilicos, os plastoglóbulos, distribuídos entre os tilacóides, foram observados no interior dos cloroplastos (Fig. 9A e E). Estas células possuem núcleo central envolvidos pelos grãos de amido (Fig. 9A, C e D). Nestas células, os grãos de amido, observados na região perinuclear, constituem o principal composto de reserva e são armazenado no citoplasma (Fig. 9D) ou por toda a célula (Fig. 9A e E). Próximos aos grãos de amido foram visualizados corpos tubulares semelhantes a microtúbulos (Fig. 9F).

Quando tratados por 16 dias com 100  $\mu\text{M}$  de cádmio, as células corticais de *G. domingensis* apresentaram diversas alterações na organização subcelular quando comparadas as do controle. Foi destacado aumento de espessura da parede celular, bem como na quantidade de domos de crescimento (Fig. 10A). Dentre outras alterações que foram observadas, observou-se que os cloroplastos perderam a organização típica dos tilacóides (Fig. 10B e C), bem como o aumento no número de plastoglóbulos (Fig. 10B). As paredes celulares entre as células corticais também apresentaram um aumento na espessura (Fig. 10D). Nestas células, os corpos de Golgi, com morfologia irregular, foram também observados associados à produção de muitas vesículas (Fig. 10E). Nas células subcorticais, tratados por 16 dias com 100  $\mu\text{M}$  de cádmio, quando comparadas com as do controle, também foram observadas alterações na organização celular. As principais mudanças foram: aumento de grãos de amido e vesículas com compostos, aparentemente, formadores de parede celular (Fig. 10F e G). Estas vesículas foram observadas em contato como meio extracelular sugerindo processo de exocitose (Fig. 10F). Foi freqüente a presença de vacúolos com granulações elétron-densas (Fig. 10G) e cloroplastos com parte dos tilacóides desorganizados e bem como aumento no número de plastoglóbulos (Fig. 10H).

**Figura 9:** Plantas controle de *G. domingensis* visualizadas no MET. **A:** Corte longitudinal de célula cortical (CC) e subcortical (SC) com parede celular microfibrilar, cloroplastos e grãos de amido. **B:** Detalhe da parede celular, microfibrilas (seta). **C:** Detalhe da célula cortical com cloroplastos grandes associados a grãos de amido, parede celular entre células corticais. **D:** Célula cortical com núcleo central, com nucléolo evidente, mitocôndrias, cloroplasto e grãos de amido. **E:** Detalhe de uma célula subcortical, observe a parede celular, cloroplasto, plastoglóbulos e grãos de amido. **F:** Detalhe de uma célula subcortical mostrando estruturas tubulares (seta), próximas a grãos de amido. Cloroplasto (C) Grãos de amido (A), parede celular (PC), plastoglóbulos (P), mitocôndria (M) núcleo (N) e nucléolo (Nu).

**Figura 10:** Micrografias de *G. domingensis* tratadas com 100  $\mu\text{M}$  de cádmio por 16 dias, observadas no MET. **A-F:** Célula cortical. **A:** Célula cortical com parede celular destacando as camadas em forma de domos de crescimento (seta), cloroplastos e grande quantidade de grãos de amido. **B:** Detalhe de um cloroplasto (C), mostrando os plastoglóbulos (P). Microfibrilas de celulose (seta). **C:** Cloroplasto com tilacóides desorganizados e plastoglóbulos agrupados. **D:** Detalhe de parede celular entre células corticais com microfibrilas de arranjos diversos (setas). **E:** Corpo de Golgi e vesículas associadas (seta). **F:** Detalhe de vesículas (seta) com material de formação de matriz da parede celular. **G-H:** Célula subcortical. **G:** Detalhe de um vacúolo (V) apresentando

granulações (seta). I: **H**: Detalhe de um cloroplasto com plastoglóbulos de diferentes tamanhos (seta). Cloroplastos (C), grãos de amido (A), plastoglóbulos (P), parede celular (PC), núcleo (N) e vacúolos (V).

