

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA E RECURSOS NATURAIS

EFEITOS DE NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDO DE COBRE (NANO-CuO) E CLORETO DE COBRE (CuCl₂) SOBRE A COMPOSIÇÃO BIOQUÍMICA E ATIVIDADE FOTOSSINTÉTICA DA CLOROFÍCEA *Raphidocelis subcapitata*

Lays de Oliveira Gonçalves Alho

São Carlos

2016

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA E RECURSOS NATURAIS

Lays de Oliveira Gonçalves Alho

EFEITOS DE NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDO DE COBRE (NANO-CuO) E CLORETO DE COBRE (CuCl₂) SOBRE A COMPOSIÇÃO BIOQUÍMICA E ATIVIDADE FOTOSSINTÉTICA DA CLOROFÍCEA *Raphidocelis subcapitata*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Recursos Naturais (PPGERN) para obtenção do título de Mestre em Ecologia e Recursos Naturais

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Maria da Graça Gama Melão

Co-orientadora: Dr.^a Jaqueline Pérola de Souza

São Carlos

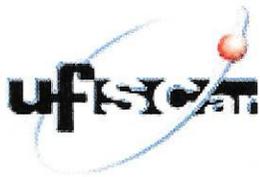
2016

Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da Biblioteca Comunitária UFSCar
Processamento Técnico
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

A397e Alho, Lays de Oliveira Gonçalves
Efeitos de nanopartículas de óxido de cobre (nano-CuO) e cloreto de cobre (CuCl₂) sobre a composição bioquímica e atividade fotossintética da clorofícea *Raphidocelis subcapitata* / Lays de Oliveira Gonçalves Alho. -- São Carlos : UFSCar, 2017.
63 p.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2016.

1. Cobre iônico. 2. Composição bioquímica. 3. Fotossíntese. 4. Microalga. 5. Nanopartículas metálicas. I. Título.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Recursos Naturais

Folha de Aprovação

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Dissertação de Mestrado da candidata Lays de Oliveira Gonçalves Alho, realizada em 05/10/2016:

Profa. Dra. Maria da Graça Gama Melão
UFSCar

Prof. Dr. Hugo Miguel Preto de Moraes Sarmiento
UFSCar

Profa. Dra. Raquel Andrade de Rossi
ALGAE

**Este trabalho é dedicado ao meu Pai Supremo
e Soberano, à minha família e ao meu amor.**

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me permitir essa experiência e estar comigo ao longo do percurso, ensinando e moldando minha vida, proporcionando alegrias através dos amigos com os quais me presenteou e dando suporte à minha família.

À minha família (Cleber, Lília, Naara e Aréli), pela paciência e orações ao longo do trabalho. Pelos conselhos e carinho dedicados ao longo da minha vida e pelos ensinamentos que marcaram meu coração.

Ao Leonardo, meu amor, por estar sempre do meu lado dando suporte e carinho, e ajudando sempre que possível. Obrigada pelo incentivo e orações.

À minha avó Nézia, que hoje vive ao lado do Eterno, pelo tempo e carinho dedicados enquanto eu estava realizando o trabalho. Pelas preocupações e afeto demonstrados nos gestos mais singelos. Sou grata por cada minuto.

Aos meus sogros Silena e Paschoal, e aos meus novos avós Odila e Faustino, pelo carinho e incentivo.

Aos meus amigos Muriel, Rebeca, Juliana, Leon, Dayane, Daniela e aos amigos da SER pelo incentivo e orações

Aos amigos de laboratório Daniela, Renan, Vinícius, Rodrigo e ao técnico Fábio pela ajuda, apoio e incentivo

À Prof.^a. Dr.^a. Maria da Graça Gama Melão pela orientação e aprendizado que me proporcionou no decorrer do trabalho. Agradeço pela paciência, oportunidade e amizade.

À Dr.^a Jaqueline Pérola de Souza, pela orientação e ajuda ao longo do trabalho. Obrigada pela disponibilidade, paciência e conhecimento passado.

À Dr.^a Giseli Swerts Rocha pela grande ajuda, orientação e amizade ao longo deste trabalho. Obrigada pela paciência e pelo conhecimento passado.

Ao Prof. Dr. Hugo Sarmento pela ajuda, incentivo e conhecimentos proporcionados ao longo do trabalho.

À Prof.^a Dr.^a Ana Teresa Lombardi pela disponibilidade, gentileza e apoio ao longo do trabalho.

Ao Msc. Fabrício Santos, do Grupo de Nanomedicina e Nanotoxicologia do IFSC/USP pela realização das imagens de microscopia de força atômica.

Ao Prof. Dr. Valtencir Zucolotto do Grupo de Nanomedicina e Nanotoxicologia do IFSC/USP
pela gentileza e concessão de espaço e materiais para realização das imagens e
caracterização das nanopartículas de CuO.

À CAPES, pela bolsa concedida

A todos, meu mais sincero agradecimento.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Esquema da fotossíntese – circuito dos prótons e dos elétrons nos tilacóides 13
- Figura 2:** Imagem de Microscopia de Força Atômica (AFM) da nanopartícula de CuO com 10 x 10 µm de área (A) e 1 x 1 µm de área (B). 24
- Figura 3:** Intensidade, em porcentagem, da distribuição dos tamanhos das nanopartículas de CuO medidas através de AFM (Microscopia de Força Atômica) e DLS (Espalhamento Dinâmico da Luz). 25
- Figura 4:** Densidade celular da alga *Raphidocelis subcapitata* ao longo das 96 horas de tratamento com CuCl₂ e nano-CuO. O símbolo * indica diferença significativa em relação ao controle em 96 horas ($p < 0,05$). 27
- Figura 5:** Inibição de Crescimento Média (IC_{50-96h}) da alga *Raphidocelis subcapitata* tratada com sal (CuCl₂) e nanopartícula de CuO. Linhas pontilhadas indicam o intervalo de confiança (95%). 27
- Figura 6:** Efeitos do cobre sobre o peso seco (A e B), carboidratos (C e D) e lipídios totais (E e F) da clorófitca *Raphidocelis subcapitata* tratada com CuCl₂ e nano-CuO. Os resultados são média ± desvio-padrão e letras diferentes em cada tratamento significam diferença significativa ($p < 0,05$) em relação ao controle ($0,06 \times 10^{-6}$ mol Cu L⁻¹). 31
- Figura 7:** Taxa de crescimento específico (divisões dia⁻¹) da microalga *Raphidocelis subcapitata* ao longo das 96 horas de exposição ao CuCl₂ (A) e nano-CuO (B). O símbolo * indica diferença significativa em relação ao controle ($0,06 \times 10^{-6}$ mol Cu L⁻¹) para cada dia dos tratamentos ($p < 0,05$). 33
- Figura 8:** Teor de clorofila a (pg cél⁻¹) da clorófitca *Raphidocelis subcapitata* ao longo das 96 horas de tratamento com CuCl₂ (A) e nano-CuO (B). Os resultados são média ± desvio-padrão e o símbolo * indica diferença significativa em relação ao controle para cada dia dos tratamentos ($p < 0,05$). 34
- Figura 9:** Variação nos parâmetros de fluorescência basal (F₀) e fluorescência máxima (F_m) da alga *Raphidocelis subcapitata* medidos ao longo das 96 horas de exposição ao CuCl₂ (A e C) e nano-CuO (B e D). O símbolo * indica diferença significativa em relação ao controle para cada dia dos tratamentos (p 36

< 0,05).

Figura 10: Variação dos parâmetros de fluorescência (Φ_M e F_0/F_v) da clorófitica *Raphidocelis subcapitata* ao longo das 96 horas de tratamento com CuCl_2 (A e C) e nano-CuO (B e D). O símbolo * indica diferença significativa em relação ao controle para cada dia dos tratamentos ($p < 0,05$). 38

Figura 11: Rendimento quântico máximo (■) e Rendimento quântico efetivo (●) do fotossistema II da clorófitica *Raphidocelis subcapitata* após 96 horas de exposição ao CuCl_2 (A) e nano-CuO (B). O símbolo * indica diferença significativa em relação ao controle para cada dia dos tratamentos ($p < 0,05$). 39

Figura 12: Variação nos parâmetros de dissipação de energia (qP, qN e NPQ) da microalga *Raphidocelis subcapitata* medidos após 96 horas de exposição ao CuCl_2 (A) e nano-CuO (B). O símbolo * indica diferença significativa em relação ao controle para cada dia dos tratamentos ($p < 0,05$). 40

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1:** Parâmetros de fluorescência calculados a partir das medidas de fluorometria de pulso de amplitude modulada (PAM) (Adaptado de Herlory et al., 2013). 23
- Tabela 2:** Medidas de caracterização das nano-CuO em meio L. C. Oligo durante a exposição. 26
- Tabela 3:** Valores de IC₅₀, assim como seus respectivos intervalos de confiança (95%), em mol Cu L⁻¹, da alga *R. subcapitata* tratada com nano-CuO e CuCl₂ em 24, 48, 72 e 96 h. 28
- Tabela 4:** Média ± desvio-padrão das classes lipídicas (pg cél⁻¹) de *Raphidocelis subcapitata* exposta durante 96 h aos tratamentos com CuCl₂ e nano-CuO. Os resultados foram comparados para cada classe lipídica em 95% de significância (p < 0,05) (valores com letras iguais na mesma coluna não possuem diferença significativa). Classes lipídicas: HC (hidrocarboneto alifático), WE/SE (éster de cera), KET (ketone), TAG (triglicerídeos), FFA (ácido graxo livre), ALC (álcool alifático livre), ST (esterol), AMPL (lipídios polares móveis em acetona) e PL (fosfolipídios). * 0,06 x 10⁻⁶ mol Cu L⁻¹. ND significa *não detectado* 32

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

μ = taxa de crescimento específico

Φ_M = rendimento quântico máximo do fotossistema II

Φ_M' = rendimento quântico efetivo do fotossistema II

AFM = Atomic Force Microscopy (Microscopia de força atômica)

ALC = álcool alifático livre

AMPL = lipídios polares móveis em acetona

ANOVA = análise de variância

ATP = adenosina trifosfato

CCL = complexo coletor de luz do fotossistema II

CEO = complexo de evolução do oxigênio

Cel = célula

Chl a = clorofila a

CuCl₂ = cloreto de cobre

DLS = Dynamic Light Scattering (Espalhamento de luz dinâmico)

FFA = Ácidos graxos livres

F_m = fluorescência máxima de algas adaptadas ao escuro

F_m' = fluorescência máxima de algas adaptadas à luz

F₀ = fluorescência mínima de algas adaptadas ao escuro

F₀' = fluorescência mínima de algas adaptadas à luz

F_o/F_v = eficiência do complexo de evolução do oxigênio

F_v/F_m = rendimento quântico máximo do fotossistema II

F_v'/F_m' = rendimento quântico efetivo do fotossistema II

HC = Hidrocarboneto alifático

IC₅₀ = Concentração de inibição média

NPQ = coeficiente de dissipação não fotoquímica

Nano-CuO = Nanopartícula de óxido de cobre

PAM = pulso de amplitude modulada

PDI = Polydispersity Index (Índice de Polidispersibilidade)

PL = fosfolipídios

PSI = fotossistema I

PSII = fotossistema II

Q_A = quinona A

qN = coeficiente de dissipação não fotoquímica

qP = coeficiente de dissipação fotoquímica

ROS = espécies reativas de oxigênio

ST = esterol

TAG = triglicerídeos

WE/SE = ester de cera

ω -3 = ômega 3

ω -6 = ômega 6

SUMÁRIO

RESUMO	1
ABSTRACT	3
1. INTRODUÇÃO	4
2. REVISÃO DA LITERATURA	8
3. OBJETIVOS	14
3.1. Objetivos Específicos	14
4. METODOLOGIA	17
4.1. Nanopartículas de CuO e CuCl ₂	17
4.2. Cultivo da microalga <i>Raphidocelis subcapitata</i>	17
4.3. Caracterização das nanopartículas	17
4.4. Exposição aos diferentes compostos de cobre	18
4.5. Densidade celular	19
4.6. Análise Bioquímica da microalga <i>Raphidocelis subcapitata</i>	20
4.6.1. Peso Seco	20
4.6.2. Carboidratos totais	20
4.6.3. Lipídios totais e classes lipídicas	21
4.7. Análise da atividade fotossintética da alga <i>Raphidocelis subcapitata</i>	22
4.8. Análise dos dados	23
5. RESULTADOS	24
5.1. Toxicidade de nanopartículas de óxido de cobre (CuO) e cloreto de cobre (CuCl ₂) sobre o crescimento e composição bioquímica da clorofícea <i>Raphidocelis subcapitata</i>	24
5.1.1. Caracterização das nanopartículas	24
5.1.2. Densidade celular	26

5.1.3. Composição bioquímica da microalga <i>Raphidocelis subcapitata</i>	28
5.1.4. Peso Seco	28
5.1.5. Carboidratos totais	29
5.1.6. Lipídios totais e classes lipídicas	29
5.2. Efeitos de nanopartículas de óxido de cobre (CuO) e do cloreto de cobre (CuCl ₂) sobre a atividade fotossintética da clorofícea <i>Raphidocelis subcapitata</i>	33
5.2.1. Taxa de crescimento e teor de clorofila <i>a</i> da alga <i>R. subcapitata</i>	33
5.2.2. Fluorescência e rendimentos quânticos da alga <i>R. subcapitata</i>	35
5.2.3. Coeficientes de dissipação fotoquímica e não fotoquímica da clorofícea <i>R. subcapitata</i>	39
6. DISCUSSÃO	41
6.1. Toxicidade de nanopartículas de óxido de cobre (CuO) e cloreto de cobre (CuCl ₂) sobre o crescimento e composição bioquímica da clorofícea <i>Raphidocelis subcapitata</i>	41
6.2. Efeitos de nanopartículas de óxido de cobre (CuO) e do cloreto de cobre (CuCl ₂) sobre a atividade fotossintética da clorofícea <i>Raphidocelis subcapitata</i>	48
7. CONCLUSÕES	56
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	57

RESUMO

A produção e a utilização de nanopartículas de óxido de cobre (nano-CuO) vêm crescendo significativamente nos últimos anos devido às suas propriedades físico-químicas específicas. Mas essas nanopartículas podem eventualmente encontrar seu destino final em ambientes aquáticos, onde os efeitos sobre a biota ainda não foram bem caracterizados. O presente trabalho objetivou comparar a toxicidade de dois diferentes compostos de cobre, as nano-CuO e o cloreto de cobre (CuCl_2), sobre a microalga *Raphidocelis subcapitata*, com o intuito de distinguir se a principal causa da possível toxicidade é devida à liberação de íons cobre ou a propriedades intrínsecas da nanopartícula. Para isto, foram avaliados os efeitos desses dois compostos sobre a atividade fotossintética da alga, crescimento e composição bioquímica. Microalgas em fase exponencial de crescimento foram expostas durante 96 horas a concentrações de nano-CuO de 0,07 a 1260 $\mu\text{M Cu L}^{-1}$. As concentrações de CuCl_2 utilizadas foram de 0,07 a 2,29 $\mu\text{M Cu L}^{-1}$. O valor da Concentração de Inibição do crescimento ($\text{IC}_{50-96\text{h}}$) encontrado para a *R. subcapitata* exposta às nanopartículas foi de 74 $\mu\text{M Cu L}^{-1}$, enquanto para o sal foi 0,65 $\mu\text{M Cu L}^{-1}$. Houve maior produção de lipídios totais, carboidratos e aumento do peso seco nas concentrações mais altas de cobre, tanto para as células algais expostas às nanopartículas quanto para as expostas ao sal, mas pouca alteração no teor de clorofila *a* após 96 horas de exposição. Na exposição ao CuCl_2 , as classes lipídicas que tiveram seu teor mais afetado, em relação ao controle, foram a dos esteróis (ST) e álcool alifático livre (ALC). As algas expostas a nano-CuO apresentaram maior alteração de hidrocarbonetos (HC) e triglicerídeos (TAG). As concentrações mais altas de cada composto reduziram em 36% a fluorescência inicial (F_0) das algas e em cerca de 70% a fluorescência máxima (F_m), após 96 horas de exposição ao metal. Os rendimentos quânticos máximo (ϕ_M) e efetivo (ϕ_M') foram afetados pelos dois compostos de cobre, sendo que as alterações mais significativas foram encontradas nas algas expostas à nano-CuO. As grandes alterações observadas na eficiência do complexo de evolução do oxigênio (F_0/F_v) indicam que este foi o principal sítio de ação do cobre, através de alterações no processo de foto-oxidação da água, principalmente nas algas expostas à nano-CuO. Os coeficientes de dissipação de fluorescência fotoquímica (qP) e não fotoquímica (qN) não foram significativamente alterados pelo metal. Nossos resultados sugerem que a principal causa de toxicidade das nano-CuO ocorreu principalmente pela liberação de íons Cu^{2+} , uma vez que os efeitos foram menos acentuados nas algas expostas à nano-CuO, em comparação com as expostas ao CuCl_2 , em todos os parâmetros bioquímicos e de crescimento avaliados. Com relação ao efeito dos compostos de cobre na fotossíntese da alga, este estudo conclui que o cobre afetou a atividade fotossintética de forma significativa, com alterações mais pronunciadas no tratamento com nano-CuO, o que pode indicar diferentes formas de ação entre o cobre dissolvido em forma de sal e nanopartículas de CuO. O

parâmetro F_0/F_v apresentou maior sensibilidade ao cobre, se revelando como uma boa ferramenta para pesquisas de estresse fisiológico gerado por metais em microalgas.

Palavras-chave: cobre iônico, composição bioquímica, fotossíntese, microalga, nanopartículas metálicas

ABSTRACT

Production and utilization of copper oxide nanoparticles (CuO-NP) have increased recently due to their specific physicochemical properties. Most of these nanoparticles end up in aquatic ecosystems, but their effects on the biota were not yet well characterized. The present study aimed to compare the toxicity of CuO-NP and copper chloride (CuCl₂) in the microalgae *Raphidocelis subcapitata*, in order to determine whether the main cause of possible toxicity is due to released copper ions or intrinsic properties of the nanoparticle. We evaluated the effects of these two compounds on several physiological and biochemical parameters of the algae (photosynthetic activity, growth, dry weight, carbohydrates levels, total lipids content and lipid classes). Exponential growth phase algal cultures were exposed during 96 hours to different concentrations of CuO-NP (0.07 to 12.6 μM Cu L⁻¹) and CuCl₂ (0.07 to 2.29 μM Cu L⁻¹). The mean inhibitory concentration for *R. subcapitata* exposed to nanoparticles at 96 h (IC_{50-96h}) was 74 μM Cu L⁻¹, while for CuCl₂ was 0.65 μM Cu L⁻¹. There was an increase in dry weight, total carbohydrates and total lipids in algae exposed to the highest copper concentrations in both treatments (salt and nanoparticles), but there was not much change in chlorophyll content after 96 hours of exposure. Concerning lipid composition, sterols (ST) and aliphatic alcohol (ALC) increased under CuCl₂ exposure, while aliphatic hydrocarbons (HC) and triacylglycerols (TAG) increased in the presence of nano-CuO, compared to control. The highest concentrations of each compound reduced 36% of algae initial fluorescence (F₀) and about 70% the maximum fluorescence (F_m) after 96 hours of metal exposure. Maximum (φ_M) and effective (φ_M') quantum yields were affected by the two copper compounds, with the largest changes found in the algae exposed to nano-CuO. The major changes observed in the efficiency of oxygen complex evolution (F₀/F_v) indicate that this was the main site of action of copper, through changes in the process of water photo-oxidation, especially in algae exposed to nano-CuO. The photochemical (qP) and non-photochemical quenching (qN) were not significantly altered by the metal. We found that CuCl₂ was more toxic than nano-CuO in all parameters evaluated, and this can be related to lower free copper ions available in nanoparticles. In this study, we concluded that the two copper compounds significantly affect photosynthetic activity, of *R. subcapitata*, with more pronounced changes in algae treated with CuO-NP, which may indicate different forms of action between the dissolved copper in the salt and in the CuO-NP. The parameter F₀/F_v showed greater sensitivity to copper, being potentially a good tool for research on the physiological stress generated by metals in microalgae.