O tratamento de *G. domingensis* durante 16 dias com 200  $\mu\text{M}$  de cádmio provocou maiores alterações do que o observado nas plantas cultivadas com 100  $\mu\text{M}$  de cádmio. Tanto nas células corticais e quanto nas subcorticais foi observado grande um aumento na espessura das paredes celulares (Fig. 11A). Na parede celular da célula cortical, mais periférica, além de espessa, apresentou granulações elétron-densas distribuídas entre as microfibrilas (Fig. 11B). Os cloroplastos adquiriram aspecto disforme sem limite definido. Alguns grãos de amido apresentaram forma irregular se comparados com o controle. Nestas células, pequenos vacúolos granulares também foram observados (Fig. 11C). As células subcorticais mostraram morfologia irregular acompanhada a um aumento no número de grãos de amido (Fig. 11D). Nestas células ocorreram muitos vacúolos de formato irregular, alguns deles ricos em granulações (Fig. 11E – G). Também foi possível observar mitocôndrias com conteúdo denso e também de grãos de amido com granulações (Fig. 11F e G). Nas células medulares o vacúolo também apresentou conteúdo granular e aumento na quantidade de grãos de amido (Fig. 11H). Estes grãos de amido apresentaram morfologia irregular e também granulações no conteúdo (Fig. 11I).

O tratamento de *G. domingensis* com 300  $\mu\text{M}$  de cádmio durante 16 dias, provocou alterações ultraestruturais mais severas que nos outros tratamentos (Fig. 12). Nas células corticais, além do aumento da espessura da parede, houve aumento no número e tamanho de vacúolos (Fig. 12A). A parede celular, assim como no tratamento de 200  $\mu\text{M}$ , apresentou granulações entre as fibrilas (Fig. 12B). Os cloroplastos só foram identificados porque os plastoglóbulos, apesar de alterados, foram observados (Fig. 12A-D). Próximos aos cloroplastos pequenos grãos de amido e vacúolos com muitas granulações estavam presentes (Fig. 12C). A maioria das células corticais apresentou grande desordem na ultraestrutura (Fig. 12D). Nas células subcorticais foi possível perceber que os grãos de amido são menores quando comparados, principalmente, com os observados nas células das plantas controle (Fig. 12E). Como nas células corticais, as células subcorticais sofreram grandes alterações na ultraestrutura. Destacou-se nestas células alteração plastoglóbulos que adquiriram aspectos granular bem como o aumento destas estruturas (Fig. 12H). Outra alteração percebida nas células subcorticais foi a presença de corpos membranosos (Fig. 12G).

**Figura 11:** *G. domingensis* tratadas com 200  $\mu\text{M}$  de cádmio por 16 dias observadas no MET. **A:** Corte longitudinal de células corticais (CC) e subcorticais (SC) com espessa parede celular e citoplasma denso. **B:** Detalhe da parede celular da célula cortical da camada mais externa mostrando granulações (seta) e domos de crescimento (cabeça de seta). **C:** Cloroplasto de célula cortical com conteúdo desorganizado destacando o genóforo (seta) e grãos de amido próximos a vacúolos. **D:** Célula subcortical com muitos grãos de amido. **E:** Detalhe de vacúolos fibrilares com morfologia irregular e pequenos grãos de amido. **F:** Vacúolos granulares próximos a mitocôndrias e cloroplastos. **G:** Vacúolos granulares (seta) associados a grãos de amido e também a cloroplastos com tilacóides desorganizados (cabeça de seta). Observam-se ainda granulações nos grãos de amidos. **H:** Visão geral de uma célula medular com a presença de um grande vacúolo. **I:** Detalhe de grãos de amido apresentando granulações. Cloroplasto (C) Grãos de amido (A), parede celular (PC), plastoglóbulos (P), mitocôndria (M), vacúolo (V).



**Figura 12:** *G. domingensis* tratadas com 300  $\mu\text{M}$  de cádmio por 16 dias e observadas no MET. **A:** Visão célula cortical (CC) onde é visível a espessa parede celular e grande número de vesículas (seta). **B:** Detalhe da parede celular mostrando granulações (seta). **C:** Detalhe da célula cortical mostrando o vacúolo com granulações. **D:** Célula cortical com muitos grãos de amido (A) diminutos e com grande desordem na ultraestrutura. **E:** Visão geral de uma célula subcortical com muitos grãos de amido, os cloroplastos possuem vários plastoglóbulos. **F:** Detalhe da célula subcortical mostrando cloroplastos com plastoglóbulos alterados. **G:** Cloroplastos com tilacóides desorganizados (seta). Corpos membranosos estão presentes no citoplasma (cabeça de seta). Observam-se ainda granulações nos grãos de amido. **H:** Vacúolo apresentando muitas granulações e cloroplasto com vários plastoglóbulos. Cloroplasto (C) Grãos de amido (A), parede celular (PC), plastoglóbulos (P), vacúolo (V).

## 6. DISCUSSÃO

A presença de cádmio no meio interferiu nas amostras tratadas com as concentrações de 100, 200 e 300  $\mu\text{M}$  de cádmio. As amostras controle de *G. domingensis* apresentaram maior taxa de crescimento que o observado nas plantas tratadas com cádmio, provavelmente, devido ao estresse gerado pela presença do cádmio no meio como um agente competidor em rotas metabólicas. Nos últimos dias de cultivo houve decréscimo na taxa de crescimento (TC) do controle, ainda assim maior que TC das plantas tratadas. O volume das amostras era superior em relação ao início do experimento. Isto resultou num aumento da relação amostra-nutriente o que por sua vez diminuiu a disponibilidade de nutrientes, resultando na limitação do crescimento das plantas controle. Cólle *et al.* (2003) observou que *G. tenuistipitata* em contato com cobre e cádmio produz espécies reativas de oxigênio (ERO), estas por sua vez, promovem alterações em lipídios, proteínas e ácidos nucleicos. Para confrontar o efeito deletério de metais pesados as algas podem produzir compostos quelantes como os grupamentos não tióis, polissacarídeos sulfatados além de produzir compostos de defesa antioxidante como: flavonóides, tocoferóis e carotenóides e enzimas (Küpper, 2002). Provavelmente, estas mudanças em vias metabólicas seriam algumas das razões da menor taxa de crescimento nos tratamentos com cádmio observado em *G. domingensis*. Este decréscimo da taxa de crescimento serve como bioindicador da toxicidade dos metais pesados (Visvik & Rachlin, 1992).

Além do decréscimo na taxa de crescimento observou-se menor ramificação das porções apicais, bem como a despigmentação das amostras tratadas com cádmio. A despigmentação corroborou com o decréscimo na concentração de pigmentos acessórios, as ficobiliproteínas como: ficoeritrina, ficocianina e aloficocianina; observadas nos tratamentos com cádmio. Os pigmentos acessórios, característica de uma Rhodophyta, além de promoverem a cor vermelha auxiliam o centro de reação do fotossistema II, captando energia solar e repassando para este fotossistema, excitando a clorofila *a*, estabelecendo um fluxo de elétrons (Gantt, 1981; Talarico, 1996). A análise da taxa relativa de transporte de elétrons (ETR) com o PAM demonstrou que houve redução do transporte de elétrons nas amostras em contato com cádmio. Xia *et al.* (2004) também encontrou decréscimo na quantidade de ficobiliproteínas e ETR ao tratar *G. lemaneiformis* com cobre e cádmio. Estes autores atribuíram correlação entre o decréscimo de ficobiliproteínas e ETR, pois quando há

diminuição na quantidade de ficobiliproteínas menos energia luminosa é captada e repassada ao fotossistema II, diminuindo por fim a ETR.