Keywords: biochemical composition, ionic copper, metallic nanoparticles, microalgae, photosynthesis

1. INTRODUÇÃO

Dentre a grande variedade de poluentes ambientais encontrados na natureza, que interferem no metabolismo de organismos fotossintetizantes, os metais são os mais comuns e geralmente estão presentes em altas concentrações (Mallick e Mohn, 2003; Perales-Vela et al., 2010). Esses poluentes químicos produzem efeitos agudos e crônicos na biota aquática, afetando o crescimento, a reprodução e o desenvolvimento desses organismos (Martínez-Ruiz e Martínez-Jerónimo, 2015). Neste sentido, a Ecotoxicologia consiste em uma ótima ferramenta na tentativa de proteger a biota e avaliar os riscos da contaminação ambiental por produtos químicos, uma vez que se trata de uma área especializada da Toxicologia Ambiental que estuda os efeitos causados por agentes químicos sobre a dinâmica de populações e de comunidades integrantes dos ecossistemas (Ronco et al., 2004).

A ecotoxicologia aquática tem como principal objetivo a avaliação e proteção dos ecossistemas aquáticos. Esse objetivo é alcançado, em parte, através de processos de análises de risco e formulação de diretrizes para classificar a qualidade da água de ambientes aquáticos, de forma a fornecer proteção à integridade do ecossistema e à biodiversidade. Para a formulação de diretrizes apropriadas, se faz necessário o desenvolvimento de testes de toxicidade que utilizem organismos-teste sensíveis e representativos das espécies que ocorrem naturalmente nos ecossistemas, a fim de se obter o máximo de proteção das mesmas (Echols et al., 2010).

As microalgas são organismos fotossintetizantes que apresentam grande importância ecológica na comunidade aquática: são responsáveis, juntamente com outros organismos que compõem o fitoplâncton, pela produção orgânica de carbono e liberação de oxigênio através da fotossíntese, além de sustentarem as cadeias tróficas nos ambientes aquáticos (Martínez-Ruiz e Martínez-Jerónimo, 2015). Dentre as microalgas mais utilizadas em testes ecotoxicológicos, a microalga *Raphidocelis subcapitata* é uma clorofícea de água doce mundialmente utilizada como organismo-teste em bioensaios de toxicidade com contaminantes (McLarnon-Riches et al., 1998; Franklin et al., 2007), de forma que foi o organismo escolhido para os ensaios de toxicidade no presente trabalho.

O cobre é o metal tóxico mais comum utilizado em atividades industriais, podendo alcançar ambientes aquáticos tanto por vias naturais quanto como consequência de atividades antrópicas (Perales-Vela et al., 2010). Apesar de ser um nutriente essencial para a maioria dos organismos, em altas concentrações pode causar toxicidade (Lombardi et al., 2007; Lombardi e Maldonado, 2011). Tem sido reportado que, em ambientes aquáticos poluídos, as concentrações de cobre podem chegar a 3000 $\mu\text{g L}^{-1}$ (Juneau et al., 2002). Consequentemente, um aumento da concentração de cobre pode produzir danos nos processos bioquímicos e no

estado fisiológico das células algais. O cobre é transferido através da cadeia trófica e age como fator primário na seleção de espécies, influenciando na biodiversidade desses ambientes (Peña-Vásquez et al., 2010).

Nanopartículas de óxido de metais, tais como as de óxido de cobre (nano-CuO), têm sido amplamente produzidas em indústrias baseadas em nanotecnologia para uma grande variedade de aplicações, incluindo catálise de reações, sensores e remediação ambiental, e também para incorporação em produtos comerciais: chips eletrônicos, nanofluidos de transferência de calor, semicondutores, células solares e baterias de lítio. As nano-CuO possuem excelentes propriedades termofísicas e também propriedades biocidas. Além do tamanho diminuto, as nano-CuO apresentam grande relação área-superfície, o que aumenta sua reatividade em comparação com as macro e micropartículas de CuO, propriedades estas que lhes confere grande atratividade para o setor industrial (Bondarenko et al., 2013; Chang et al., 2012; Franklin et al., 2007).

Devido ao conhecimento sobre a toxicidade da forma iônica de alguns metais, como do íon de cobre Cu^{2+} , estudos sobre a causa da toxicidade de nanopartículas, que eventualmente podem alcançar os ambientes aquáticos, são de importância crucial para um melhor entendimento dos mecanismos de ação desses nanometais sobre a biota aquática. Ainda há controvérsias em relação a toxicidade das nano-CuO é causada pela liberação de íons Cu^{2+} a partir das nanopartículas ou se o tamanho e as propriedades físico-químicas da partícula são a própria causa da toxicidade. Levando isso em conta, estudos comparando toxicidade de cobre dissolvido, como o CuCl_2 , e nano-CuO são de grande relevância ecológica, contribuindo para o entendimento dos sítios de ação e toxicidade dessas nanopartículas (Amorim e Scott-Fordsmand, 2012; Chang et al., 2012).

Uma vez que concentrações elevadas de cobre reduzem o crescimento de microalgas, assim como sua atividade fotossintética e respiratória (Perales-Vela et al., 2007), a inibição de crescimento, evolução do oxigênio, troca de CO_2 ou formação de ATP eram parâmetros comumente utilizados para algas em muitos bioensaios, mas estes métodos apresentam problemas de complexidade e lentidão (Juneau et al., 2002). Estudos mais aprofundados que incluam dados sobre os efeitos desses contaminantes em nível celular e molecular podem gerar informações mais consistentes sobre a toxicidade em processos fisiológicos de microalgas do que dados relacionando apenas o efeito no crescimento.

A alga pode alterar seu metabolismo e processos bioquímicos, como a síntese de lipídios e carboidratos, em resposta a estresses ambientais ou mudanças nas condições de cultivo (Markou et al., 2012; McLarnon-Riches et al., 1998). Sendo assim, estudos ecotoxicológicos que envolvam análises de modificações na composição bioquímica desses organismos podem render informações mais relevantes sobre os mecanismos de ação de

metais e o impacto que eles podem causar ao longo da cadeia trófica, uma vez que alterações na bioquímica da alga podem ser transferidas para níveis tróficos superiores (Martínez-Ruiz e Martínez-Jerónimo, 2015).

Medidas de fluorescência em algas têm sido utilizadas como métodos simples, rápidos e sensíveis para avaliar fotoinibição e os efeitos de poluentes nesses organismos (Juneau et al., 2002). Atualmente, o uso de fluorômetros de pulso de amplitude modulada (PAM) permite estudar o transporte de elétrons entre os fotossistemas II (PSII) e I (PSI), fornecendo diferentes parâmetros de fluorescência que indicam o estado fisiológico da alga e a eficiência da atividade fotossintética (Cosgrove e Borowitzka, 2010; Genty et al., 1989; Juneau et al., 2002; Mallick e Mohn, 2003). Os eventos de transporte de elétrons fotossintéticos dão suporte às reações bioquímicas necessárias para o crescimento de plantas e algas. Uma vez que o cobre afeta a atividade fotossintética antes de outros processos fisiológicos, espera-se que a fotossíntese das algas seja mais sensível e apresente respostas mais rápidas do que processos de divisão celular, quando utilizada como um parâmetro fisiológico integrado para bioensaios (Juneau et al., 2002).

Alguns parâmetros de fluorescência, como o rendimento quântico máximo do PSII (ϕ_M) e o rendimento quântico efetivo do PSII (ϕ_M'), são ferramentas úteis para bioensaios com algas porque indicam, respectivamente, a capacidade de algas adaptadas ao escuro (ϕ_M) e adaptadas à luz (ϕ_M') de converter energia luminosa em energia química. Também são utilizados parâmetros de dissipação fotoquímica (qP) e não fotoquímica (qN), que permitem medir processos de conversão de energia fotossintética. A dissipação fotoquímica (qP) representa a proporção da energia de excitação “capturada” pelos centros de reação do PSII que é utilizada para o transporte de elétrons, enquanto o coeficiente de dissipação não fotoquímica (qN) representa a quantidade de energia luminosa dissipada que envolve processos não radiativos (Genty et al., 1989; Herlory et al., 2013; Juneau et al., 2002). Uma vez que esses parâmetros representam boas ferramentas para o estudo da fisiologia de microalgas e efeitos de contaminantes sobre o aparato fotossintético das mesmas, eles foram utilizados neste estudo para avaliar o impacto do cobre na atividade fotossintética da clorófitica *Raphidocelis subcapitata*.

A hipótese deste estudo é que a principal causa de toxicidade das nanopartículas de CuO sobre as células algais se deve à liberação de íons de cobre livre. Sendo assim, espera-se que os efeitos das nanopartículas de óxido de cobre (nano-CuO) sejam menos acentuados em todos os parâmetros avaliados, em comparação com os efeitos do cobre dissolvido (CuCl₂). O objetivo deste estudo foi comparar a toxicidade de dois compostos diferentes de cobre, um na forma de nanopartículas (nano-CuO) e outro na forma de cobre dissolvido (CuCl₂), sobre a microalga clorófitica da espécie *Raphidocelis subcapitata*. Para um estudo mais aprofundado,

além dos efeitos sobre a inibição do crescimento algal, também foram avaliados os efeitos desses compostos sobre a composição bioquímica e características de fluorescência da alga *R. subcapitata*.

2. REVISÃO DA LITERATURA

Dentre os poluentes ambientais mais comuns, os metais são os mais encontrados em altas concentrações nos ambientes aquáticos (Cid et al., 1995; Corcoll et al., 2011; Perales-Vela et al., 2007) devido ao aumento de atividades antrópicas nos últimos anos. A toxicidade desses metais ocorre quando se ligam a sítios de coordenação de importantes moléculas biológicas, como enzimas e proteínas, alterando as funções metabólicas normais. Em produtores primários, esses efeitos podem levar à inibição da produção de clorofila, fotossíntese e crescimento (Baumann et al., 2009). A energia luminosa que é absorvida pela clorofila de organismos fotossintetizantes dirige a fotossíntese. Esses organismos são base de cadeia alimentar e deles dependem muitos animais e humanos. No entanto, os metais podem causar danos no aparato fotossintético e o conhecimento de seus mecanismos de ação deve ser um dos principais objetivos de estudo na ciência ambiental (Mallick e Mohn, 2003).

O cobre é um micronutriente essencial utilizado em baixas concentrações por grande parte dos organismos em diversos processos bioquímicos e metabólicos, mas elevadas concentrações desse metal podem causar toxicidade (Bossuyt e Janssen, 2004). Diversas fontes de cobre no ambiente, que incluem resíduos domésticos e industriais, práticas de agricultura, drenagem de minas de cobre, pesticidas e tintas anti-incrustação, têm contribuído para o aumento progressivo das concentrações de cobre nos ambientes aquáticos (Perales-Vela et al., 2007).

Os nanomateriais têm recebido muita atenção nos últimos anos devido às suas propriedades intrínsecas, que incluem uma grande relação área-superfície e alta reatividade (Bondarenko et al., 2013; Chang et al., 2012). Nanopartículas de óxido de metais, por exemplo, têm sido produzidas em larga escala para aplicações industriais e domésticas (Aruoja et al., 2009; Chang et al., 2012), sendo que as de óxido de cobre (nano-CuO) são amplamente utilizadas em atividades industriais, principalmente em sensores de gás, baterias, plásticos, revestimento de metais, semicondutores e chips eletrônicos, devido às suas propriedades, como alta condutividade elétrica e térmica. Além disso, as nano-CuO são muito utilizadas por seus efeitos biocidas, pois possuem propriedades antibacterianas e antifúngicas (Bondarenko et al., 2013; Gomes et al., 2012; Gunawan et al., 2011; Siddiqui et al., 2015).

Os efeitos tóxicos causados pelo cobre estão mais relacionados à liberação de íons livres do que à concentração total do metal (Lombardi et al., 2007). A liberação de íons de cobre pelas nano-CuO tem sido apontada como a principal causa para a toxicidade observada em bactérias, algas, protozoários e crustáceos, com evidências de indução de citotoxicidade, genotoxicidade e estresse oxidativo (Bondarenko et al., 2013; Chang et al., 2012; Gunawan et al., 2011; Melegari et al., 2013). Apesar disso, ainda há controvérsias sobre a toxicidade

causada por essas nanopartículas ser devido apenas ao cobre iônico ou se é gerada por propriedades intrínsecas dessas nanopartículas (Amorim, et al., 2012; Gomes et al., 2012;).

Os íons Cu^{2+} auxiliam na manutenção da homeostase dos organismos, porém em concentrações elevadas de metal, pode ocorrer um desbalanceamento homeostático e a toxicidade é observada. Íons de cobre livre, solubilizados a partir das nanopartículas, podem entrar nas células através de transporte ativo e por canais iônicos (Chang et al., 2012). Acredita-se que alguns dos mais importantes mecanismos de ação do cobre em plantas verdes seja a inibição da transferência de elétrons nos cloroplastos, uma vez que o íon Cu^{2+} é bastante reativo e tende a captar elétrons e, com isso, dificulta a fotossíntese. Além disso, também pode agir através da formação de radicais reativos, destruição da membrana do cloroplasto e redução nas concentrações intracelulares de K^+ e Na^+ (Bossuyt e Janssen, 2004). A inibição da fotossíntese é consequência da interferência dos íons metálicos com enzimas fotossintéticas e membranas dos cloroplastos. Os metais possuem alto potencial de oxidação-redução (potencial redox) e podem inibir reações de redução em processos de biossíntese de pigmentos fotossintéticos (Aggarwal et al., 2012).

As nanopartículas, como as nano-CuO, também podem interagir com as células devido ao seu diminuto tamanho, podendo atravessar as membranas celulares através de difusão, endocitose e/ou fagocitose, dependendo do tipo da célula. Além disso, podem gerar Espécies Reativas de Oxigênio, resultando em desnaturação de proteínas, mutações no DNA e peroxidação de lipídios (Siddiqui et al., 2015). E ainda, propriedades de superfície das nanopartículas têm sido reconhecidas como fatores importantes na toxicidade dos nanomateriais (Melegari et al., 2013), o que ressalta a importância de estudos sobre os mecanismos de ação das nano-CuO para o melhor entendimento da causa de sua toxicidade: se por íons de cobre liberados por processos de ionização ou pela entrada das nanopartículas nas células devido às suas propriedades intrínsecas.

Os possíveis riscos da liberação de nanopartículas nos ecossistemas aquáticos, contaminando o ambiente e interagindo com a biota, podem ser melhor entendidos através do conhecimento sobre sua mobilidade, biodisponibilidade e toxicidade aos organismos (Aruoja et al., 2009; Gomes et al., 2012; Siddiqui et al., 2015). Devido ao seu uso em baixas quantidades, quando comparada com outras nanopartículas, os efeitos tóxicos das nano-CuO nos organismos têm sido pouco estudados (Adam et al., 2015; Bondarenko et al., 2013; Gomes et al., 2012; Gunawan et al., 2011).

A possibilidade de contaminação dos ambientes aquáticos por nanopartículas tem levado a estudos sobre os efeitos tóxicos desses contaminantes em microalgas (Aruoja et al., 2009; Franklin et al., 2001, 2007; Lim et al., 2006; Melegari et al. 2013), uma vez que elas são base de cadeia alimentar e representam importantes organismos-teste para testes

ecotoxicológicos. Além disso, são fonte direta de alimento para o zooplâncton, que é posteriormente consumido por outros invertebrados ou peixes (Bondarenko et al., 2013; Martínez-Ruiz e Martínez-Jerónimo, 2015). Algas unicelulares apresentam alta superfície de contato em relação ao seu volume, o que contribui para o aumento da sua exposição ao contaminante (Melegari et al. 2013). As microalgas são algas com tamanhos que variam de 0,2 µm (picoplâncton) a 100 µm ou mais (formas filamentosas) (Markou et al, 2012). Dentre esses organismos, as algas verdes são extremamente abundantes nos ambientes aquáticos, sendo um dos principais componentes do fitoplâncton. Elas compõem o filo *Chlorophyta* e são responsáveis pela maior parte da produção de oxigênio molecular disponível no planeta a partir da fotossíntese. Nos sistemas aquáticos, as algas incorporam energia solar em biomassa e, por serem fonte de alimento para outras espécies aquáticas, possuem grande importância ecológica (Vidotti e Rollemberg, 2004).

As células das algas do gênero *Raphidocelis*, dentro do filo *Chlorophyta*, tem simetria externa radial ou próxima de radial (Oliveira, 2007). Este gênero foi descoberto pelo pesquisador Reinsch em 1867 e compreende 6 a 8 espécies distribuídas pelo mundo, com células em forma de meia-lua que aparecem isoladas ou em grupos de quatro, agregadas pela margem convexa, constituindo colônias múltiplas (Bicudo e Bicudo, 1970). Dentro deste gênero, a espécie que mais tem sido citada na literatura é a *Raphidocelis subcapitata*, que nos últimos anos também foi denominada por alguns autores como *Pseudokirchneriella subcapitata* ou *Selenastrum capricornutum* (Oliveira, 2007). Essa microalga tem sido muito utilizada em testes ecotoxicológicos, devido a sua facilidade de cultivo, rápido crescimento e sensibilidade a diversos tipos de contaminantes, inclusive metais e nanopartículas (Aruoja et al., 2009; Bondarenko et al., 2013; Franklin et al., 2007).

As células das microalgas têm uma composição bioquímica diversificada que está relacionada com a natureza de cada espécie e também com fatores ambientais (Miau e Wu, 2004; Campos et al, 2010). Os principais grupos orgânicos (carboidratos, proteínas, lipídios) estão presentes em diferentes concentrações na biomassa algal. Os mais ricos em energia são os lipídios (37,6 KJ.g⁻¹), seguidos pelas proteínas (16,7 KJ.g⁻¹) e carboidratos (15,7 KJ.g⁻¹) (Wilhelm e Jakob, 2011). Alterações em algum ou mais de um desses componentes podem ser transferidas para os outros níveis da cadeia trófica dos ambientes aquáticos, afetando direta ou indiretamente outros organismos. Estudos que analisem alterações nesses componentes bioquímicos em algas expostas à contaminação com metal são de grande importância ecológica, pois simulam ambientes contaminados e permitem uma avaliação de possíveis alterações na bioquímica desses organismos sob essas condições de estresse. Além disso, esses estudos permitem realizar inferências sobre os impactos que essas alterações causarão ao longo da cadeia trófica.

Uma ampla variação de carboidratos é produzida pelas microalgas, como os que atuam no equilíbrio osmótico, com funções estruturais nas paredes celulares, porém a maioria é produto de reserva (amido, crisolaminarina, paramido), que é espécie-dependente. Como compostos de armazenamento, eles providenciam energia para os processos metabólicos e, se necessário, para permitir a sobrevivência temporária em condições de escuro (Markou et al, 2012). Além disso, os carboidratos possuem um alto valor calórico, o que os torna uma valiosa fonte energética para os consumidores (Moura Junior et al., 2006). Com base no tamanho, os carboidratos estão divididos em três classes principais: monossacarídeos, oligossacarídeos e polissacarídeos (Nelson e Cox, 2000; Markou et al, 2012).

Muitas microalgas são capazes de alterar a produção de carboidratos conforme mudanças nas condições ambientais, como forma de adaptação, principalmente quando estão sob estresse causado por metal. Algumas microalgas podem aumentar a síntese dessa biomolécula (Chia et al., 2015; Pistocchi et al., 1997), enquanto que outras têm a produção de carboidratos reduzida devido aos efeitos tóxicos do metal (Lim et al., 2006; Martínez-Ruiz e Martínez-Jerónimo, 2015). Um aumento na produção dessas moléculas pode indicar uma adaptação fisiológica da alga às condições de estresse do meio em que estas se encontram, uma vez que os carboidratos são macromoléculas importantes que servem como armazenamento de energia. Uma redução na concentração dessas moléculas pode estar relacionada com a despolarização da membrana plasmática e levar a outros efeitos como deformação celular ou danos no aparato fotossintético (Martínez-Ruiz e Martínez-Jerónimo, 2015). Como os açúcares e carboidratos servem como matérias primas de carbono orgânico importantes para a biossíntese de biomoléculas como lipídios, proteínas e ácidos nucleicos (Chia et al., 2015), algumas vezes um aumento detectado na produção de carboidratos é acompanhado de aumento da produção de lipídios e proteínas, como foi reportado em alguns trabalhos (Chia et al., 2015; Rocha et al., 2016).

Os lipídios são elementos estruturais das membranas celulares e de várias organelas, e controlam o movimento de substâncias para o interior das células (Vidotti e Rollemberg, 2004). Os lipídeos das microalgas são constituídos por diferentes ácidos graxos saturados e insaturados, alguns deles da família do ômega 3 (ω -3) e ômega 6 (ω -6), os quais podem ser concentrados na cadeia trófica (Hu et al, 2008). Os lipídios produzidos pelas microalgas incluem lipídios neutros, polares, ésteres de cera, esteróis e hidrocarbonetos. Além disso, eles podem ser agrupados em duas categorias: lipídios de armazenamento (não polares), principalmente na forma de TAG (triglicerídeos) e lipídios estruturais (polares), que tem uma grande quantidade de ácidos graxos poliinsaturados (PUFAs), essenciais para animais aquáticos e humanos. Além de importantes componentes estruturais da membrana celular, os lipídios polares (fosfolipídios) e esteróis mantêm funções específicas da membrana, auxiliando em uma grande variedade de processos metabólicos e participando diretamente dos eventos

de fusão de membrana. Além disso, alguns lipídios polares atuam como intermediários chave, ou precursores de intermediários, na sinalização celular, com papel na resposta às mudanças no ambiente (Sharma et al., 2012).

Sob condições de estresse, como em ambientes contaminados com metais, as algas podem alterar suas rotas metabólicas de produção de lipídios, modificando tanto quantitativamente quanto qualitativamente o teor de classes lipídicas dentro da célula, como formas de adaptação às mudanças nas condições ambientais (Chia et al., 2013; Rocha et al., 2016). O acúmulo de lipídios já foi reportado em estudos que avaliaram algas expostas à metais como cádmio (Chia et al., 2013, 2015), ferro (Liu et al., 2008) e cobre (Lombardi e Wangersky, 1991; Gushina e Harwood, 2006; Rocha et al., 2016), indicando que o aumento da produção dessa biomolécula pode ser utilizada como indicativo de estresse causado por metal em ambientes contaminados. Os lipídios acumulados podem ser utilizados pelas algas como reserva de alimento e servirem como fontes alternativas de energia necessárias para a sobrevivência durante as condições de estresse (Hu et al., 2008). Alteração na composição das classes lipídicas de microalgas expostas à metal também foram detectadas em diversos estudos, sendo que o acúmulo de lipídios neutros na forma de TAG é sugerido como uma boa ferramenta para avaliação do estresse causado por esses compostos (Chia et al., 2013; Liu et al., 2008; Lombardi e Wangersky, 1991).

Estudos toxicológicos que incluam análises de modificações na composição bioquímica das microalgas expostas a metais, como o cobre, podem fornecer informações sobre as respostas fisiológicas desses organismos ao estresse pelo metal, indicando possíveis rotas de ação do cobre e permitindo identificar meios de remediação. As biomoléculas algais podem apresentar respostas mais rápidas à ação de um estressor no ambiente do que o crescimento populacional, de maneira que estudos dos efeitos tóxicos de metais nessas moléculas são de grande importância e relevância ecológica (Chia et al., 2013, 2015; Lim et al., 2006; Martínez-Ruiz e Martínez-Jerónimo, 2015).

As algas verdes possuem como principais pigmentos as clorofilas *a* e *b*, que emitem fluorescência e atuam diretamente na fotossíntese desses organismos. De acordo com Cosgrove e Borowitzka (2010), fluorescência é a re-emissão da energia na forma de um fóton (de luz) conforme um elétron retorna de seu estado excitado para o estado fundamental. No caso da fluorescência da clorofila *a* (chl-*a*), uma molécula de chl-*a* pode se tornar excitada e atingir o estado de excitação 1 (S_1) após absorver um fóton com comprimento de onda com menos de 670 nm. Se a energia não for utilizada na separação de cargas, dissipação por calor ou for transferida por ressonância, ocorre fluorescência conforme o elétron decai do estado de excitação para o estado fundamental. Se o fóton absorvido tiver um comprimento de onda

menor (ou seja, luz azul com cerca de 420 nm), a energia extra excita a molécula de chl-a para o estado de excitação 2 (S_2) e é emitido calor conforme ela decai para o estado S_1 .

Análises de fluorescência da clorofila *a* fornecem informações sobre o estado fisiológico do aparato fotossintético, permitindo definir se houve ou não dano após a exposição do organismo fotossintetizante a um agente estressor por curto e longo período de tempo (Baumann et al., 2009). O aparato fotossintético é composto pelos fotossistemas II (PSII) e I (PSI). O PSII é formado por um complexo de pigmentos proteicos que catalisam a transferência de elétrons induzida pela luz a partir da água para as plastoquinonas. Ele consiste em mais de 25 polipeptídeos que formam o complexo coletor de luz (CCL) composto por proteínas e clorofilas, um centro de reação e um sistema de separação de água conhecido como complexo de evolução do oxigênio (CEO) (Lombardi e Maldonado, 2001). Na figura 1, abaixo, está apresentado um esquema da fotossíntese, que resume esse processo nas algas e plantas verdes.

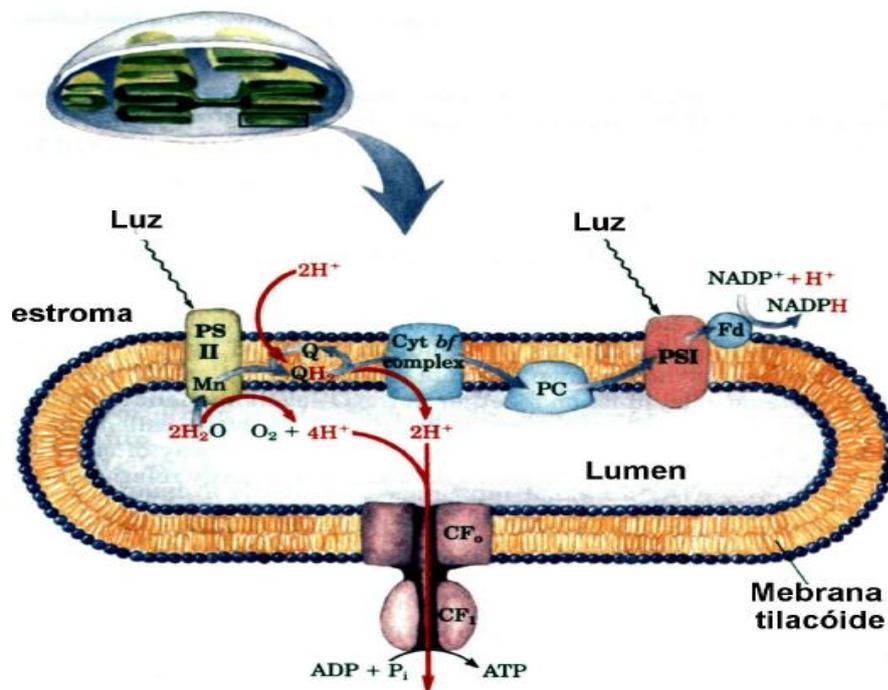


Figura 1: Esquema da fotossíntese – circuito dos prótons e dos elétrons nos tilacóides (Nelson e Cox, 2002. Lehninger Princípios de Bioquímica, 3 ed, pg 540)

As algas apresentam dois centros de reações diferentes que funcionam juntos: o P680 (Centro de reação do PSII) e P700 (Centro de reação do PSI). O centro de reação do PSII passa elétrons para a plastoquinona, e os elétrons perdidos pelo P680 são substituídos por elétrons retirados da água. Essa cisão da água provocada pela luz é catalisada pelo CEO, que contém manganês, e resulta na produção de O_2 . A plastoquinona reduzida transporta elétrons para o complexo do citocromo b₆f, e daí para a plastocianina. A plastocianina carrega os elétrons para o PSI, e este passa elétrons do seu centro de reação excitado por uma série de

transportadores até a ferredoxina, que reduz a nicotinamida adenina fosfato. A quebra da água e o fluxo de elétrons por meio do citocromo b6/f são acompanhados pelo bombeamento de prótons através da membrana tilacóide, e a força próton motriz que é criada conduz a síntese de ATP por um complexo protéico CF_0CF_1 . Tanto o NADPH quanto o ATP são utilizados nas reações de assimilação do carbono, para produzir carboidratos, e em outros processos biossintetizantes.

A fluorescência da chl-*a* é particularmente sensível ao funcionamento do PSII (Cid et al., 1995). Dentre os parâmetros de fluorescência medidos através de fluorômetro de pulso de amplitude modulada (PAM), os mais utilizados para inferência de efeitos tóxicos de poluentes sobre o processo fotossintético das algas são os de rendimento quântico máximo (Φ_M) e efetivo (Φ_M') do PSII, e os coeficientes de dissipação de fluorescência fotoquímica (qP) e não fotoquímica (qN) (Corcoll et al., 2011; Oxborough e Baker, 1997; Peña-Vásquez et al., 2010). Uma vez que esses parâmetros estão ligados a diferentes eventos da cadeia de transporte de elétrons da fotossíntese, é de se esperar que apresentem susceptibilidade variável dependendo do sítio e mecanismos de ação de cada tipo de poluente e escala de análise (Juneau et al., 2002).

A fluorescência mínima (F_0) vai ocorrer quando todos os centros de reação do PSII estão abertos (Q_A em todos os centros de reação estão oxidadas) e a energia quântica que alcança o centro de reação tem a chance máxima de ser utilizada fotoquimicamente e a chance mínima de ser dissipada como calor ou fluorescência. Para medir esse parâmetro de fluorescência (F_0) em um fluorômetro de pulso de amplitude modulada (PAM), a luz aplicada à amostra adaptada ao escuro deve ser suficientemente fraca ($<0,5 \mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$), de forma a não induzir redução da Q_A e o fechamento dos centros de reação. Quando é aplicado um pulso luminoso com intensidade alta suficiente para fechar todos os centros de reação (reduzir todas as Q_A) da amostra, é induzida uma condição em que a fotoquímica é reduzida a zero e a fluorescência é máxima (F_m). A eficiência, ou rendimento (ϕ), da fotoquímica do PSII também pode ser estimada através de PAM. Nesse caso, o produto final pode ser descrito como a separação de carga primária e a passagem de um elétron pelo PSII. As medidas de fluorescência realizadas através de um fluorômetro de pulso de amplitude modulada não são invasivas e são rápidas, além de não ser necessário danificar a integridade das células para análise. (Cosgrove e Borowitzka, 2010; Lombardi e Maldonado, 2001).

A energia luminosa absorvida pelo fotossistema II (PSII) e seu complexo coletor de luz (CCL) pode ser utilizada ou dissipada através de um dos seguintes processos competitivos: 1 - fotoquímica (separação de cargas primária e transferência fotossintética de elétrons), 2 - dissipação não fotoquímica (decaimento não radiativo ou dissipação por calor) ou, 3 - emissão

de fluorescência. A dissipação fotoquímica (qP) estima a porcentagem dos CCL do PSII que estão abertos ou a capacidade da fotoquímica de competir pela energia quântica aprisionada. O coeficiente de dissipação não fotoquímica (qN) tem duas desvantagens: 1 – envolve a estimativa de F_0' (fluorescência mínima de uma amostra adaptada à luz), que é difícil de mensurar, e 2- existe evidência de que o qN pode ser diretamente influenciado pela taxa constante da fotoquímica (Cosgrove e Borowitzka, 2010). Outra medida da dissipação não fotoquímica (NPQ) pode ser calculada usando a equação de Stern-Volmer $((F_m - F_m')/F_m')$ e, nesse caso, NPQ representa o aumento relativo na soma das taxas de ativação de processos não-fotoquímicos (emissão de fluorescência, dissipação por calor e transferência da energia de excitação do PSII para o PSI) (Cosgrove e Borowitzka, 2010; Juneau et al., 2002).

A fluorescência da clorofila fornece limiares de toxicidade e também pode permitir a identificação do principal modo e sítio de ação de um determinado xenobiótico (Mallick e Mohn, 2003). Segundo Baumann et al. (2009), alguns poluentes, como os metais, prejudicam a fotossíntese afetando o complexo coletor de luz CCL, complexo de evolução do oxigênio (CEO), plastoquinona, plastocianina, ferredoxina e $NADP^+$. O campo de fluorescência variável utilizado como medida da fotoquímica primária do PSII e o transporte de elétron associado a ela tem sido utilizado para determinar diferentes sítios de ação de metais nas algas (Juneau et al., 2002). O estudo dos sítios de ação de metais tóxicos em plantas, e particularmente em algas, tem demonstrado que o PSII é um dos mais sensíveis. Alguns estudos indicam que metais como chumbo (Pb), prata (Ag), cádmio (Cd) e zinco (Zn) alteram o fluxo de elétrons no sítio de separação da água, afetando a eficiência do complexo de evolução do oxigênio (CEO) através do processo de foto-oxidação da água (Herlory et al., 2013; Mallick e Mohn, 2003; Peña-Vásquez et al., 2010).

O cobre pode exercer sua toxicidade em organelas intracelulares, interferindo na fotossíntese nos cloroplastos (Cid et al., 1995), substituindo outros metais essenciais nos sítios ativos de metaloproteínas ou interferindo no transporte das mesmas (Lombardi e Maldonado, 2011). A degradação dos *grana* dos tilacóides, lamelas do estroma, aumento no número e tamanho dos plastoglóbulos e alteração na fluidez da membrana do PSII já foram encontrados como efeitos indiretos de toxicidade do cobre, o que resulta em redução de atividade dos fotossistemas (Quartacci et al. 2000). Também já foi reportado que o cobre afeta a cadeia de transporte de elétrons entre o PSII e PSI através da plastoquinonas e a redução do NADP (Juneau et al., 2002), o que ressalta a importância de estudos dos efeitos desse metal no aparato fotossintético de organismos fotossintetizantes.

3. OBJETIVOS

Este trabalho teve como objetivo principal investigar os efeitos tóxicos de dois compostos diferentes de cobre, as nanopartículas de óxido de cobre II (CuO) e o cloreto de cobre (CuCl₂), sobre a microalga clorofícea *Raphidocelis subcapitata*, avaliando o impacto sobre a composição de carboidratos, lipídios, peso seco, clorofila e a atividade fotossintética da microalga.

3.1. Objetivos específicos

- Analisar os efeitos tóxicos das nanopartículas de CuO e do cloreto cobre (CuCl₂) sobre o crescimento da microalga clorofícea *Raphidocelis subcapitata*;
- Avaliar os efeitos tóxicos das nanopartículas de CuO e do cloreto cobre (CuCl₂) sobre a composição bioquímica da microalga *R. subcapitata*, a partir da determinação dos teores de carboidratos, lipídios e classes lipídicas, e analisar os efeitos das nanopartículas de CuO e do cloreto de cobre (CuCl₂) sobre o peso seco da clorofícea *R. subcapitata*.
- Avaliar a resposta da microalga *R. subcapitata* contaminada com CuCl₂ e nano-CuO com relação à sua atividade fotossintética e conteúdo de clorofila.

4. METODOLOGIA

4.1 Nanopartículas de CuO e CuCl₂

Nanopartículas de óxido de cobre (CuO II) (comercial < 50 nm (n^o CAS 1317-38-0) e o cloreto de cobre di-hidratado (CuCl₂.2H₂O) (n^o CAS 10125-13-0) foram adquiridas comercialmente da empresa Sigma-Aldrich (Brasil).

4.2. Cultivo da microalga *Raphidocelis subcapitata*

Inóculos da clorófitcea *Raphidocelis subcapitata* foram obtidos junto ao Departamento de Ecologia e Biologia Evolutiva (DEBE - Universidade Federal de São Carlos, SP, Brasil) e cultivados em meio L. C. Oligo (AFNOR, 1980), com a seguinte composição: Ca(NO₃)₂.4H₂O (1,7 x 10⁻⁴ M), KNO₃ (1,0 x 10⁻³ M), MgSO₄.7H₂O (1,2 x 10⁻⁴ M), K₂HPO₄ (2,3 x 10⁻⁴ M), CuCl₂.2H₂O (6,0 x 10⁻⁸ M), (NH₄)₆Mo₇O₂₄.4H₂O (2,4 x 10⁻⁸ M), ZnSO₄.7H₂O (1,0 x 10⁻⁷ M), Mn(NO₃)₂.4H₂O (1,5 x 10⁻⁷ M), C₆H₈O₇.H₂O (1,4 x 10⁻⁷ M), H₃BO₃ (4,9 x 10⁻⁷ M), C₆H₅FeO₇.5H₂O (3,1 x 10⁻⁶ M), FeSO₄.7H₂O (1,1 x 10⁻⁶ M), FeCl₃.6H₂O (1,9 x 10⁻⁶ M), NaHCO₃ (1,8 x 10⁻⁴ M) e CoCl₂.6H₂O (1,3 x 10⁻⁷ M). O meio de cultivo foi autoclavado por 20 minutos, a 121°C, em erlenmeyer de 2000 mL de capacidade contendo 1000 mL do meio. O pH foi ajustado para 7,0 ± 0,2 antes da autoclavagem. Os meios de cultivo foram colocados em ambiente asséptico (capela de fluxo laminar sob luz UV por 15 minutos), inoculados com uma concentração de aproximadamente 1 x 10⁴ células mL⁻¹. A cultura permaneceu sob iluminação contínua com intensidade de 5000 lux, agitação manual periódica (US-EPA, 2012) e temperatura constante de 25 ± 0,5°C.

4.3. Caracterização das nanopartículas

As características morfológicas das nanopartículas de CuO foram obtidas a partir de Microscopia de Força Atômica (AFM, do inglês *Atomic Force Microscopy*) em solução concentrada de 12,6 x 10⁻⁵ mol Cu L⁻¹ de nano-CuO sob temperatura ambiente usando um FlexAFM (Nanosurf AG, Liestal, Switzerland) em modo de contato intermitente (300 KHz). Medidas da dimensão lateral e distribuição de altura das nano-CuO foram determinadas

através de software analisador de imagens (AFM images Gwyddion). As imagens foram feitas no Laboratório de Caracterização do Grupo de Nanomedicina e Nanotoxicologia, na Universidade de São Paulo (USP), São Carlos. No AFM, a amostra é varrida por um sensor pizoelétrico, utilizado para estudar propriedades da superfície dos materiais (Binning et al., 1986). Determinações do tamanho hidrodinâmico das nanopartículas foram realizadas por Espalhamento de Luz Dinâmico (DLS, do inglês *Dynamic Light Scattering*) e a caracterização das cargas superficiais determinadas a partir do potencial Zeta (ζ) nos meios de exposição, nas concentrações 12,6 μM , 126 μM e 1260 μM mol Cu L⁻¹ de nano-CuO (em 0 e 96 horas) utilizando o equipamento Malvern Spectrometer Nano ZS90 no Laboratório de Caracterização do GNano, na USP.

4.4. Exposição aos diferentes compostos de cobre

Microalgas em fase exponencial de crescimento foram submetidas por um período de exposição de 96 horas às seguintes concentrações nominais de cobre na forma dissolvida de CuCl₂: 0,06 x 10⁻⁶ (controle – concentração de cobre já presente no meio L. C. Oligo); 0,07 x 10⁻⁶; 0,17 x 10⁻⁶; 0,67 x 10⁻⁶; 1,17 x 10⁻⁶; 1,55 x 10⁻⁶ e 2,29 x 10⁻⁶ mol Cu L⁻¹ (equivalente a 0,0015; 0,015; 0,08; 0,15; 0,20 e 0,30 mg CuCl₂ L⁻¹); e as seguintes concentrações nominais de cobre na forma de nanopartículas de CuO: 0,06 x 10⁻⁶ (Controle); 0,07x10⁻⁶; 0,18x10⁻⁶; 1,32x10⁻⁶; 12,6x10⁻⁶; 12,6x10⁻⁵; 6,28x10⁻⁴ e 12,6x10⁻⁴ mol Cu L⁻¹ (equivalente a 0,001; 0,01; 0,1; 1,0; 10; 50 e 100 mg nano-CuO L⁻¹). Essas concentrações-teste foram determinadas com base em testes preliminares com os dois compostos. Para cada tratamento e grupo controle, foram feitas quatro réplicas por concentração, com densidade inicial de células de 1 x 10⁴ céls mL⁻¹.

Uma solução estoque de 5,02 x 10⁻³ mol Cu L⁻¹ (400 mg nano-CuO L⁻¹) da nanopartícula foi preparada no próprio meio de cultivo das algas e, para reduzir a formação de agregados, foi sonicada por 30 minutos em sonicador de ponta (DES 500, Brasil) sob potência de 99% (Aruoja et al., 2009). A solução-estoque de CuCl₂ de 4,46 x 10⁻⁴ mol Cu L⁻¹ (60 mg CuCl₂ L⁻¹) foi preparada no próprio meio de cultivo das algas, mas não passou por sonicação. As soluções-teste da nano-CuO e do CuCl₂ foram preparadas através de diluições seriais da solução-estoque correspondente a cada composto de cobre. O controle foi constituído pelo meio de cultivo da alga contendo apenas a concentração originalmente presente no meio L. C. Oligo.