As amostras cultivadas com cádmio apresentaram aumento de espessura da parede celular, visualizadas ao ML e ao MEV. Nas análises citoquímicas AT-O e PAS observou-se que o aumento da espessura da parede celular ocorreu na forma de domos. A maior intensidade da reação da parede celular com o AT-O indica uma maior deposição de compostos sulfatados como o ágar. Com a técnica de PAS que verifica a presença de polissacarídeos neutros como a celulose não houve aumento de intensidade de reação. Analisadas ao MEV os tratamentos com cádmio apresentaram espessamento de parede celular. As paredes celulares analisadas ao MET dos tratamentos com cádmio mostram além do espessamento de parede um aumento na quantidade de matriz amorfa, entre os componentes desta matriz está o ágar, em relação às fibrilas de celulose. Segundo Diannelidis e Delivopoulos (1997), o grau de sulfatação de um composto refere-se à capacidade deste sequestrar e quelar metais pesados. Quando analisadas com EDS houve detecção de cádmio na parede celular das amostras tratadas com 300  $\mu\text{M}$  de cádmio. As paredes celulares de todos os tratamentos com cádmio apresentaram granulações quando analisadas ao MET. Talarico (2002) observou granulações metálicas na parede celular de *Audouinella saviana* após tratamento com cádmio. Sugere-se que as granulações observadas nas paredes celulares das amostras de *G. domingensis* tratadas com cádmio sejam aglomerações deste metal. Juntamente com o espessamento da parede foi observada uma diminuição da região citoplasmática. As medidas feitas ao ML na técnica de AT-O foram corroboradas com as visualizações realizadas ao CBB e MEV. Ao MET foi observada vesículas de deposição em algumas amostras de tratamentos com cádmio. Para realizar a síntese da parede celular as células depositam, através de vesículas, substâncias de matriz de parede logo abaixo da parede celular, aumentando a espessura de parede e reduzindo o citoplasma.

Foi observado um aumento de vacuolização das células corticais e subcorticais tratadas com cádmio nas análises realizadas ao MET. Outro fator observado foi a presença de granulações elétron-densas nos vacúolos dos tratamentos de 200 e 300  $\mu\text{M}$  de cádmio. Talarico (2002) também observou granulações elétron-densas no interior de vacúolos de *A. saviana* após o tratamento com cádmio. Andrade *et al.* (2004) ao estudar os efeitos do cobre na alga verde *Enteromorpha flexuosa* sugeriram que compostos sulfatados estariam relacionados com o aparecimento deste metal no vacúolo. Provavelmente as granulações referidas observadas nos vacúolos do presente estudo possuem cádmio.

As estratégias de proteção ao metal pesado cádmio como aumento de concentração de ágar na parede celular, aumentando a espessura da parede, e a vacuolização de células corticais e subcorticais não foram suficientes para impedir a interferência do cádmio em organelas como o cloroplasto. Com a técnica do CBB a intensidade maior da reação com o interior celular significa aumento de proteínas em organelas como o cloroplasto. Ao MET foi observado que a maior parte do citoplasma, de células corticais e subcorticais, são ocupadas por cloroplastos. A maior concentração de proteínas pode estar relacionada às defesas antioxidantes ou quelação do cádmio. Em algas vermelhas, os tilacóides não estão associados uns com os outros, eles são livres nos cloroplastos. Os cloroplastos das amostras controle de *G. domingensis* apresentaram a estrutura como a das algas vermelhas, com um tilacóide periférico envolvendo os tilacóides em paralelo. O número de tilacóides paralelos foi variável, e esse número depende, principalmente, da localização espacial da célula nas algas. A presença de cádmio interferiu na morfologia e fisiologia dos cloroplastos especialmente nas células corticais superficiais. Nos cloroplastos destas células, quando observados no MET, os tilacóides apresentaram alterações estruturais significativas, incluindo a modificação na quantidade, tamanho e organização dos tilacóides. Apesar das alterações observadas na organização dos tilacóides não está bem estabelecida qual a interferência deste metal na morfologia. Outra alteração significativa na organização dos cloroplastos foi o aumento no número e na estrutura dos plastoglóbulos na presença de cádmio que pode ser considerado como uma mudança no metabolismo, que, por sua vez, resulta em redução da proliferação celular e diminuição da taxa de crescimento. O mesmo foi visto por Diannelidis & Delivopoulos (1997) em *Ceramium ciliatum* após ser tratada com cádmio. De acordo com Holzinger *et al.* (2009) quando as algas são submetidas a estresse observa-se um aumento na síntese de lipídios e isto ocorre porque as vias para formar proteínas são suprimidas.