Os testes foram submetidos à agitação manual periódica e realizados em quatro réplicas para cada concentração. A concentração inicial de células foi de 1 x 10⁴ céls mL⁻¹ e os testes foram realizados em frascos de policarbonato com 500 mL de capacidade, contendo 200

mL das soluções com os contaminantes. Amostras para determinação da densidade celular foram realizadas a cada 24 horas, bem como para medidas de fluorescência mínima e máxima, e rendimento quântico máximo de cada amostra. Após 96 horas de exposição ao metal, foram retiradas amostras para as análises bioquímicas e rendimento quântico efetivo. Os testes de toxicidade seguiram recomendações da US-EPA (2012).

4.5. Densidade Celular

Para a determinação da densidade celular, foi utilizado um citometro de fluxo FACSCalibur - Becton Dickinson equipado com um laser de ions de Argon de 15mW (emissão 488 nm). Para isso, retirou-se 1,8 mL de cada amostra e fixou-se com 0,2 mL de formol 10% (conc. final 1%). As amostras foram congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas à -20°C até o dia da leitura. O citômetro de fluxo mede os sinais ópticos como dispersão da luz e fluorescência de células individualizadas em uma corrente de fluxo. A clorofila *a* das células algais foi detectada como fluorescência vermelha no canal FL3-H (filtro de longa passagem, 660 – 700 nm). A contagem das células foi realizada de forma similar à descrita em Sarmento et al. (2008). Foram utilizadas microesferas fluorescentes de 6µm (Polysciences, Inc., Warrington, PA, U.S.A.) como padrão interno. As microalgas foram facilmente identificadas em gráficos de side-scatter (SSC-H) contra fluorescência vermelha (FL3-H). A aquisição dos dados foi realizada com o software CellQuest BD e a análise dos citogramas com o software FlowJo V10.

A taxa de crescimento específico (μ) para cada dia de experimento foi calculada como aumento logarítmico da densidade celular, a partir da seguinte equação:

$$\mu_{i-j} = (\ln X_j - \ln X_i) / (t_j - t_i)$$

onde:

μ_{i-j} é a taxa de crescimento específico média do tempo *i* ao tempo *j*;

X_i é a densidade celular no tempo *i*;

X_j é a densidade celular no tempo *j*;

4.6. Análise bioquímica da microalga *Raphidocelis subcapitata*

4.6.1. Peso Seco

Para a determinação do peso seco, foram filtrados 60 mL de amostra de cada concentração de cobre dos tratamentos com CuCl_2 ou nano-CuO, contendo microalgas, em filtros de fibra de vidro previamente calcinados à 400°C por 8 horas em mufla, secos em estufa a 60°C por 24 horas e pesados. Os filtros com as amostras foram levados à estufa por 72 horas à 65°C e, após resfriamento em dessecador, foram pesados em balança analítica Sartorius MC21S (1 µg de precisão). As determinações do peso seco foram realizadas em quatro réplicas para cada concentração e o cálculo foi feito a partir da diferença entre peso final e inicial, dividido pelo número de células presente no volume filtrado. Os resultados foram expressos em pg de peso seco por célula.

4.6.2. Carboidratos Totais

A determinação do teor de carboidratos totais seguiu metodologia previamente descrita em Liu et al (1973). O método é baseado na reação com fenol e ácido sulfúrico no material particulado. Amostras de cada tratamento e controle (5 mL) foram coletadas e adicionadas em tubos de ensaio. Em seguida, os tubos passaram por processo de centrifugação por 10 minutos a 1500 rpm (Eppendorf 5702R, Alemanha). Após centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o pellet formado foi ressuscitado em 0,5 mL de água destilada (o branco consistiu em 1 mL de água destilada e seguiu o mesmo procedimento das amostras) e adicionado 1 mL de solução de fenol 10%. Em seguida, a amostra foi agitada e adicionada de 5 mL de H_2SO_4 concentrado. As amostras ficaram em repouso em um recipiente com gelo por 10 minutos. Decorrido esse tempo, centrifugaram-se as amostras a 4400 rpm por 10 minutos e o sobrenadante de cada tubo foi transferido para cubetas de vidro com 2 mL de capacidade e a absorbância foi lida ao espectrofotômetro a 485 nm (HACH DR 5000; HACH Company, USA).

4.6.3. Lipídios totais e classes lipídicas

A extração de lipídios foi realizada utilizando-se o método modificado de Folch (1957) descrito em Parrish (1999), usando clorofórmio e metanol. Os filtros utilizados para a filtração da cultura algal para a extração de lipídios foram calcinados a 400°C por 8 horas. A vidraria utilizada para o armazenamento de filtro e extratos de lipídios foi calcinada (400°C, 8h) e lavada três vezes com metanol (MeOH) e três vezes com clorofórmio (CHCl₃). Amostras de cada tratamento e controle (60 mL) foram filtradas à vácuo em filtros de fibra de vidro (GF/C; BOECO, Alemanha). Após a filtragem, os filtros foram transferidos para tubos de centrifuga de teflon (Nalgene), contendo 4 mL de clorofórmio, 2 mL de metanol e 1 mL de água lavada com clorofórmio. Nos tubos de teflon, os filtros foram macerados com auxílio de bastões de aço e as células algais foram rompidas através de ultrassom de ponta (Sonicador UNIQUE, Brasil) sob potência de 99% por cinco minutos. O branco passou pelos mesmos procedimentos das amostras, consistindo de 60 mL de água destilada. Durante o processo de extração, as amostras permaneceram no gelo para evitar a oxidação e consequente perda de lipídios. Após a extração, as amostras foram centrifugadas a 4400 rpm a 0°C por 5 minutos (Eppendorf 5702R, Alemanha). O sobrenadante foi retirado com auxílio de pipeta e transferido para flaconetes de vidro. Cada amostra passou por três vezes pelo processo de extração, sendo adicionado apenas clorofórmio (6 mL) nas duas últimas extrações para evitar a metilação. Todas as amostras foram armazenadas em freezer a -20°C para posterior análise do conteúdo lipídico.

Para as análises, as amostras foram concentradas em rotaevaporador para um volume final de 0,5 mL. Os lipídios e classes lipídicas foram identificadas e quantificadas por meio de cromatografia de camada delgada com detecção por ionização em chama (TLC/FID), com o uso do IatroscanTM Mark VI nas seguintes condições analíticas: fluxo de hidrogênio de 174 mL min⁻¹, fluxo de ar 2 L min⁻¹ e velocidade de leitura de 4 mm s⁻¹. Foi utilizada a combinação de várias varreduras parciais com uso de diversos solventes para otimizar a separação cromatográfica entre as diversas classes lipídicas. As classes lipídicas identificadas e quantificadas com o uso de padrões (SIGMA-Aldrich, USA) foram as seguintes: HC (hidrocarboneto alifático), TAG (triglicerídeos), FFA (ácido graxo livre), ALC (álcool alifático livre), ST (esterol), AMPL (lipídios polares móveis em acetona) e PL (fosfolipídios). Os respectivos tempos de retenção cromatográfico foram relacionados à interação entre as fases móvel e estacionária do sistema (Parrish, 1999).

4.7. Análise da atividade fotossintética da alga *Raphidocelis subcapitata*

A concentração de clorofila *a*, *in vivo*, foi mensurada em fluorímetro (Turner Designs-Trilogy, Estados Unidos). O teor de clorofila por células foi obtido através de uma curva de calibração, tendo como variável dependente a intensidade de fluorescência e independente a concentração de clorofila *a* extraída de cultura de *Chlorella sorokiniana* em fase exponencial de crescimento. A densidade óptica de cada amostra foi mensurada em comprimento de onda de 684 nm (espectrofotômetro Femto 800 XI, Brasil).

Os parâmetros de fluorescência da clorofila foram determinados para cada tratamento, utilizando-se aparelho fluorômetro de pulso de amplitude modulada PHYTO-PAM[®] Fluorometer Analyser (Walz, Alemanha) equipado com uma unidade óptica ED-101US/MP (Tabela 1). Medidas do rendimento quântico máximo (ϕ_M) do fotossistema II (PSII) da alga foram obtidas para cada dia de experimento, e o rendimento quântico efetivo (ϕ'_M) foi medido após 96 horas de exposição aos compostos de cobre.

A cada 24 horas foram retirados 3 mL de amostra de cada réplica das culturas, para o controle e para as concentrações de CuCl_2 e nano-CuO. As amostras permaneceram no escuro por 15 minutos (estado adaptado ao escuro, para aclimatação), de forma a permitir a completa oxidação do PSII (sítios reativos) (Herlory et al., 2013). A determinação dos parâmetros de fluorescência inicial (F_0) foi realizada com luz modulada de baixa intensidade luminosa ($<0,3 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$), de acordo com a metodologia descrita em Genty et al. (1989). A fluorescência máxima (F_m) foi determinada após pulsos de luz saturante com $2600 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e duração de 0,3 segundos, que foram reproduzidos em frequência de 600 Hz. Através da diferença entre F_0 e F_m foi determinada a fluorescência variável (F_v). A partir dos valores desses parâmetros de fluorescência, foi obtido o rendimento quântico máximo do PSII (F_v/F_m) (Schreiber et al., 1986; Schreiber e Bilger, 1993). Os valores dos parâmetros F_0 , F_m e ϕ_M são fornecidos pelo equipamento. A eficiência do complexo de evolução do oxigênio (CEO) do PSII (F_0/F_v) também foi calculado a partir da emissão de fluorescência das células adaptadas ao escuro (Kriedemann et al., 1985).

A determinação de parâmetros da performance fotossintética das células algais foi obtida por indução cinética de fluorescência (Herlory et al., 2013). As amostras adaptadas ao escuro foram submetidas à luz actínica em intensidade de $64 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ por um período de 15 minutos, com aplicação do pulso de saturação a cada 20 segundos. Os valores de fluorescência máxima na presença de luz (F_m') e fluorescência inicial na luz (F_s) foram obtidos e, a partir desses dados, foram calculados os parâmetros de fluorescência variável no estado adaptado à luz ($F_v' = F_m' - F_s$), coeficiente de dissipação fotoquímica (qP), coeficientes

de dissipação não-fotoquímica (qP e NPQ) e rendimento quântico máximo efetivo do PSII (ϕ'_M) (Roháček, 2002). Os valores de F_m' e ϕ'_M são fornecidos pelo equipamento. A fim de se detectar qualquer sinal de fluorescência de fundo, antes da determinação dos parâmetros de fluorescência das amostras era realizado um branco através da determinação da fluorescência do meio de cultivo sem presença de alga (para as amostras do controle) e do meio de cultivo com os compostos de cobre (sem adição de algas) para cada concentração avaliada.

Tabela 1: Parâmetros de fluorescência calculados a partir das medidas de fluorimetria de pulso de amplitude modulada (PAM) (Adaptado de Herlory et al., 2013).

Parâmetro de fluorescência	Sinônimo	Definição	Equação	Referências bibliográficas
F_v/F_m	ϕ_{PO} , $\phi_{Máx}$, ϕ_M , ϕ_{MPSII} , $\Delta\phi_m$	Rendimento (eficiência) quântico máximo do PSII	$(F_m - F_0)/F_m$	Schreiber (2004)
F_0/F_v		Eficiência do complexo de evolução do oxigênio	$F_0/(F_m - F_0)$	Kriedemann et al., (1985)
F_q'/F_m'	$\Delta F/F_m'$, ϕ_M' , ϕ_{PSII}	Rendimento (eficiência) quântico efetivo do PSII	$(F_m' - F_s)/F_m'$	Baker (2008), Cosgrove e Borowitzka (2010), Genty et al. (1989)
qP	qP, F_q'/F_v , qQ, q(P)	Dissipação fotoquímica	$(F_m' - F_s)/(F_m' - F_0)$	Bilger e Schreiber (1986), Juneau e Popovic (1999)
qN	qN, q(N)	Dissipação não-fotoquímica	$1 - (F_m' - F_0)/(F_m - F_0)$	Bilger e Schreiber (1986), Juneau e Popovic (1999)
NPQ		Dissipação não-fotoquímica	$(F_m - F_m')/F_m'$	Bilger e Björkman (1990)

4.8. Análise dos dados

Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e seguidos por teste de Tukey utilizando-se o software SigmaPlot (versão 11.0/2008). As diferenças entre os tratamentos foram consideradas significativas quando apresentaram nível de significância de 95% ($p < 0,05$). Os valores de Concentração de Inibição do Crescimento Médio (IC_{50}), e seus respectivos intervalos com nível de confiança de 95%, foram calculados a partir da equação de regressão linear obtida após plotagem das concentrações testadas para os diferentes compostos após transformação logarítmica em função das porcentagens de inibição do crescimento da alga utilizando o software OriginPro, versão 9.0.

5. RESULTADOS

5.1. Toxicidade de nanopartículas de óxido de cobre (CuO) e cloreto de cobre (CuCl₂) sobre o crescimento e composição bioquímica da clorófitica *Raphidocelis subcapitata*

5.1.1. Caracterização das nanopartículas

A caracterização morfológica das nano-CuO está ilustrada na Figura 2 (A e B), onde são apresentadas imagens obtidas a partir de Microscopia de Força Atômica. Nelas pode-se visualizar que as nano-CuO eram homogêneas e com formato esférico no meio do cultivo das algas. É possível notar diferenças entre os tamanhos das partículas, principalmente na imagem ampliada (Figura 1B), indicando formação de agregados de diferentes tamanhos.

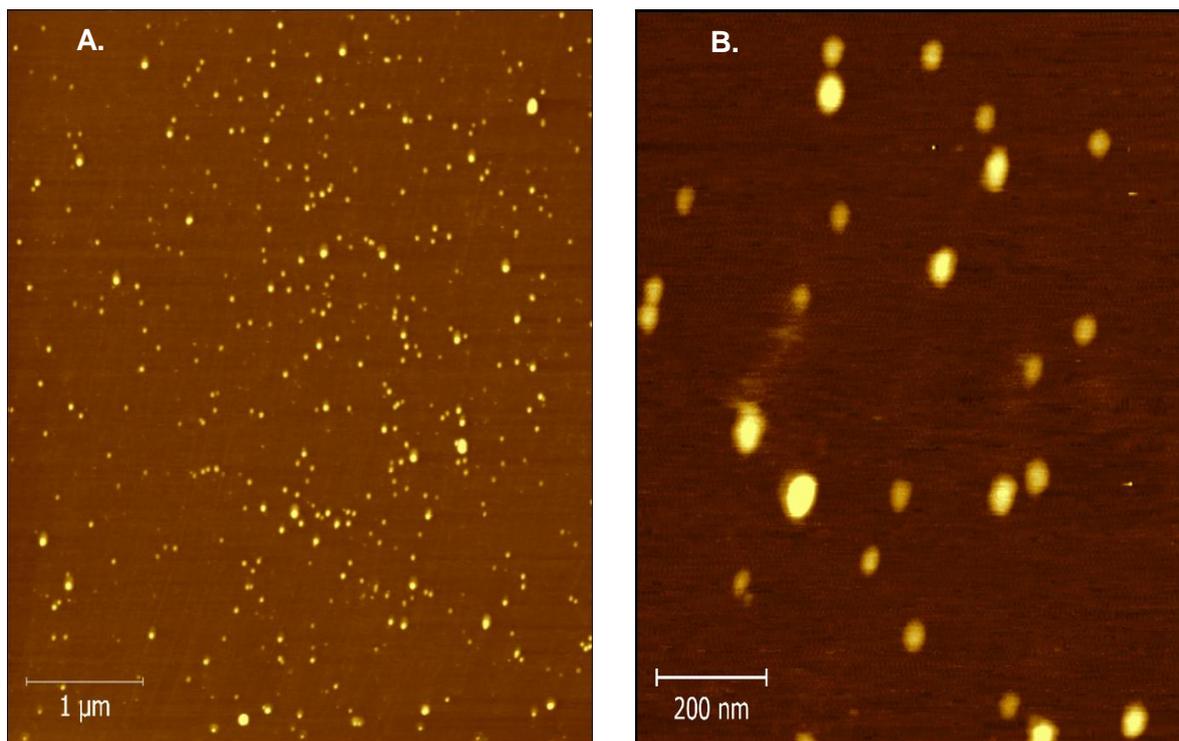


Figura 2: Imagem de Microscopia de Força Atômica (AFM) da nanopartícula de CuO com 10 x 10 µm de área (A) e 1 x 1 µm de área (B).

Na Figura 3 é apresentada uma comparação das porcentagens de distribuição dos tamanhos da nanopartícula através da imagem obtida por AFM, em que a amostra utilizada é seca, e também por DLS, em que a amostra é medida em solução. O tamanho das partículas medido por AFM teve uma variação de 10 a 100 nm. O tamanho das nanopartículas medidas por DLS foi maior, ficando entre 100 a 1000 nm, indicando a formação de agregados.

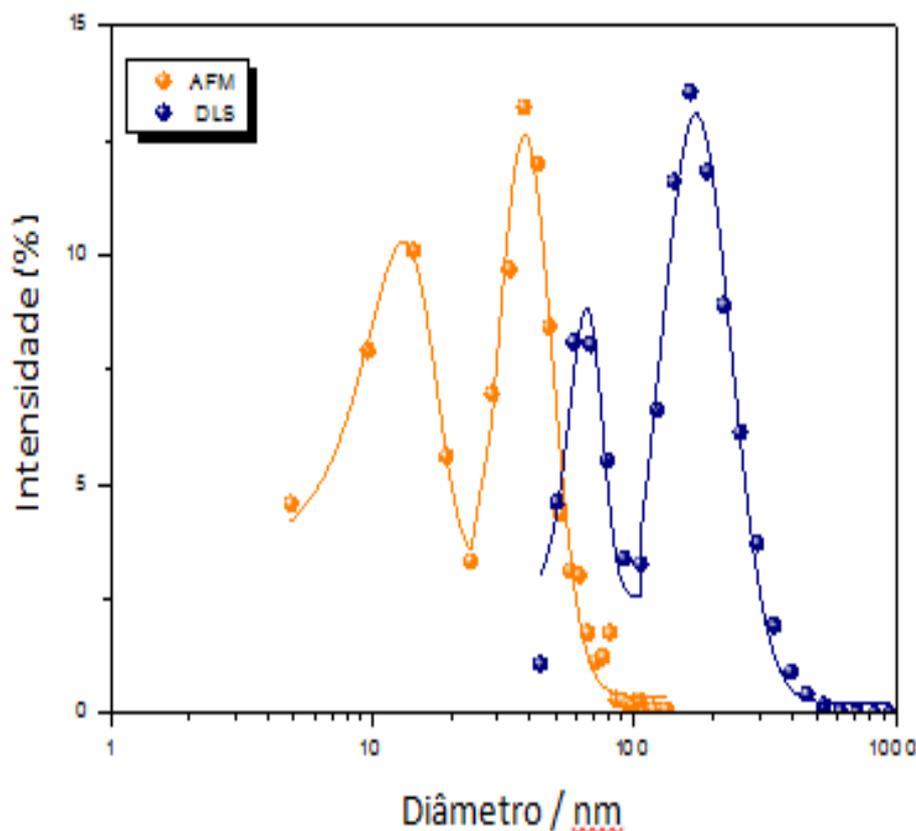


Figura 3: Intensidade, em porcentagem, da distribuição dos tamanhos das nanopartículas de CuO medidas através de AFM (Microscopia de Força Atômica) e DLS (Espalhamento Dinâmico da Luz).

Na Tabela 2, são apresentados os dados de potencial-zeta (mV), tamanho hidrodinâmico médio (nm) e Índice de Polidispersividade (PDI) das nano-CuO obtidos nos meios experimentais durante a exposição (0 e 96 h). As nanopartículas formaram grandes aglomerados nos meios de exposição, com diâmetros que variaram de $248,9 \pm 9,0$ a $549 \pm 22,2$ nm, demonstrando a alta tendência de aglomeração ao longo do tempo. O tamanho dos agregados, aparentemente, é dependente da concentração de nano-CuO no meio de cultivo, uma vez que as concentrações mais altas formaram aglomerados maiores. A carga de superfície, medida como potencial-zeta, alterou entre o início e o fim do experimento,

demonstrando tendência de estabilidade ao longo do tempo em todas as concentrações. Os resultados do PDI também indicam a tendência de agregação das partículas, uma vez que os valores obtidos foram todos altos (>0,5). Apenas a concentração de $12,6 \times 10^{-4}$ mol Cu L⁻¹ teve boa dispersividade, em 0 hora (PDI = $0,367 \pm 0,008$).

Tabela 2: Medidas de caracterização das nano-CuO em meio L. C. Oligo durante a exposição.

[Nano-CuO] (mol L ⁻¹)	Tempo	Potencial-Zeta (mV)	Diâmetro médio (nm)	PDI
$12,6 \times 10^{-6}$	0 hora	-17,9	$248,9 \pm 56,99$	$0,783 \pm 0,03$
	96 horas	-27	$327,13 \pm 11,67$	$0,54 \pm 0,02$
$12,6 \times 10^{-5}$	0 hora	-25,9	$364,86 \pm 9,27$	$0,367 \pm 0,008$
	96 horas	-31,6	$549 \pm 22,2$	$0,717 \pm 0,03$
$12,6 \times 10^{-4}$	0 hora	-25,9	$470,15 \pm 78,98$	$0,83 \pm 0,12$
	96 horas	-26,4	$502,9 \pm 6,99$	$0,659 \pm 0,02$

5.1.2. Densidade Celular

O crescimento da *R. subcapitata* foi significativamente afetado pelos tratamentos com CuCl₂ e nano-CuO a partir da terceira concentração testada de cada composto (Figura 4 A-B). Foi observado estímulo do crescimento das algas nas duas concentrações mais baixas do tratamento com a nano-CuO e na mais baixa do tratamento com o sal de cobre, seguido por redução nas concentrações mais altas. O efeito tóxico do cobre no tratamento com CuCl₂ foi mais acentuado do que o tratamento com nanopartícula, uma vez que as concentrações que geraram inibição de crescimento da alga tratada com CuCl₂ foram bem mais baixas do que as que reduziram o crescimento das células algais tratadas com nano-CuO.

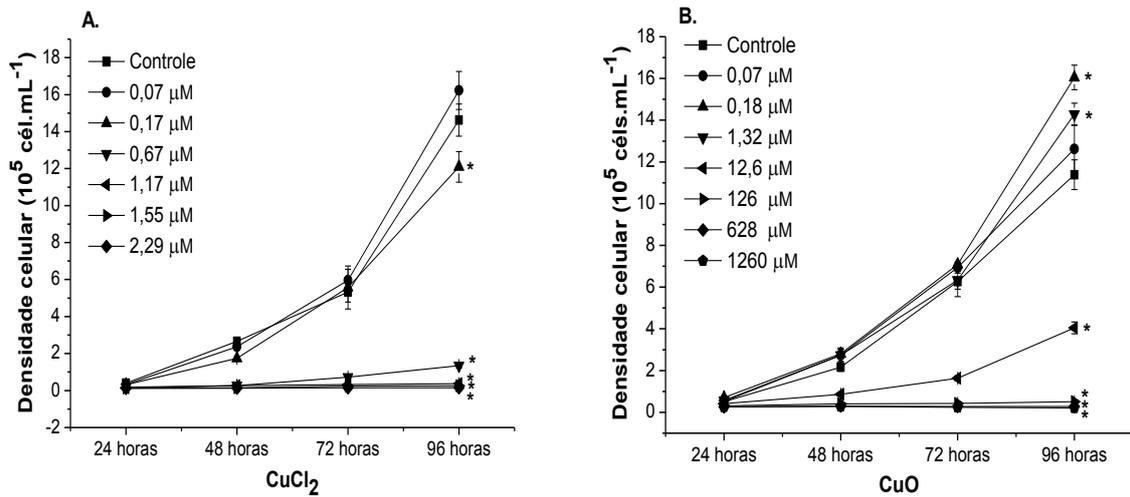


Figura 4: Densidade celular da alga *Raphidocelis subcapitata* ao longo das 96 horas de tratamento com CuCl_2 e nano-CuO. O símbolo * indica diferença significativa em relação ao controle em 96 horas ($p < 0,05$).

As equações apresentadas na Figura 5 foram obtidas a partir da regressão linear dos dados e utilizadas para calcular os valores de $\text{IC}_{50-96\text{h}}$. A $\text{IC}_{50-96\text{h}}$ encontrada para o tratamento com o CuCl_2 ($0,65 \mu\text{M Cu L}^{-1}$) foi cerca de 113 vezes menor que a encontrada para o tratamento com nanopartícula ($74,16 \mu\text{M Cu L}^{-1}$), apontando menor toxicidade da nano-CuO em relação ao CuCl_2 .

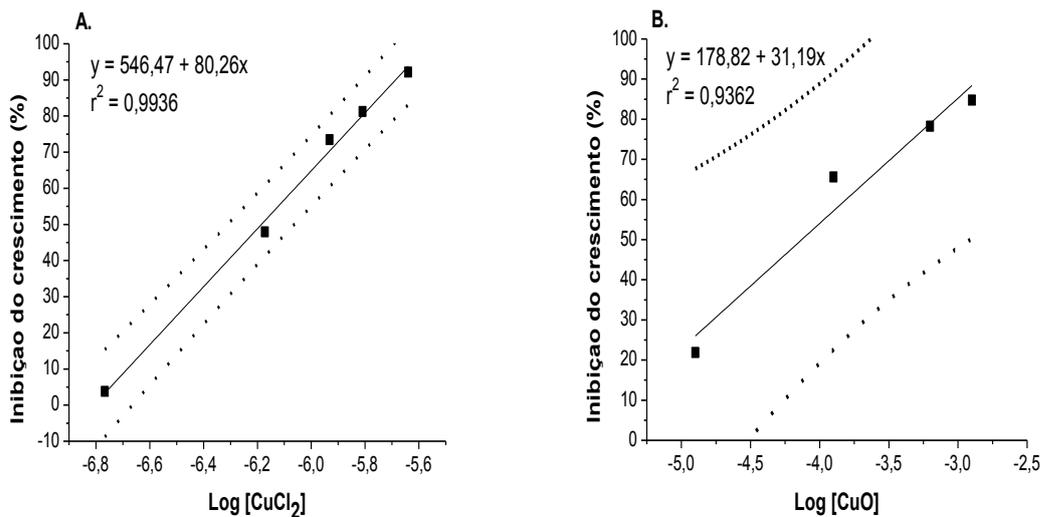


Figura 5: Porcentagens de Inibição de Crescimento da alga *Raphidocelis subcapitata* em relação ao Log das concentrações de exposição ao cloreto de cobre (CuCl_2) e nanopartículas de CuO. Linhas pontilhadas indicam o intervalo de confiança (95%).

Os valores de IC_{50} diminuíram ao longo do experimento, indicando maior efeito do cobre quanto maior o tempo de exposição (Tabela 3). Ao longo de todo o experimento, o $CuCl_2$ causou maior efeito de inibição do crescimento sobre a alga, como se pode observar pelos menores valores de IC_{50} em relação ao tratamento com nano-CuO. Por exemplo: o valor de $IC_{50-72\text{ h}}$ para a nano-CuO na alga foi cerca de 80 vezes maior do que o valor encontrado para o $CuCl_2$.

Tabela 3: Valores de Concentração de Inibição do Crescimento Médio (IC_{50}), assim como seus respectivos intervalos de confiança (95%), em mol Cu L⁻¹, da alga *R. subcapitata* tratada com nano-CuO e $CuCl_2$ em 24, 48, 72 e 96 h.

	$IC_{50-24\text{ h}}$	$IC_{50-48\text{ h}}$	$IC_{50-72\text{ h}}$	$IC_{50-96\text{ h}}$
Nano-CuO	30(6,4 - 140)x10 ⁻⁴	1,16(0,12 - 10,6)x10 ⁻⁴	0,52(0,04 - 4,93)x10 ⁻⁴	0,74(0,05 - 10,05)x10 ⁻⁴
$CuCl_2$	0,48(0,20 - 1,13)x10 ⁻⁶	0,45(0,19 - 1,09)x10 ⁻⁶	0,65(0,19 - 1,05)x10 ⁻⁶	0,65(0,49 - 0,86)x10 ⁻⁶

5.1.3. Composição Bioquímica da microalga *Raphidocelis subcapitata*

Não foi possível quantificar o conteúdo de lipídios, carboidratos, peso seco nem avaliar as classes lipídicas das duas concentrações mais altas de cada composto (concentrações 1,55 e 2,29 $\mu\text{M Cu L}^{-1}$ do teste com $CuCl_2$ e 628 e 1260 $\mu\text{M Cu L}^{-1}$ do teste com a nanopartícula), pois a inibição do crescimento foi muito alta e as células restantes não foram suficientes para permitir a detecção do teor desses componentes bioquímicos no presente trabalho. Os resultados para cada componente bioquímico foram avaliados em nível celular, e estão apresentados em pg por célula.

5.1.4. Peso Seco

Na Figura 6 estão apresentados os resultados das análises na composição bioquímica da microalga. O peso seco (Figuras 6 A-B) das algas aumentou significativamente nas concentrações mais altas nos tratamentos com $CuCl_2$ e com nano-CuO. O maior aumento encontrado foi no tratamento com $CuCl_2$ (88,7 pg cél⁻¹), na maior concentração (1,17 $\mu\text{M Cu L}^{-1}$), sendo cerca de cinco vezes maior do que o peso seco do controle (17,7 pg cél⁻¹). O

tratamento com a nanopartícula também causou aumento do peso seco da microalga na concentração mais alta (45,8 pg cél⁻¹ na concentração 126 µM Cu L⁻¹), que foi aproximadamente duas vezes maior do que no controle (19,2 pg cél⁻¹). O efeito do cobre foi maior nas células algais tratadas com o sal, uma vez que o estresse gerado pelo cobre levou a um resultado maior do peso seco em duas das concentrações do cloreto. Maiores valores de peso seco no tratamento com nano-CuO só foram encontrados em concentrações cerca de 100 vezes mais altas do que as que causaram alteração nas algas contaminadas com o sal.

5.1.5. Carboidratos totais

O teor de carboidratos nas células algais (Figuras 6 C-D) aumentou cerca de oito vezes na concentração mais alta de nano-CuO (16,3 pg cél⁻¹ na concentração de 126 µM Cu L⁻¹) em relação ao controle (2,0 pg cél⁻¹), demonstrando o efeito do estresse causado pelo cobre sobre neste componente bioquímico. No tratamento com o sal, houve uma pequena queda na quantidade de carboidratos na primeira concentração (8,6 pg cél⁻¹ em 0,07 µM Cu L⁻¹) em relação ao controle (10,6 pg cél⁻¹). Não foi possível quantificar o teor de carboidratos nas algas das duas últimas concentrações do sal (0,67 e 1,17 µM Cu L⁻¹), pois a quantidade de células era muito baixa e os valores de carboidrato ficaram abaixo do limite de detecção do equipamento, portanto não é possível afirmar em qual dos tratamentos o estresse causado pela toxicidade do cobre teve maior efeito.

5.1.6. Lipídios Totais e Classes Lipídicas

A produção de lipídios (Figuras 6E-6F) aumentou significativamente nas duas maiores concentrações de cobre nas algas tratadas com CuCl₂ (6,95 pg.cel⁻¹ em 0,67 µM Cu L⁻¹ e 19,34 pg.cel⁻¹ em 1,17 µM Cu L⁻¹) e na maior concentração do tratamento com nano-CuO (10,42 pg.cel⁻¹ em 126 µM Cu L⁻¹). Na concentração mais alta de CuCl₂ a produção de lipídios foi cerca de 11 vezes maior do que o teor de lipídios encontrado no controle (1,67 pg.cel⁻¹) deste tratamento. O efeito do cobre no tratamento do CuCl₂ foi maior, gerando um maior teor de lipídios por célula do que o encontrado na maior concentração da nanopartícula.

Houve alteração nas classes de lipídios nos dois compostos de cobre testados (Tabela 4), sendo que os efeitos mais acentuados foram encontrados em algas expostas ao sal de cobre: todas as classes lipídicas aumentaram significativamente nas duas maiores concentrações de CuCl₂. A classe de lipídios polares (PL) representou a maior porcentagem

dos lipídios totais quantificados tanto nas células algais expostas ao CuCl_2 (cerca de 39% na concentração mais alta) quanto à nano-CuO (cerca de 62% dos lipídios totais na maior concentração). As classes mais afetadas no tratamento com o sal foram ST e ALC, seguido pelo AMPL. Os esteróis aumentaram cerca de 56 vezes em relação ao teor encontrado no controle. O teor de ALC foi cerca de 42 vezes maior e o AMPL cerca de 13 vezes em relação ao controle. No tratamento com nano-CuO, a maior parte das alterações detectadas se deu na concentração mais alta de cobre, na qual ocorreu aumento de lipídios nas classes HC, TAG, ST e PL. A maior alteração encontrada foi na classe dos hidrocarbonetos (aumentou cerca de 13 vezes), seguida pela dos triglicerídeos (aumentou cerca de 10 vezes) e fosfolipídios (aumentou cerca de cinco vezes em relação ao controle). Houve diminuição do teor de lipídios das classes FFA e ALC e, com exceção da diminuição de AMPL na concentração de $126 \mu\text{M L}^{-1}$ de nano CuO, não houve diferença significativa de AMPL em relação ao controle. O teor de lipídios por classe corrobora os efeitos mais acentuados do sal sobre a alga, em relação à nanopartícula, uma vez que as alterações encontradas neste tratamento foram maiores.

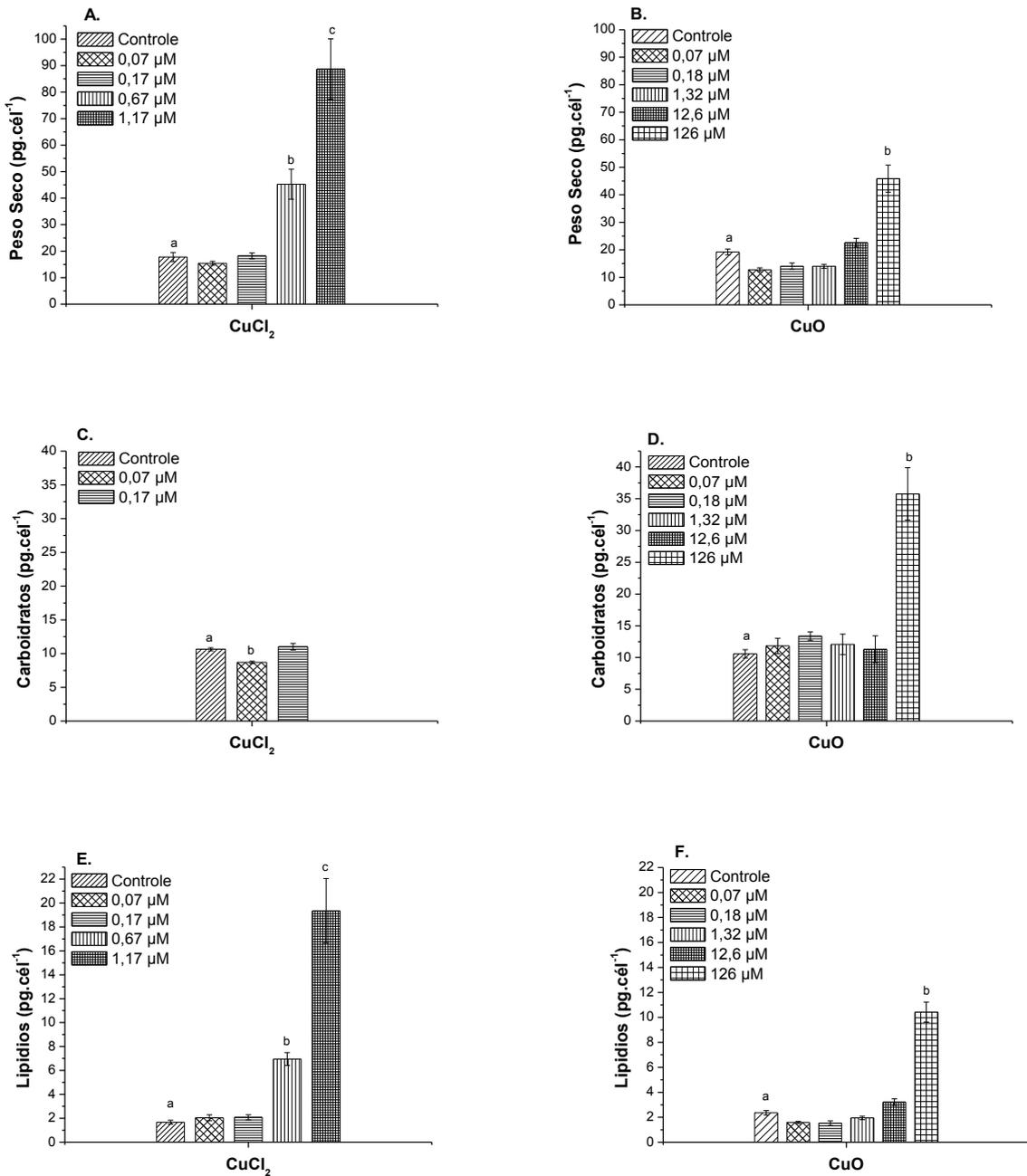


Figura 6: Efeitos do cobre sobre o peso seco (A e B), carboidratos (C e D) e lipídios totais (E e F) da clorófitica *Raphidocelis subcapitata* tratada com CuCl₂ e nano-CuO. Os resultados são média ± desvio-padrão e as letras diferentes em cada tratamento significam diferença significativa ($p < 0,05$) em relação ao controle (0,06 μM Cu L⁻¹).

Tabela 4: Média \pm desvio-padrão das classes lipídicas (pg cél⁻¹) de *Raphidocelis subcapitata* expostas durante 96 h aos tratamentos com CuCl₂ e nano-CuO. Os resultados foram comparados para cada classe lipídica em 95% de significância (p < 0,05) (valores com letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa). Classes lipídicas: HC (hidrocarboneto alifático), WE/SE (éster de cera), KET (ketone), TAG (triglicerídeos), FFA (ácido graxo livre), ALC (álcool alifático livre), ST (esterol), AMPL (lipídios polares móveis em acetona) e PL (fosfolipídios). * 0,06 x 10⁻⁶ mol Cu L⁻¹. ND significa *não detectado*

	Classes lipídicas (pg cél ⁻¹)						
	HC	TAG	FFA	ALC	ST	AMPL	PL
CuCl₂							
Controle*	0,06 \pm 0,001 ^a	0,10 \pm 0,005 ^a	0,02 \pm 0,004 ^a	0,01 \pm 0,001 ^a	0,11 \pm 0,01 ^a	0,26 \pm 0,02 ^a	1,13 \pm 0,10 ^a
0,07 μ M	0,08 \pm 0,007	0,07 \pm 0,009 ^b	0,01 \pm 0,001	0,003 \pm 0,0002	0,118 \pm 0,007	0,31 \pm 0,03	1,44 \pm 0,18
0,17 μ M	0,08 \pm 0,007	ND	0,04 \pm 0,003	0,002 \pm 0,0008	0,14 \pm 0,01	0,27 \pm 0,02	1,35 \pm 0,1
0,67 μ M	0,87 \pm 0,10 ^b	ND	0,39 \pm 0,005 ^b	0,14 \pm 0,0009 ^b	1,73 \pm 0,20 ^b	0,96 \pm 0,08 ^b	3,54 \pm 0,47 ^b
1,17 μ M	1,32 \pm 0,15 ^c	ND	0,46 \pm 0,03 ^c	0,42 \pm 0,07 ^c	6,13 \pm 1,04 ^c	3,57 \pm 0,50 ^c	7,64 \pm 0,87 ^c
Nano CuO							
Controle*	0,15 \pm 0,02 ^a	0,14 \pm 0,02 ^a	0,17 \pm 0,02 ^d	0,04 \pm 0,01 ^d	0,15 \pm 0,009 ^d	0,37 \pm 0,03 ^d	1,39 \pm 0,19 ^a
0,07 μ M	0,10 \pm 0,003	0,12 \pm 0,002	0,13 \pm 0,01 ^e	0,02 \pm 0,002 ^e	0,14 \pm 0,009	0,27 \pm 0,04	0,97 \pm 0,08
0,18 μ M	0,11 \pm 0,01	0,10 \pm 0,01	0,02 \pm 0,001 ^a	0,01 \pm 0,002 ^a	0,10 \pm 0,009 ^e	0,27 \pm 0,04	1,06 \pm 0,10
1,32 μ M	0,11 \pm 0,007	0,13 \pm 0,01	0,04 \pm 0,003 ^a	0,01 \pm 0,002 ^a	0,12 \pm 0,007	0,28 \pm 0,01	1,19 \pm 0,06
12,6 μ M	0,29 \pm 0,02	0,35 \pm 0,06	0,08 \pm 0,005 ^f	0,031 \pm 0,006 ^f	0,31 \pm 0,05 ^f	0,14 \pm 0,04 ^e	2,02 \pm 0,08 ^d
12,6 μ M	1,43 \pm 0,20 ^c	1,45 \pm 0,23 ^b	ND	ND	ND	0,38 \pm 0,01	6,54 \pm 0,50 ^e

5.2. Efeitos de nanopartículas de óxido de cobre (CuO) e do cloreto de cobre (CuCl₂) sobre a atividade fotossintética da clorófitica *Raphidocelis subcapitata*

5.2.1. Taxa de crescimento e teor de clorofila *a* da alga *R. Subcapitata*

Na Figura 7 (A e B), estão apresentadas as taxas de crescimento específico para as algas expostas aos dois compostos de cobre (CuCl₂ e nano-CuO). Com exceção das concentrações mais altas do tratamento com nano-CuO ($6,28 \times 10^{-4}$ e $12,6 \times 10^{-4}$ mol Cu L⁻¹), após 96 horas de exposição, nas quais ocorreu uma redução da taxa de crescimento em 38% e 78% respectivamente, houve aumento da taxa de crescimento ao longo do tempo para cada concentração de cobre testada nos dois tratamentos, indicando que houve crescimento ao longo do período experimental. Os dois compostos de cobre afetaram a taxa de crescimento da alga: conforme se aumentou a concentração do metal, menor foi a taxa de crescimento algal para todos os dias de tratamento, sendo que a menor taxa encontrada foi para a concentração mais alta de nano-CuO em 96 horas de exposição ao metal ($\mu_{0-96hrs} = 0,008$ em $12,6 \times 10^{-4}$ mol Cu L⁻¹).