As análises das amostras ao ML com a técnica de PAS demonstraram um aumento na quantidade de grãos de amido das florídeas das células corticais e subcorticais dos tratamentos com cádmio em relação ao controle. O aumento de grãos no interior celular das células corticais e subcorticais foram visualizados ao MEV em células tratadas com cádmio, corroborando com o resultado obtido com PAS. Ainda na análise com MEV realizou-se a medida dos grãos o que demonstrou uma diminuição significativa no tamanho destes grãos nas células tratadas em relação ao controle. Provavelmente as mudanças de rotas metabólicas, principalmente dos cloroplastos, em resposta à presença de cádmio promoveram o aumento no número de grãos, sendo esta uma estratégia de armazenar energia sob condição de estresse.

A redução do tamanho pode ter sido resultado de um processo acelerado de produção de grãos de amido bem como o maior consumo deste como fonte de energia.

## 7. CONCLUSÃO

As evidências do presente trabalho indicam que o aumento na espessura e a quantidade de ágar da parede celular, verificado nas células de *G. domingensis* tratadas com cádmio, seria uma forma de reter este metal. Entretanto, este mecanismo não foi o suficiente para impedir a entrada de cádmio no citoplasma. A entrada de cádmio no citoplasma ocasionou alterações nos vacúolos, nos cloroplastos e nos amidos.

Os vacúolos apresentaram um aumento de tamanho nas amostras tratadas com cádmio e granulações elétron-densas vistas ao MET, provavelmente cádmio.

A presença de cádmio no citoplasma levou a alterações na ultraestrutura dos cloroplastos, nos tilacóides, no número e na estrutura dos plastoglóbulos. Torna-se evidente também que a presença de cádmio no meio de cultivo promoveu a diminuição nas concentrações dos pigmentos fotossintetizantes (clorofila *a*, ficoeritrina, ficocianina e aloficocianina), interferindo na fotossíntese.

Como a produção de amido das florídeas está associada à produção de energia, dependente de compostos sintetizados pelos cloroplastos, a alteração dos cloroplastos provavelmente promoveu as alterações no aumento de número e diminuição de tamanho dos grãos de amido nas células de *G. domingensis* tratadas com cádmio.

A mudança ocorrida no sistema metabólico de *G. domingensis*, provocada por cádmio, interfere nas condições da célula e por tanto na reprodução celular o que provocou o decréscimo na taxa de crescimento de *G. domingensis*, juntamente com a modificação morfológica externa onde se observa menor ramificação e a despigmentação.

Os experimentos apresentados neste trabalho forneceram subsídios para concluir que a presença de cádmio no meio ambiente irá alterar de forma significativa as macroalgas, produtores primários e base da cadeia alimentar, bem como as influências sobre a maricultura.