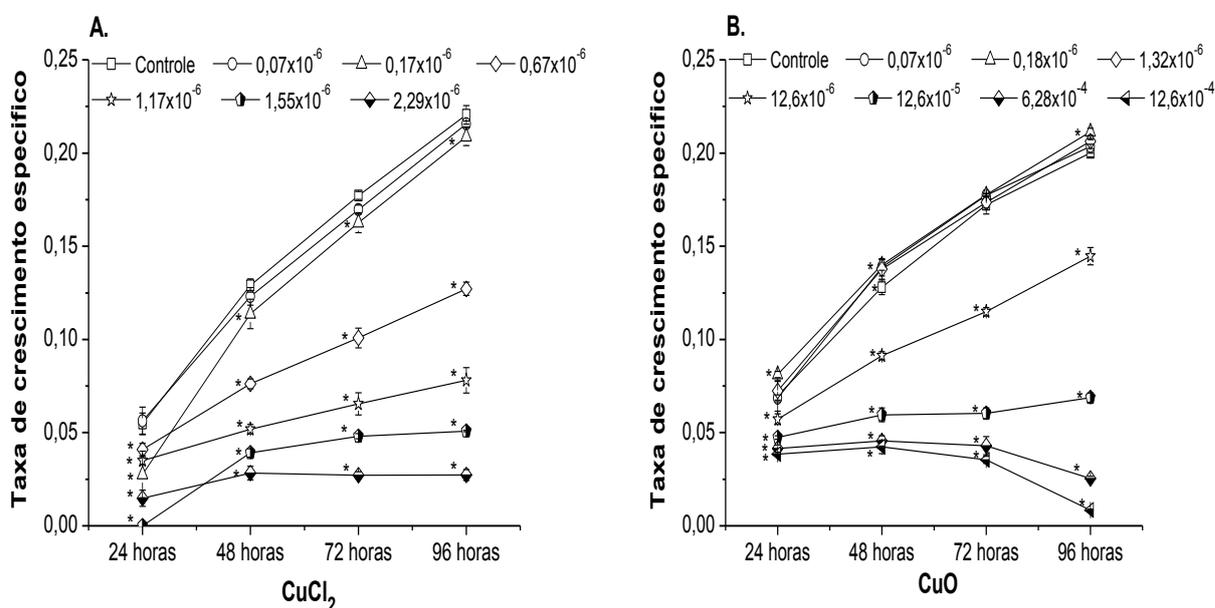


Figura 7: Taxa de crescimento específico (divisões dia⁻¹) da microalga *Raphidocelis subcapitata* ao longo das 96 horas de exposição ao CuCl₂ (A) e à nano-CuO (B). O símbolo * indica diferença significativa em relação ao controle ($0,06 \times 10^{-6}$ mol Cu L⁻¹) para cada dia dos tratamentos ($p < 0,05$).

Houve aumento do conteúdo de clorofila *a* nas células do controle dos dois tratamentos ao longo do tempo, o que indica que a alga estava em boas condições fisiológicas ao longo do experimento (Figura 8 A e B). Nas algas tratadas com CuCl_2 , ocorreu uma diminuição no teor de clorofila *a* conforme se aumentou a concentração de cobre entre 48 e 72 horas de exposição ao metal, mas ao final das 96 horas, o conteúdo de clorofila *a* foi estatisticamente equivalente ao do controle. Nas células algais tratadas com Nano-CuO, entre 24 e 72 horas, houve redução de clorofila, em relação ao controle, conforme se aumentou a concentração de cobre. Em 72 horas de exposição, as células aparentemente começaram a se recuperar, aumentando a produção de clorofila *a* e, em 96 horas, não houve diferença significativa entre o teor de clorofila *a* encontrado para o controle e para as duas concentrações mais altas de nano-CuO ($6,28 \times 10^{-4}$ e $12,6 \times 10^{-4} \text{ mol Cu L}^{-1}$).

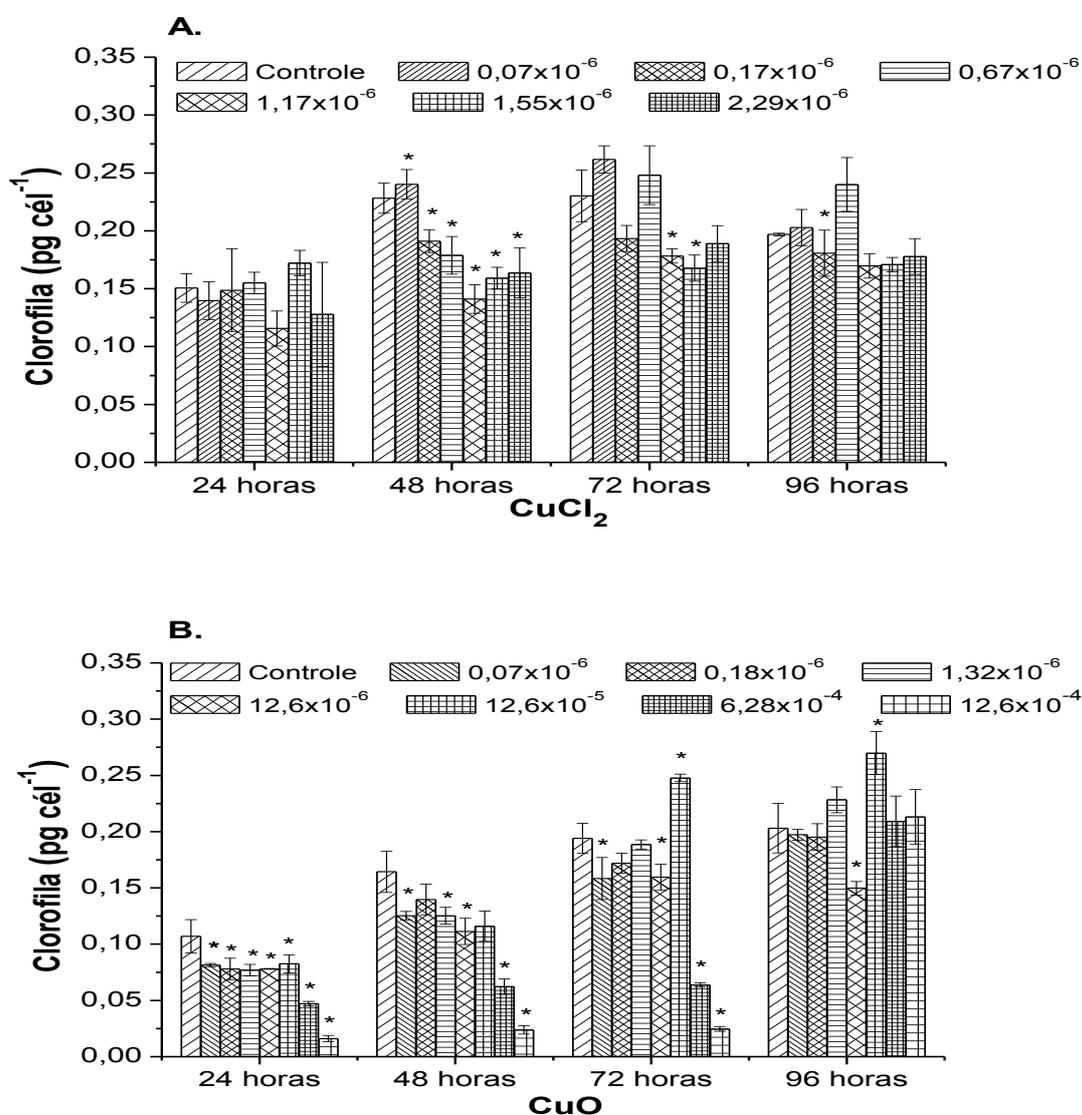


Figura 8: Teor de clorofila *a* (pg cél^{-1}) da clorócea *Raphidocelis subcapitata* ao longo das 96 horas de tratamento com CuCl_2 (A) e nano-CuO (B). Os resultados são média \pm desvio-padrão e o símbolo * indica diferença significativa em relação ao controle para cada dia dos tratamentos ($p < 0,05$).

5.2.2. Fluorescência e rendimentos quânticos da alga *R. subcapitata*

Na Figura 9, estão apresentados os parâmetros de fluorescência inicial (F_0) e fluorescência máxima (F_m), de 24 a 96 horas, para a alga exposta ao CuCl_2 (A e C) e ao nano-CuO (B e D). No presente estudo, o maior valor de F_0 encontrado foi de 525,75 para as algas do controle ($0,06 \times 10^{-6} \text{ mol Cu L}^{-1}$), após 96 horas de experimento, como era de se esperar uma vez que as algas do controle estavam em condições ótimas de crescimento. O segundo maior valor de F_0 foi de 447,08 para a concentração de $0,18 \times 10^{-6} \text{ mol Cu L}^{-1}$ do tratamento com nano-CuO após 96 horas de exposição às nanopartículas. Os menores valores de fluorescência inicial foram observados no controle do tratamento com nano-CuO após 24 horas, e em $0,67 \times 10^{-6} \text{ mol Cu L}^{-1}$ em 72 horas, nas algas expostas ao CuCl_2 (202 e 235, respectivamente). Os maiores valores de F_m foram encontrados para o Controle (1511,67) do tratamento com o CuCl_2 , e para a concentração de $0,18 \times 10^{-6} \text{ mol Cu L}^{-1}$ (1254,7) do tratamento com nano-CuO, após 96 horas de exposição ao metal, enquanto que os menores valores foram observados após 96 horas nas concentrações de $6,28 \times 10^{-6} \text{ mol Cu L}^{-1}$ do tratamento com sal de cobre e $2,29 \times 10^{-6} \text{ mol Cu L}^{-1}$ do tratamento com nano-CuO (310,2 e 468,62, respectivamente).

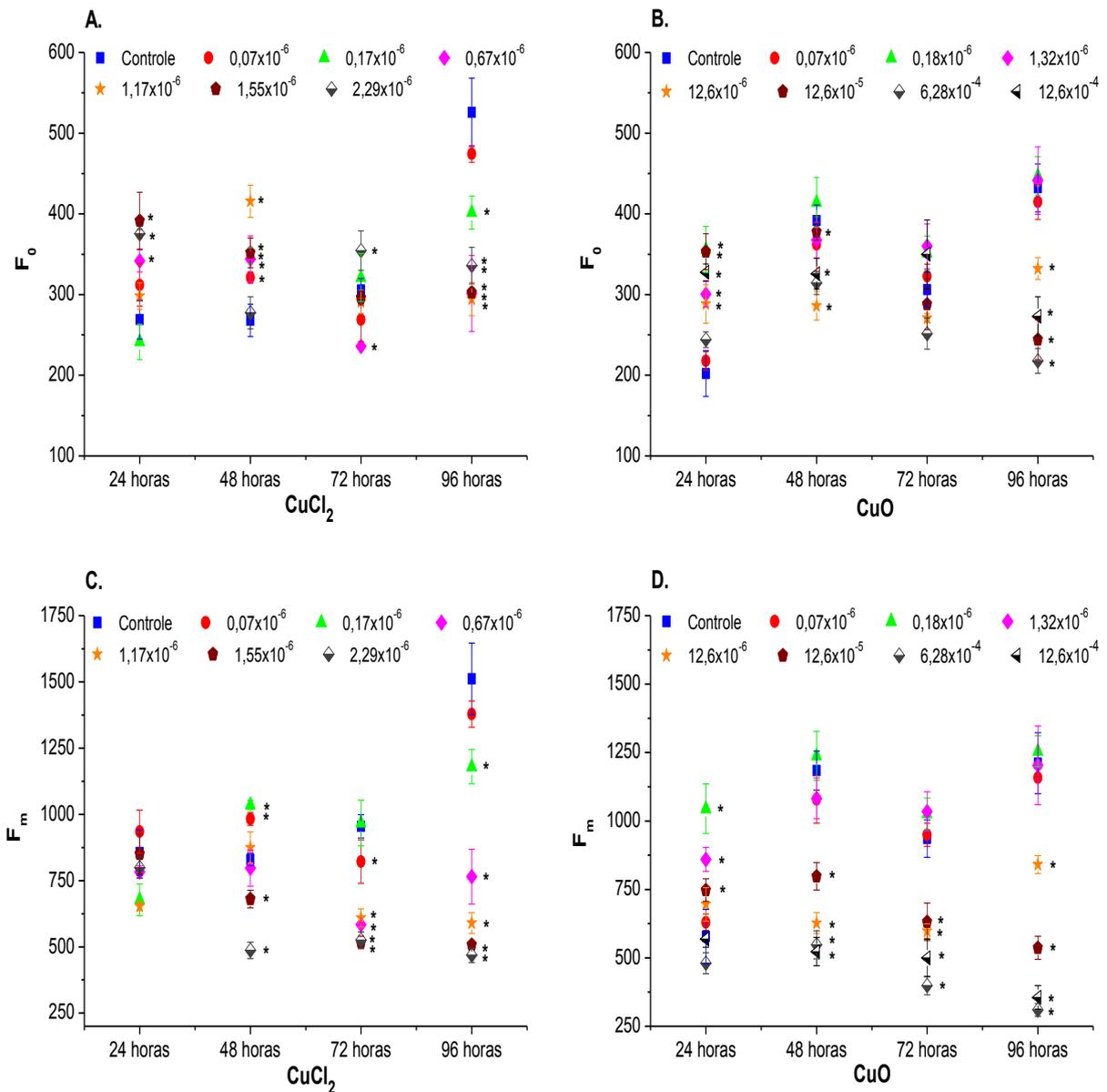


Figura 9: Variação nos parâmetros de fluorescência basal (F_0) e fluorescência máxima (F_m) da alga *Raphidocelis subcapitata* medidos ao longo de 96 horas de exposição ao $CuCl_2$ (A e C) e à nano- CuO (B e D). O símbolo * indica diferença significativa em relação ao controle para cada dia dos tratamentos ($p < 0,05$).

A variação do rendimento quântico máximo do PSII (ϕ_M) e a eficiência do CEO (F_0/F_v) da alga *R. subcapitata* ao longo do tempo, para cada tratamento, estão apresentados na Figura 10 (A,B). O ϕ_M permaneceu estável ao longo das 96 horas de experimento para o controle de cada tratamento, para as três concentrações mais baixas de $CuCl_2$ ($0,07 \times 10^{-6}$, $0,17 \times 10^{-6}$ e $0,67 \times 10^{-6}$ mol $Cu L^{-1}$) e de nano- CuO ($0,07 \times 10^{-6}$, $0,18 \times 10^{-6}$ e $1,32 \times 10^{-6}$ mol $Cu L^{-1}$), indicando a boa resposta fisiológica da alga, mesmo na presença de baixas concentrações de cobre, e demonstrando que as mesmas permaneceram saudáveis ao longo do experimento. Nas

concentrações mais altas de CuCl_2 ($1,17 \times 10^{-6}$, $1,55 \times 10^{-6}$ e $2,29 \times 10^{-6}$ mol Cu L⁻¹) e de nano-CuO ($12,6 \times 10^{-6}$, $12,6 \times 10^{-5}$, $6,28 \times 10^{-4}$ e $12,6 \times 10^{-4}$ mol Cu L⁻¹), a alga apresentou uma redução de ϕ_M quanto maior o tempo de exposição e a concentração de cobre. Após as 96 horas de exposição, para as algas tratadas com o sal de cobre, o menor valor de ϕ_M foi de 0,26 na concentração mais alta ($2,29 \times 10^{-6}$ mol Cu L⁻¹) e para as que ficaram expostas a nano-CuO foi de 0,22, na concentração de $12,6 \times 10^{-4}$ mol Cu L⁻¹.

No presente trabalho, os valores de F_o/F_v (Figura 10 C,D) permaneceram estáveis (entre 0,45 e 0,56) para o controle dos dois tratamentos e para as concentrações mais baixas de CuCl_2 ($0,07 \times 10^{-6}$ e $0,17 \times 10^{-6}$ mol Cu L⁻¹) e de nano-CuO ($0,07 \times 10^{-6}$, $0,18 \times 10^{-6}$ e $1,32 \times 10^{-6}$ mol Cu L⁻¹). Nas demais concentrações, para ambos os compostos de cobre, os valores de F_o/F_v aumentaram gradativamente ao longo do tempo e conforme o aumento das concentrações de cobre. O maior aumento foi observado na concentração mais alta de nano-CuO, na qual o valor de F_o/F_v aumentou em mais de 500% em relação ao que foi encontrado no controle.

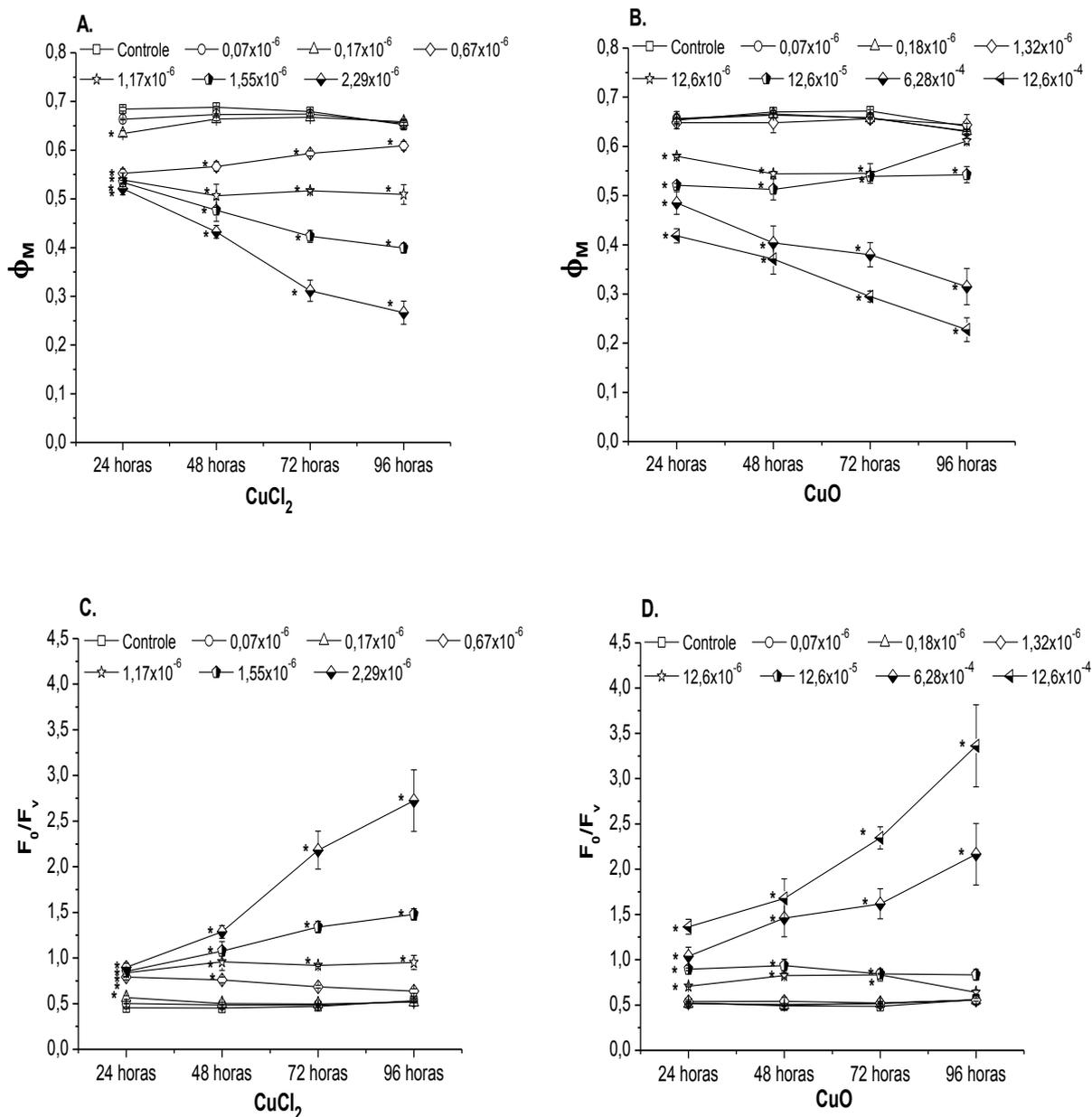


Figura 10: Variação dos parâmetros de fluorescência (Φ_M e F_0/F_v) da clorofíceia *Raphidocelis subcapitata* ao longo das 96 horas de tratamento com CuCl_2 (A e C) e com nano-CuO (B e D). O símbolo * indica diferença significativa em relação ao controle para cada dia dos tratamentos ($p < 0,05$).