## 8. REFERÊNCIAS

- 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.
- AMADO-FILHO, G. M.; ANDRADE, L. R.; KAREZ, C. S.; FARINA, M. & PFEIFFER, W. C. Brown algae species as biomonitors of Zn and Cd Sepetiba Bay, Rio de Janeiro, Brazil. *Marine Environmental Research*, v. 48, p. 213-224, 1999.
- AMADO-FILHO, G. M.; SALGADO, L. T.; REBELO, M. F.; RESENDE, C. E.; KAREZ C. S. & PFEIFFER, W. C. Heavy metals in benthic organisms from Todos os Santos Bay, Brasil. *Brazilian Journal of Biology*, v. 68, p. 95-100. 2008.
- ANDRADE, L. R.; FARINA, M. & FILHO, G. M. A. 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.
- ARNOLD, W.; MITRENGA, D. & MAYRESBACH, H. Gefriertro und einbsttung in glycolmethacrylat (GMA). Ergebnisse Histochemischer Reaktionen. *Acta Histochemica*, v. 14, p. 271-277. 1975.
- BIRD, C. J.; MCLACHLAN, J. & OLIVEIRA E. C. *Gracilaria chilensis* sp. nov. (Rhodophyta, Gigartinales), from Pacific South America. *Journal of Botany*. Canada, v. 64, p. 2928-2934. 1986.
- BOUZON, Z. L. Aspectos histoquímicos e ultra-estruturais da porção vegetativa e reprodutiva de estiquídios de *Hypnea musciformis* (Gigartinales – Rhodophyta). Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Paraná, Paraná, 66pp. 1993.
- BOUZON, Z. L.; MIGUENS, F. & OLIVEIRA, E. C. Male gametogenesis in the red algae *Gracilaria* and *Gracilariopsis* (Rhodophyta, Gracilariales). *Cryotogamie Algologie*, v. 21, p. 33-47. 2000.

- CALFA, B. A. & TOREM, M. L. Biorreagentes - aplicações na remoção de metais pesados contidos em efluentes líquidos por biossorção/bioflotação. *Metalurgia & Materiais*, v. 60, n.3, p. 537-542. 2007.
- COLLÉN, J.; PINTO, E.; PEDERSÉN, M. & COLEPICOLO, P. Induction of oxidative stress in the red macroalgae *Gracilaria tenuisipitata* by pollutant metals. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, v. 45. P. 337-342. 2003.
- DAS, P.; SAMANTARAY, S. & ROUT, G. R. Studies on cadmium toxicity in plants: a review. *Environmental Pollution*, v. 98, n. 1, p. 29-36, 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, n. 2, p. 127-134. 1997.
- 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. May, 2000.
- EDWARDS, P. Illustrated guide to the seaweeds and sea grasses in the vicinity of Porto Aransas, Texas. *Contribution in Marine Science*. Austin, v.15, p. 1-228. 1970.
- GAHAN, P. B. *Plant Histochemistry and cytochemistry: an introduction*. Academic Press London, 301pp. 1984.
- GANTT, E. Phycobilisomes. *Annual Review Plant Physiology*, v. 32, p. 327-347. 1981
- GORDON, E. M. & McCANDLESS, E. L. Ultrastructure and Histochemistry of *Chondrus crispus* Stackhouse. In HARVEY, M. J. & MCLACHLAN, J (eds) *Chondrus crispus*. Nova Scotian. Institute of Science, Halifax, p. 111-133. 1973.
- GRAHAM, L. E. & WILCOX, L. W. *Algae*. First edition. Prentice-Hall, Inc. Upper Saddle River. 640pp. 2000.
- GUIMARÃES, M.; PLASTINO, E. M. & OLIVEIRA, E. C. Life history, reproduction and growth of *Gracilaria domingensis* (Gracilariales, Rhodophyta) from Brazil. *Botanica Marina*, v.42, p. 481-486, 1999.
- 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.