Os rendimentos quânticos máximo (Φ_M) e efetivo (Φ_M') da alga após 96 horas de exposição aos dois compostos de cobre apresentaram comportamento semelhante nos dois tratamentos (Figura 11 A,B), com valores menores conforme o aumento da concentração do metal. Os primeiros efeitos de redução do Φ_M começaram a ser detectados nas concentrações de $1,17 \times 10^{-6}$ mol Cu L⁻¹ (no tratamento com CuCl_2) e $12,6 \times 10^{-5}$ mol Cu L⁻¹ (no tratamento com nano-CuO), chegando a uma redução de cerca de 39% e 60% para as concentrações mais altas de sal de cobre e nanopartículas de CuO, respectivamente. Houve redução de Φ_M' a

partir da concentração de $1,55 \times 10^{-6}$ mol Cu L⁻¹ no tratamento com CuCl₂, que na concentração mais alta ($2,29 \times 10^{-6}$ mol Cu L⁻¹) chegou a ser 46% menor (0,30) que o valor encontrado para o controle (0,56). No tratamento com nano-CuO, a redução dos valores de Φ_M' se deram a partir da concentração de $12,6 \times 10^{-5}$ mol Cu L⁻¹, chegando a ser 61% menor na concentração mais alta (0,21 em $12,6 \times 10^{-4}$ mol Cu L⁻¹) em relação ao controle (0,56).

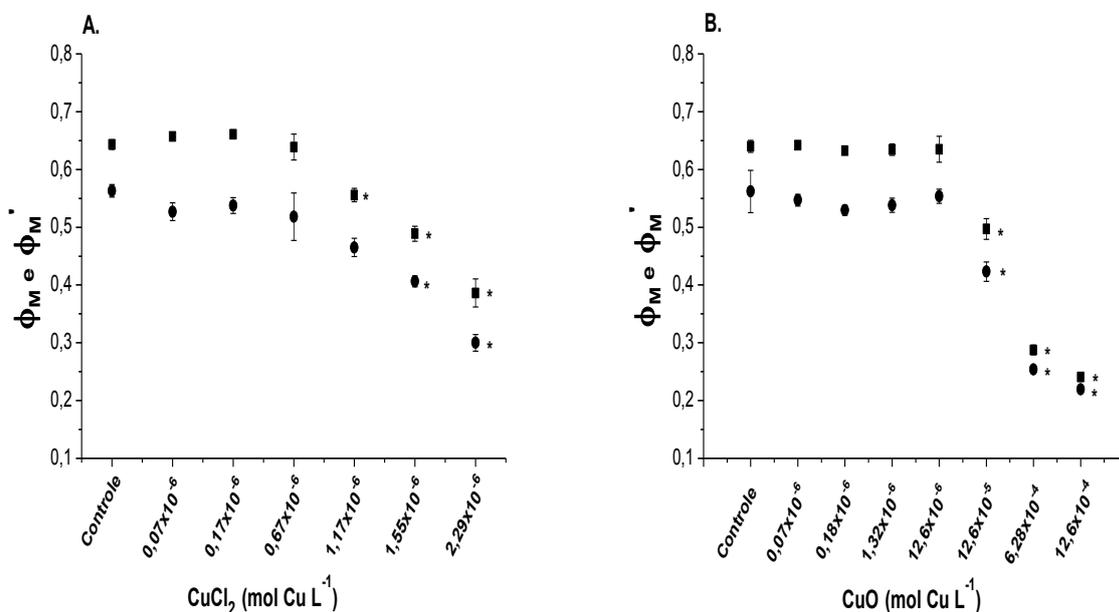


Figura 11: Rendimento quântico máximo (■) e Rendimento quântico efetivo (●) do fotossistema II da clorofícea *Raphidocelis subcapitata* após 96 horas de exposição ao CuCl₂ (A) e à nano-CuO (B). O símbolo * indica diferença significativa em relação ao controle para cada dia dos tratamentos ($p < 0,05$).

5.2.3. Coeficientes de dissipação fotoquímica e não fotoquímica da clorofícea *R. subcapitata*

Os parâmetros de dissipação fotoquímica (qP) e não-fotoquímica (qP e NPQ) estão apresentados na Figura 12 para o tratamento com o CuCl₂ (Figura 12A) e com nano-CuO (Figura 12B). Os valores de qP se mantiveram entre 0,90 e 1,01 para ambos os tratamentos. O valor mais baixo (0,90) foi encontrado na concentração de $0,67 \times 10^{-6}$ mol Cu L⁻¹ do tratamento com CuCl₂. O valor mais alto (1,01) foi obtido na concentração mais alta ($12,6 \times 10^{-4}$ mol Cu L⁻¹) do tratamento com nano-CuO. Os valores de qN e NPQ foram semelhantes. No tratamento com CuCl₂, houve um pequeno aumento de qN na concentração mais alta (0,35 em $2,29 \times 10^{-6}$ mol Cu L⁻¹) em relação ao valor encontrado para o controle (0,32). Mas no tratamento com nano-CuO, houve queda no qN da concentração mais alta (0,21 em $12,6 \times 10^{-4}$ mol Cu L⁻¹) em relação ao controle (0,28). Com relação ao NPQ, ocorreu redução gradativa dos valores deste parâmetro nas três concentrações mais altas de nano-CuO ($12,6 \times 10^{-5}$; $6,28 \times 10^{-4}$ e $12,6 \times 10^{-4}$ mol Cu L⁻¹).

4 mol Cu L^{-1}), chegando a 0,14 na concentração mais alta. O CuCl_2 não afetou esse parâmetro na alga.

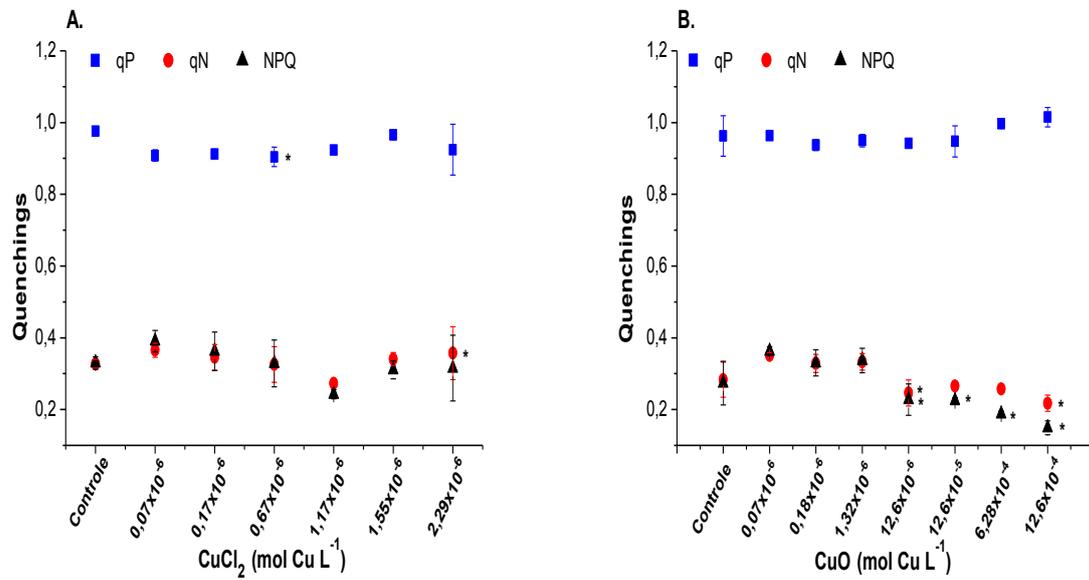


Figura 12: Variação nos parâmetros de dissipação de energia (qP, qN e NPQ) da microalga *Raphidocelis subcapitata* medidos após 96 horas de exposição ao CuCl_2 (A) e à nano-CuO (B). O símbolo * indica diferença significativa em relação ao controle para cada dia dos tratamentos ($p < 0,05$).

6. DISCUSSÃO

6.1. Toxicidade de nanopartículas de óxido de cobre (CuO) e cloreto de cobre (CuCl₂) sobre o crescimento e composição bioquímica da clorófitica *Raphidocelis subcapitata*

As nano-CuO apresentaram-se agregadas/aglomeradas nos meios de cultivo durante a exposição, como verificado pelos valores obtidos para o potencial zeta, tamanho hidrodinâmico e índice de dispersividade (Tabela 1). Isso pode ter ocorrido devido à constituição do meio de cultivo, que apresenta diversos nutrientes, os quais podem ter facilitado interações das nanopartículas bem como a agregação. A aglomeração das nano-CuO tem sido reportada em diversos estudos (Amorim et al., 2012; Gomes et al., 2012; Melegari et al., 2013; Regier et al., 2015). Bondarenko et al. (2013), revisando diversos trabalhos que testaram os efeitos de nano-CuO em organismos-teste, compararam a aglomeração dessas nanopartículas em diferentes tipos de água e meios de cultivo e encontraram que a aglomeração foi especialmente alta nos meios de cultivo utilizados para organismos-teste comumente usados em testes ecotoxicológicos (crustáceos e algas), o que foi confirmado pelos resultados do nosso trabalho. Os grandes aglomerados encontrados neste e em outros trabalhos apontam a ineficiência da completa dispersão das partículas por sonicação, o que pode indicar que essas partículas estão fortemente ligadas, de forma que essas ligações não podem ser desfeitas apenas com esse procedimento, ou que as partículas se reagregam rapidamente após o fim da sonicação (Franklin et al., 2007). O potencial-zeta por sua vez pode ser afetado pelo pH ou força iônica do meio no qual as nanopartículas estão dispersas. A interação dessas partículas se dá pela magnitude deste potencial, ou seja, quanto maior o potencial-zeta (± 30 mV), maior a estabilização por carga do sistema devido à repulsão das cargas para superar a tendência natural de aglomeração das nanopartículas (Mahmoudi et al., 2011; Melegari et al., 2013). Neste trabalho, não houve variação significativa dos valores de pH nos meios de exposição (dados não apresentados) e as nano-CuO apresentaram uma tendência de estabilização ao longo do tempo, o que também foi reportado por Melegari et al. (2013).

A coloração apresentada pelos meios durante a exposição às nano-CuO levantaram dúvidas em relação ao efeito de sombreamento dessas nanopartículas sobre o crescimento das algas. Notou-se um leve escurecimento do meio de cultivo nas soluções-teste mais concentradas ($12,6 \times 10^{-5}$, $6,28 \times 10^{-4}$ e $12,6 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹). Esse problema foi também questionado em alguns estudos, que realizaram experimentos com o intuito de avaliar se esses efeitos da nano-CuO poderiam interferir na toxicidade sobre a alga (Aruoja et al., 2009; Melegari et al., 2013). Esses estudos sugerem que o possível efeito de sombreamento não foi

significativo para causar inibição do crescimento ou alterar a viabilidade das algas. Sendo assim, os resultados encontrados nas maiores concentrações de nano-CuO do presente trabalho provavelmente são reflexo da toxicidade do cobre e não de efeito de sombreamento.

Corroborando diversos estudos que compararam a toxicidade de nanopartículas de CuO e cobre dissolvido em organismos aquáticos (Adam et al., 2015; Gunawan et al., 2011; Siddiqui et al., 2015), neste trabalho encontramos maior efeito tóxico do sal de cobre do que das nanopartículas sobre o crescimento da alga *R. subcapitata*. Houve estímulo de crescimento nas concentrações mais baixas de cobre, tanto para o tratamento com o sal quanto para as algas tratadas com as nano-CuO. Este resultado, também encontrado por outros autores (Lim et al., 2006; Lombardi et al., 2007; Thomas et al., 2013), é esperado, uma vez que o cobre é um micronutriente essencial utilizado pelas microalgas. A faixa de tolerância para metais-traço varia entre organismos e a resposta à toxicidade desses metais difere entre as espécies (Lombardi et al., 2007). Em altas concentrações, o cobre tende a danificar a membrana celular e causar redução da concentração de potássio dentro das células. O excesso de cobre acumulado na parede celular é absorvido pela célula, afetando as enzimas e causando redução na reprodução (Lim et al., 2006).

Bossuyt e Janssen (2004) registraram uma redução gradativa da taxa de crescimento para essa mesma espécie de alga conforme aumento da concentração de cobre durante o período de aclimação da alga. No presente estudo, a inibição do crescimento das algas tratadas com o CuCl_2 foi mais intensa, sendo detectada em concentrações do cobre muito mais baixas que as das nanopartículas, corroborando nossa hipótese de que a origem da toxicidade das nano-CuO é devido ao íon cobre liberado. A partir das concentrações $0,17 \times 10^{-6} \text{ mol Cu L}^{-1}$ do CuCl_2 e $12,6 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ das nano-CuO observou-se inibição do crescimento das células algais. A máxima redução do crescimento (88,3%) foi observada na concentração de $2,29 \times 10^{-6} \text{ mol Cu L}^{-1}$ das algas contaminadas com o sal. Há evidências em microalgas marinhas de que, uma vez que o cobre é internalizado, esse metal oxida grupos tiol no citoplasma, levando à diminuição da taxa de redução da glutathione oxidada (tripeptídeo quelante de metais), que por sua vez afeta a formação do fuso na divisão celular (Stauber e Florence, 1987), o que prejudica a divisão das células, dificultando o crescimento das algas. Sob condições de estresse, os organismos podem utilizar a energia que foi originalmente designada para crescimento, em outros processos necessários para o controle e manutenção da homeostase celular sob concentrações tóxicas subletais de Cu^{2+} (Perales-Vela et al., 2007).

Os valores de IC_{50} encontrados neste estudo demonstram maior sensibilidade da alga ao cobre dissolvido, na forma de CuCl_2 , do que à nano-CuO. Estes resultados estão de acordo com os encontrados por Gunawan et al. (2011), em que a extensão da inibição do aumento de biomassa de *E. coli* induzido pelo sal de cobre ($\text{EC}_{90-6h} = 265 \text{ mg L}^{-1} \text{ Cu}$) foi muito maior que a

das nano-CuO ($EC_{90-6h} = 650 \text{ mg L}^{-1}$). Adam et al. (2015) encontraram um menor efeito tóxico das nanopartículas de óxido de cobre sobre *Daphnia magna* ($EC_{50} = 1,04 \text{ mg Cu L}^{-1}$) em comparação com o sal de cobre ($EC_{50} = 0,02 \text{ mg Cu L}^{-1}$). Segundo os autores, a combinação dos valores de dissolução (baixos para nano-CuO), alta captação das nanopartículas (incluindo ingestão) e a baixa toxicidade observada, indicam que os íons de cobre, dissolvidos a partir das nano-CuO no meio de exposição, foram a causa da toxicidade crônica observada na *D. magna*. Além disso, os autores encontraram que o sal de cobre dissolveu completamente no meio de cultivo do cladóceros, enquanto a dissolução das nano-CuO foi limitada, chegando a uma média de 3,9% de concentração dissolvida após 48 horas de exposição. Esse resultado está de acordo com o encontrado por Gomes et al. (2012), que demonstrou que a solubilidade (atividade do íon livre/concentração) das nano-CuO, medida com eletrodo de íon seletivo (ISE25CU), estava na faixa de 3-4% quando dissolvida em água desmineralizada. Comparando os efeitos de nanopartículas de óxidos de metais na alga *P. subcapitata*, Aruoja et al. (2009) afirmam que os resultados da toxicidade das micro e nanopartículas de CuO sobre o crescimento da alga foram devido à porção solubilizada biodisponível de cobre, provavelmente íons Cu^{2+} .

A maioria dos ligantes dissolvidos que se ligam aos metais formam complexos hidrofílicos e, nesses sistemas a captação do metal, nutrição e toxicidade normalmente variam em função da concentração de íon livre do metal em solução (Fortin e Campbell, 2000). O íon livre Cu^{2+} é uma das formas mais tóxicas desse metal, uma vez que é bastante reativo, tendo facilidade de entrar nas células por canais iônicos e apresentando tendência de captar elétrons de outros compostos ou íons, danificando o processo de transporte de elétrons na fotossíntese. Assim, de acordo com Rocha et al. (2016a), a toxicidade do metal está relacionada com os íons livres e não com a concentração total do metal. Isso explica, neste trabalho, a nano-CuO apresentar menor toxicidade sobre o crescimento da alga em comparação com a toxicidade do CuCl_2 : a dissociação dos íons Cu^{2+} a partir do composto de cobre dissolvido, na forma do sal, é mais intensa do que a dissociação de íons pelas nanopartículas.

Tanto o sal quanto a nanopartícula de cobre causaram danos por estresse oxidativo em *Enchytraeus albidus* (Annelida) (Gomes et al., 2012) e, de forma geral, os efeitos do sal de cobre foram mais pronunciados, principalmente em relação à peroxidação lipídica. Dentro das células, o metal pode afetar a organização estrutural da célula e o metabolismo (Rocha et al., 2016a), alterando a distribuição de compostos bioquímicos, tais como proteínas, lipídios, carboidratos e ácidos graxos em algas (Lim et al., 2006; Martínez-Ruiz e Martínez-Jerónimo, 2015). De forma geral, estes componentes de reserva permitem que a alga ajuste seu crescimento de acordo com as mudanças nas condições ambientais (Chia et al., 2015; Markou et al., 2012). No presente trabalho, concentrações mais elevadas de cobre resultaram em um aumento da produção de todos os componentes bioquímicos avaliados, em nível celular, com

exceção dos carboidratos nas algas tratadas com concentrações mais altas de CuCl_2 , em que não foi possível quantificar este componente devido à baixa densidade celular em resposta ao cobre. As respostas ao tratamento com o CuCl_2 foram mais intensas que as do tratamento com nano-CuO, uma vez que a internalização dos íons de cobre pelas células algais provavelmente foi maior no tratamento com o sal, devido à maior facilidade de íons serem liberados a partir desse composto em comparação com as nanopartículas.

O peso seco aumentou nas células algais dos tratamentos com os dois compostos. Nossos resultados indicam que o aumento do peso seco se deu, principalmente, devido à maior biossíntese de lipídios nas células algais tratadas com o CuCl_2 , e à maior produção de lipídios e carboidratos, ambos compostos de reserva e armazenamento de energia, nas células algais tratadas com as nano-CuO. O maior peso seco e o maior teor de lipídios totais encontrados em resposta ao aumento da concentração do cobre foram registrados no tratamento com o CuCl_2 , o que reforça a hipótese de que é o íon de cobre o principal responsável pelos efeitos encontrados na alga. Chia et al. (2015) também registraram um aumento gradativo do peso seco conforme aumentaram as concentrações de cádmio na alga *Chlorella vulgaris*.

A produção de carboidratos serve para duas propostas principais nas algas: atuar como componentes de reserva de energia dentro da célula ou como componente estrutural das paredes celulares (Markou et al., 2012). Além disso, essas macromoléculas são intermediários relevantes nos processos respiratórios e fotossintéticos das algas (Martínez-Ruiz e Martínez-Jerónimo, 2015). Lim et al. (2006) registraram uma redução na produção de carboidratos em todas as concentrações de óxido de cobre testadas em culturas de *Tetraselmis suecica* e *Dunaliella tertiolecta*. Os carboidratos foram as biomoléculas menos afetadas quando a clorofícea *Selenastrum gracile* foi exposta ao cloreto de cobre, enquanto proteínas e lipídios aumentaram (Rocha et al., 2016b). Testando combinações de diferentes concentrações de cádmio e nitrogênio, Chia et al. (2015) encontraram maiores níveis celulares de carboidratos, em relação ao controle, nas maiores concentrações do metal. O aumento na produção de carboidratos encontrados para *R. subcapitata* tratada com nano-CuO, no presente estudo, demonstra uma forma de adaptação ao estresse causado pelo cobre, aumentando a síntese dessas macromoléculas de armazenamento.