- HISCOX, J. D. & ISRAELSTAM, G. F. A method for the extraction of chlorophyll from leaf tissue without maceration. *Canadian Journal of Botany*, v. 57, p. 1332-1334. 1979.
- HOLZINGER, A., ROLEDA, M.Y. & LÜTZ, C. The vegetative arctic freshwater green alga *Zygnema* is insensitive to experimental UV exposure. *Micron*, v. 40, p. 831-838. 2009.
- HU, S.; TANG, C. H. & WU, M. Cadmium accumulation by several seaweeds. *The science of the total Environment*, v. 187, p. 65-71. 1996.
- JOLY, A. B. *Botânica: introdução à taxonomia vegetal*. 4. Ed, 777 p São Paulo: Nacional, 1977.
- KAIN, J. M. & DESTOMBE, C. A review of the life history, reproduction and phenology of *Gracilaria*. *Journal of Applied Phycology*, v. 7, p. 269-281. 1995.
- KUMAR, M.; KUMARI, P.; GUPTA, V.; ANISHA, P. A.; REDDY, C. R. K. & JHA. B. Differential responses to cadmium induced oxidative stress in marine macroalga *Ulva lactuca* (Ulvales, Chlorophyta). *Biometals*, v.23, p. 315-325. 2010.
- 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 of 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.
- LEE, R. E. *Phycology*. Cambridge University Press, New York, 2<sup>a</sup> ed, 715pp. 1989.
- LEE, T.; HUANG, Y. & CHEN, M. Copper induction of phosphorus deficiency in *Ulva fasciata* (Ulvales, Chlorophyta). *Phycologia*, v. 44, n. 6, p. 620-628. 2005.
- LOCKWOOD, M. P. *Effects of Pollutants on Aquatic Organisms*. Cambridge University Press, New York. 1976.
- LOMBARDI, A. T. & VIEIRA A. A. H. Lead- and copper-complexing extracellular ligands released by *Kirchneriella aperta* (Chlorococcales, Chlorophyta). *Phycologia*. V. 38, p. 283-288. 1999.
- LOMBARDI, A. T. & VIEIRA A. A. H. Copper and lead complexation by high molecular weight compounds produced by *Synura sp.* (Chrysophyceae). *Phycologia*. V. 37, p. 34-39. 1998.
- 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 boergensii*. In: Richmond, M.D. and Francis, J. (Eds.) *Proceedings of the Conference on Advances on Marine Sciences in Tanzania*, p. 185-192. 1999.
- McCULLY, M. E. The histological localization of the structural polysaccharides of seaweeds. *Annals of the New York Academy of Sciences*, v. 175, p. 702-711. 1970.



- MUSE, J. O.; STRIPEIKIS, J. D.; FERNÁNDEZ, F. M.; D'HUICQUE, L.; TUDINO, M. B.; CARDUCCI, C. N. & TROCCOLI, O. E. Seaweeds in the assessment of heavy metal pollution in the Gulf San Jorge, Argentina. *Environmental Pollution*, v. 104, p. 415-322, 1999.
- NUNES, J. M. C. Rodofíceas marinhas bentônicas do Estado da Bahia, Brasil. Tese de Doutorado, Universidade de São Paulo, São Paulo, 410p, 2005.
- OLIVEIRA, E. C. & PLASTINO, E. M. *Gracilariaceae. Biology of Economic Algae*, p. 185-226. Akatsuka, 1994.
- OLIVEIRA, E. C. *Introdução a Biologia Vegetal*. 2ª Ed. São Paulo: EDUSP. 266 p. 2003.
- OLIVEIRA, M. M. F.; KLEINUBING, S. J. & 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.
- 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 Botanical*. V. 24, p. 147-154. 1986.
- PINTO, E.; SIGAUD-KUTNER, T. C. S.; LEITÃO, 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.
- PUESCHEL, C. Ultrastructure of tetrasporogenesis in *Palmaria palmata* (Rhodophyta). *Journal of Phycology*, v. 15, p. 409-424. 1979.
- RAVEN, J. A. Carbon metabolism. In COLE, K. M. & SHEATH, R. G. *Biology of the red algae*. British Library, New York, 1ª Ed., p. 171-201. 1990.
- REYNOLDS, E. S. The use of lead citrate at light pH as an electron opaque stain in electron microscopy. *Journal of Cell Biology*, v. 17. p. 208-212. 1963.
- ROBERTS, D. A.; POORE, A. G. B. & JOHNSTON, E. L. Ecological consequences of copper contamination in macroalgae: effects on epifauna and associated herbivores. *Environmental Toxicology and Chemistry*, v. 25, n. 9, p. 2470-2479. 2006.
- RUSSEL, J. B. *Química geral*. McGraw-Hill do Brasil, 897pp. 1981.
- SCHMIDT, E. C.; SANTOS, R.; HORTA, P. A.; MARASCHIN, M & BOUZON, Z. L. Effects of UVB radiation on the agarophyte *Gracilaria domingensis* (Rhodophyta, Gracilariales): Changes in cell organization, growth and photosynthetic performance. *Micron*, v. 41, p. 919-930. 2010.
- 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.

- SILVA, E. A.; COSSICH, E. S.; TAVARES, C. G.; CARDOSO FILHO, L. & GUIRARDELLO, R. Biosorption of binary mixtures of Cr(III) and Cu(II) ions by *Sargassum* sp. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, V. 20, n. 3. São Paulo 2003.
- SILVERBERG, B. A. Cadmium-induced ultrastructural changes in mitochondria of freshwater green algae. *Phycologia*, v.15, p. 155-159. 1976.
- SOUTH, G. R. & WHITTICK, A. *Introduction to Phycology*. First publication. Blackwell Scientific Publications, Oxford, 341pp. 1987.
- SPURR, A. R. A low viscosity epoxy resin-embedding medium for electron microscopy. *Journal of Ultrastructure Research*, v. 26, p. 31-43. 1969.
- TALARICO, L. Phycobiliproteins and phycobilisomes in red algae: adaptative responses to light. *Science Marine*, v. 60, p. 205-222. 1996.
- TALARICO, L. Fine structure and X-ray microanalysis of a red macrophyte cultured under cadmium stress. *Environmental Pollution*, v. 120, p. 813-821. 2002.
- VALLEE, B. L. & ULMER, D. D. Biochemical effects of mercury, cadmium and lead. *Annual Reviews*, p. 91-128. 1972.
- VAN DEN HOEK, C.; MANN, D. G. & JAHNS, H. M. *Algae: An introduction to Phycology*. Cambridge: Cambridge University Press, 627pp. 1989.
- VISVIK, I. & RACHLIN, J. W. Ultrastructural changes in *Dunaliella minuta* following acute and chronic exposure to copper and cadmium. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, v. 23, p. 420-425, 1992.
- WELLBURN, A. R. The spectral determination of chlorophylls *a* and *b*, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. *Journal of Plant Physiology*, v.144, p. 307-313. 1994.
- WHITE, A. K. & CRITCHLEY, C. Rapid light curves: a new fluorescence method to assess the state of the photosynthetic apparatus. *Photosynthesis Research*, v. 59, p. 63-72. 1999.
- WOELKERLING, Wm. J. Chapter one: An introduction. In: COLE, K. M. & SHEATH, R. G. org. *Biology of the Red Algae*. Cambridge University press, p. 1-6. 1990.
- WYNNE, M. J. *A checklist of benthic marine algae of the tropical and subtropical western Atlantic: second revision*. Berlin-Stuttgart: Nova Hedwigia, 152 pp. 2005.
- XIA, J. R.; LI, Y. J.; LU, J. & CHEN, B. Effects of copper and cadmium on growth, photosynthesis, and pigment content in *Gracilaria lemaneiformis*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, v. 73, p. 979-986. 2004.
- ZUBER, H. Structure of light harvesting antenna complex of photosynthetic bacteria, cyanobacteria and red algae. *Journal Trends Biochemical Sciences*, v. 11, p. 414-419. 1986.