Os lipídios são componentes importantes das membranas plasmáticas. Este componente bioquímico é conhecido por sofrer grandes mudanças em seu metabolismo em condições de estresse, permitindo a organismos resistentes o ajuste adequado para sua sobrevivência (Guschina e Harwood, 2006; Lombardi e Wangersky, 1991; McLarnon-Riches et al., 1998). O estresse causado por metais altera muitos aspectos da bioquímica desse componente, incluindo alterações qualitativas e quantitativas nos lipídios, inibição dos

processos de biossíntese e estímulo da produção de determinadas classes (Chia et al., 2013; Guschina e Harwood, 2006). Segundo Hu et al., (2008) e Mock e Kroon (2002), o aumento da produção de lipídios nas células das algas pode auxiliar a manutenção da homeostase celular das reações de oxirredução, atuando como um dissipador de elétrons. Isso auxilia a microalga no combate a possíveis danos causados por espécies reativas de oxigênio produzidas sob estresse por metal nos ambientes aquáticos. No presente estudo, a produção de lipídios aumentou em resposta ao incremento nas concentrações de cobre. O CuCl_2 causou um efeito mais intenso nas algas, pois o teor de lipídios totais da concentração mais alta de cobre era aproximadamente o dobro do teor de lipídios das células tratadas com nano-CuO. Além disso, as concentrações testadas do sal são muito mais baixas que as da nanopartícula, reforçando a ideia de que a toxicidade do cobre se deve ao íon livre. O aumento da produção de lipídios em resposta ao estresse por metal também já foi registrado por outros autores (Chia et al., 2013, 2015).

Os lipídios são uma classe heterogênea de compostos, de forma que o estudo da variação das classes lipídicas em condições de estresse pode render mais informações do que apenas a quantificação dos lipídios totais (Lombardi e Wangersky, 1991). Depleção de nutrientes, por exemplo, tende a gerar um aumento na produção de lipídios neutros, principalmente TAG (Chia et al., 2013, 2015; Guschina e Harwood, 2006; Lombardi e Wangersky, 1991). Os TAGs são usados como moléculas de reserva, contendo predominantemente ácidos graxos saturados e insaturados. Fosfolipídios são geralmente poli-insaturados e utilizados como lipídios estruturais (McLarnon-Riches et al., 1998). A produção de fosfolipídios aumentou significativamente na alga *Chlorella vulgaris* tratada com combinações de diferentes concentrações de cádmio e fosfato, conforme resultados de Chia et al. (2013). Segundo os autores, a alga aumentou a síntese de ALC e reduziu a produção de AMPL, em relação ao controle, em resposta ao cádmio. Em nosso estudo foi registrado um aumento gradativo da classe dos PL tanto nas algas tratadas com nanopartículas quanto com o sal de cobre, conforme o aumento das concentrações de cobre. Os fosfolipídios responderam por aproximadamente 62% do total das classes lipídicas das células algais contaminadas com nano-CuO. McLarnon-Riches et al. (1998) também encontraram alterações significativas no perfil lipídico de *Selenastrum capricornutum*, mesmo em concentrações muito baixas de Cu^{2+} (como 1 e 12 μM Cu^{2+}).

Houve uma diferença entre os efeitos da nano-CuO e do CuCl_2 sobre a alteração das classes lipídicas no presente trabalho, sendo que as maiores mudanças ocorreram no tratamento com o sal. Nas algas tratadas com o sal, as classes mais afetadas pelo estresse causado pelo metal foram ST e ALC. Os esteróis são componentes da membrana plasmática das células, assim como os fosfolipídios. Acredita-se que os ST afetam funções da mitocôndria, plasticidade celular e permeabilidade da membrana plasmática (Parrish, 1988). Esse aumento

do PL e ST nas concentrações mais altas de cobre, no caso das algas tratadas com CuCl_2 no presente estudo, também foi reportado por Rocha et al. (2016b). Segundo os autores, o teor de PL passou de 36% do peso seco nas células algais do controle para 46% nas algas tratadas com a concentração mais alta de cobre, e o teor de ST aumentou de 7,5% do peso seco (nas células do controle) para 13% nas células algais da concentração mais alta do metal. Os autores sugerem que as mudanças nessas classes lipídicas podem indicar que a alga pode mudar a conformação da membrana, alterando sua fluidez ou espessura, na tentativa de amenizar o impacto da internalização do metal. Isso pode explicar a maior produção de lipídios estruturais nas células algais tratadas com o CuCl_2 neste trabalho.

As células algais tratadas com nano-CuO levaram a uma maior produção de hidrocarbonetos e de lipídios neutros na forma de TAG. Quando o crescimento da alga diminuiu (redução das divisões celulares) e não há mais requerimento para a síntese de novos componentes de membrana, as células desviam o processo de síntese de ácidos graxos em componentes estruturais para a deposição desses ácidos graxos em forma de TAG. Sob essas condições, a produção de TAG pode servir como mecanismo de proteção (Sharma et al., 2012). Como muitos trabalhos relataram o acúmulo de TAG pelas algas quando estas estão sob condições de estresse nutricional (Chia et al., 2013, 2015; Guschina e Harwood, 2006; Lombardi e Wangersky, 1991), pode-se inferir que as nanopartículas possam ter causado algum efeito de limitação de nutrientes para as células algais, pelo possível entupimento dos canais iônicos nas membranas devido à formação de grandes aglomerados nas concentrações mais altas de cobre no tratamento com as nanopartículas. O teor de TAG pode ser um melhor guia do estado fisiológico das células fitoplanctônicas que a razão Carbono(C): Nitrogênio(N):Fósforo(P) (Lombardi e Wangersky, 1991), e a proporção exata desta classe lipídica na célula provavelmente é regulada pela disponibilidade de nutriente no meio (Parrish, 1988), o que corrobora a nossa hipótese de que as nano-CuO possam ter causado algum efeito de estresse nutricional nas algas. Segundo Sharma et al. (2012), quando o crescimento celular das algas está debilitado devido à falta de nutrientes, o *pool* do maior acceptor de elétrons da fotossíntese, NADP^+ (do inglês *Nicotinamide adenine dinucleotide*, em seu estado oxidado), pode se esgotar, o que pode levar à uma situação perigosa para a célula, danificando componentes celulares. Sob condições de limitação de crescimento, o NADPH (em seu estado reduzido) é consumido na síntese de ácidos graxos, aumentando a produção desses lipídios (que por sua vez são armazenados em forma de TAG) e reabastecendo o *pool* de NADP^+ .

Alteração de perfil lipídico das algas, que foi encontrada neste trabalho, também foi reportada por outros autores que submeteram diferentes espécies algais ao estresse por metal (Bossuyt e Janssen, 2004; Chia et al., 2013, 2015). Essa resposta das algas ao estresse demonstra a sensibilidade desses microrganismos e o impacto que podem causar ao longo da cadeia trófica, devido à alteração de seus valores nutricionais e alteração na quantidade e

qualidade da energia transferida. Dentre os componentes bioquímicos avaliados no presente trabalho, os lipídios são os mais energéticos e foram os mais afetados pelo cobre. Enquanto a inibição do crescimento das algas tratadas com CuCl_2 só foi detectada na concentração de $0,17 \times 10^{-6} \text{ mol Cu L}^{-1}$, alterações no teor de carboidratos e mudanças nas classes lipídicas (nos triglicerídeos) foram identificadas na concentração mais baixa de sal testada ($0,07 \times 10^{-6} \text{ mol Cu L}^{-1}$). Nas algas tratadas com nano-CuO, houve estímulo de crescimento nas concentrações de $0,18$ e $1,32 \times 10^{-6} \text{ mol Cu L}^{-1}$, mas só foi detectada inibição do crescimento na concentração de $12,6 \times 10^{-6} \text{ mol Cu L}^{-1}$. Porém, os efeitos no nível das classes lipídicas foram detectados logo nas concentrações mais baixas testadas, como alteração na quantidade de FFA e ALC em $0,07 \times 10^{-6} \text{ mol Cu L}^{-1}$, e de ST na concentração de $0,18 \times 10^{-6} \text{ mol Cu L}^{-1}$. Nossos resultados indicam a importância de se realizar estudos ecotoxicológicos ao nível bioquímico das microalgas, pois os efeitos dos contaminantes avaliados apenas a nível de crescimento podem mascarar as concentrações reais em que esses compostos afetam a alga.

Outro resultado importante que encontramos é a diferença entre os efeitos causados pelo CuCl_2 e pela nano-CuO, principalmente em relação às classes lipídicas quantificadas, que não seriam percebidas se houvéssimos avaliado apenas os efeitos no crescimento da alga. Uma razão para diferença entre as classes lipídicas afetadas nas algas tratadas com nano-CuO, em relação às classes afetadas pelo sal de cobre, pode ser o entupimento dos canais iônicos nas células devido à formação de aglomerados grandes, de tal forma que esse entupimento possa ter dificultado a captura de nutrientes, causando estresse nutricional e levando à uma maior produção de lipídios neutros. O acúmulo de lipídios neutros, principalmente TAG, é típico em algas sob condições de limitação de nutrientes (Hu et al., 2008) e, como o cobre pode afetar a captura de nitrogênio pela alga (Mosulén et al. 2003), é possível que o aumento de lipídios no presente estudo seja resultado da combinação da presença de metal e da depleção de nutrientes. O acúmulo de lipídios estruturais nas células algais tratadas com CuCl_2 pode ser um mecanismo de defesa da alga contra os íons de cobre, dissociados em maior quantidade em se tratando de cobre dissolvido, na tentativa de mudar a conformação da membrana pra reduzir o impacto da internalização do metal na célula, como sugerido por Rocha et al. (2016b).

Segundo Miazek et al. (2015), um mecanismo de defesa das algas contra o estresse oxidativo causado por metais é a síntese de compostos antioxidantes (pigmentos, glutathione, ascorbato) ou enzimas (superóxido dismutase, catalase) que são responsáveis pelo decaimento das espécies reativas de oxigênio e pela redução dos íons metálicos em suas formas menos reativas. Uma vez que a dissociação de íons Cu^{2+} pelas nanopartículas de CuO é menor que a dissociação de íons pelo CuCl_2 , ou seja, uma maior quantidade de íons é liberado pelo sal de cobre do que pelas nanopartículas, pode ser que as algas no tratamento com as nano-CuO tenham conseguido reduzir mais íons de cobre em formas menos reativas,

em comparação com o total de Cu^{2+} liberado, contribuindo para a menor toxicidade desse composto de cobre sobre o crescimento das algas e menor impacto na alteração da produção de biomoléculas das células algais tratadas com essas nanopartículas.

A grande área superficial em relação ao volume oferece às células algais maior reatividade aos contaminantes, o que pode causar impactos na atividade fotossintética e na respiração das algas (Melegari et al., 2013). A exposição da alga aos íons metálicos em altas concentrações pode afetar a permeabilidade da parede celular e da membrana plasmática (Lim et al., 2006; Melegari et al., 2013), de forma que esta fique mais ou menos suscetível à entrada desses íons. Esse fato pode justificar a alta toxicidade do CuCl_2 em concentrações tão mais baixas do que aquelas que causaram toxicidade no tratamento com nano-CuO. Os autores do presente trabalho acreditam que, por se tratar de cobre dissolvido, na forma do sal, a liberação de íons livres é maior do que da nanopartícula, levando a uma maior toxicidade. Segundo Melegari et al. (2013) e Lim et al. (2006), essa alteração na permeabilidade da membrana plasmática e da parede celular também pode facilitar a internalização da nano-CuO, o que justificaria, neste trabalho, a maior porcentagem dos efeitos tóxicos terem sido encontrados apenas em concentração tão alta da nanopartícula, na qual a quantidade de íons livres liberados provavelmente foi maior. As mudanças no crescimento, na produção de lipídios e no peso seco observados neste estudo corroboram a hipótese de que a toxicidade do cobre nas nanopartículas se deve à liberação de íons cobre e concorda com os resultados encontrados em outros estudos comparando nano-CuO e cobre dissolvido (Adam et al., 2015; Gunawan et al. 2011; Siddiqui et al., 2015).

6.2. Efeitos de nanopartículas de óxido de cobre (CuO) e do cloreto de cobre (CuCl₂) sobre a atividade fotossintética da clorofícea *Raphidocelis subcapitata*

Um dos efeitos tóxicos mais estudados do cobre, em microrganismos, é o efeito no crescimento (Cid et al., 1995). O cobre pode interferir tanto na permeabilidade da membrana celular quanto na ligação de metais essenciais a ela. Uma vez transportado ao citoplasma, pode reagir com grupos sulfidril e tióis livres (como a glutatona), prejudicando sítios ativos de enzimas e a divisão celular (Stauber e Florence, 1987). No presente estudo, a exposição ao cobre levou a reduções nas taxas de crescimento das algas nos dois tratamentos com o metal (CuCl_2 e nano-CuO), sendo essas reduções mais severas nas concentrações mais altas de cobre. A maior inibição se deu nas concentrações mais altas de cada composto (87% menor em $2,29 \times 10^{-6} \text{ mol Cu L}^{-1}$ do tratamento com CuCl_2 e 95% menor em $12,6 \times 10^{-4} \text{ mol Cu L}^{-1}$, no

tratamento com nano-CuO) em relação à taxa de crescimento do controle. Cid et al. (1995) também encontraram menores taxas de crescimento para a microalga *Phaeodactylum tricornutum* contaminada com cobre. Segundo os autores, uma concentração de cobre de 0,10 mg L⁻¹ (0,74 x 10⁻⁶ mol Cu L⁻¹) do metal reduziu o crescimento em cerca de 50% e a concentração de 1 mg L⁻¹ (7,4 x 10⁻⁶ mol Cu L⁻¹) inibiu completamente o crescimento da alga. Esses resultados divergem daqueles encontrados por Lombardi e Maldonado (2011), que reportaram uma redução de 53% e 40% na taxa de crescimento da microalga *Phaeocystis cordata* contaminada com 7,9 x 10⁻¹¹ mol L⁻¹ e 3,1 x 10⁻¹⁰ mol L⁻¹ de cobre, respectivamente, que são concentrações de cobre equivalentes às mais baixas testadas no presente estudo, tanto para CuCl₂ quanto para nano-CuO, nas quais houve estímulo de crescimento. Em plantas e algas, o efeito do cobre no crescimento tem sido atribuído à uma falha massiva de muitos processos celulares. Sabe-se, por exemplo, que os íons de cobre Cu²⁺ apresentam efeitos tóxicos sobre a morfologia dos cromossomos e ciclo mitótico desses organismos (Perales-Vela et al., 2007).

Quando expostos à luz, os organismos fotossinteticamente ativos emitem fluorescência, que se origina principalmente das moléculas de clorofila *a* do PSII (Mallick e Mohn, 2003). Neste estudo, houve redução da produção de clorofila *a* conforme o aumento das concentrações de cobre entre 48 e 72 horas nos dois tratamentos. Mas ao final das 96 horas de exposição, o teor de clorofila *a* não foi significativamente diferente do controle, mesmo nas concentrações mais altas de cobre de cada composto. Nossos resultados divergem daqueles reportados por Thomas et al. (2009), que encontraram maiores teores de clorofila conforme aumentaram as concentrações de cobre na água da macrófita *Ceratophyllum demersum*, o que pode indicar que as algas foram capazes de recuperar a produção desse pigmento mesmo em concentrações tão altas de cobre. Cid et al. (1995) encontraram menor teor de clorofila *a* na microalga marinha *P. tricornutum* em concentrações de cobre maiores que 0,1 mg L⁻¹ (0,74 x 10⁻⁶ mol Cu L⁻¹), o que só ocorreu, no presente estudo, entre 24 e 72 horas de exposição ao cobre. Nossos resultados foram diferentes dos apresentados na literatura, o que pode ser atribuído ao fato de que as algas podem alterar a produção de biomoléculas, tais como proteínas, carboidratos e lipídios, de forma a tentar garantir a homeostase celular e evitar danos ao longo do processo fotossintético. Sendo assim, pode-se inferir que as algas foram capazes de ajustar suas rotas metabólicas, mesmo em concentrações altas de cobre, de forma que puderam recuperar a produção de clorofila após 96 horas de exposição ao metal. Considerando os resultados encontrados para a taxa de crescimento algal, pode-se inferir que o crescimento da alga foi mais sensível que o conteúdo de pigmento fotossintético, como também foi reportado em outros estudos (Perales-Vela et al., 2007), uma vez que foram detectadas grandes alterações na taxa de crescimento da alga nos dois tratamentos, mas pouca alteração no teor de clorofila *a*.

A emissão de fluorescência máxima de amostras *in vivo* é cerca de 3% e a mínima é cerca de 0,6% da luz absorvida. A fotossíntese e a emissão de fluorescência são processos competitivos e opostos. Se algas adaptadas ao escuro são iluminadas, a emissão de fluorescência aumenta por um período curto de tempo até um valor máximo, e decai com o início da atividade de transporte de elétrons (Efeito Kautsky) (Cosgrove e Borowitzka, 2010; Mallick e Mohn, 2003). Estresses ambientais que causam alterações estruturais nos pigmentos fotossintéticos alteram o valor de F_0 . Segundo Krause e Weis (1991), F_0 representa a emissão de fluorescência da clorofila *a* produzida pela excitação do complexo coletor de luz antes da transferência de energia para o centro de reação do PSII e, de acordo com Herlory et al. (2013), F_m representa a fluorescência máxima medida quando todos os aceptores primários de elétrons do PSII (Q_A) foram reduzidos pelo flash luminoso. Os valores de F_0 e F_m aumentaram ao longo do tempo no controle e nas concentrações mais baixas de cobre dos dois tratamentos, indicando boa condição fisiológica da alga. No entanto, tanto as algas expostas ao $CuCl_2$ quanto as expostas à nano-CuO apresentaram redução dos valores de F_0 e F_m conforme o aumento das concentrações de cobre e tempo de exposição ao metal.

Uma vez que F_0 se origina da clorofila *a* associada ao complexo coletor de luz do PSII, nossos resultados apontam que a eficiência da energia transferida deste complexo ao centro de reação do PSII é severamente alterada quando a alga está sob estresse por cobre, corroborando os resultados encontrados por Mallick e Mohn (2003). A redução de F_m nos dois tratamentos, no presente trabalho, indicam inibição da atividade de transporte de elétrons do PSII, o que também foi reportado por Juneau et al. (2002). Os autores encontraram uma redução de cerca de 30-40% nos valores de F_m das algas *Chlamydomonas reinhardtii* e *Selenastrum capricornutum* após 5 horas de exposição a uma concentração de cobre de $10 \mu g L^{-1}$ ($0,06 \times 10^{-6} mol Cu L^{-1}$). Resultados semelhantes também foram encontrados por Herlory et al. (2013), avaliando o efeito do urânio sobre a alga *Chlamydomonas reinhardtii*. Segundo os autores, para as concentrações mais altas de urânio testadas (1×10^3 , 5×10^3 e $1 \times 10^4 \mu g L^{-1}$), F_m foi severamente alterado, mostrando uma redução de 75%, enquanto F_0 reduziu 25% em relação aos valores desses mesmos parâmetros medidos no controle. Inibições dos sinais de fluorescência, representados por F_0 e F_m , implicam em deficiência do ϕ_M da alga, o que foi comprovado pelos baixos valores encontrados para este parâmetro, no presente estudo, nas concentrações que apresentaram F_0 e F_m reduzidos nos tratamentos com os dois compostos de cobre.

Segundo Mallick e Mohn (2003), o rendimento quântico máximo do PSII (ϕ_M) tem sido utilizado como indicador de estresse e seu valor pode cair se a re-oxidação da Q_A for limitada pela redução ou por bloqueio parcial do transporte de elétrons do PSII ao PSI, por qualquer fator de estresse. Na presente pesquisa, os melhores valores de ϕ_M foram encontrados para as algas do controle dos dois tratamentos (0,67 a 0,68) entre 48 e 72 horas, indicando que neste

intervalo de tempo as algas estavam fisiologicamente melhores do que em 24 e em 96 horas, quando os ϕ_M do controle ficaram em torno de 0,65 a 0,66. Entre 48 e 72 horas, a alga está no auge do crescimento exponencial, apresentando seu melhor rendimento fotossintético. Em 96 horas, a densidade algal elevada e a matéria orgânica excretada pelas células, que vai se acumulando no meio de cultivo ao longo do tempo, contribuem para um menor rendimento fotossintético da alga e, conseqüentemente, um valor um pouco mais baixo de ϕ_M em comparação com o período de crescimento exponencial.

A partir das concentrações de $0,67 \times 10^{-6}$ e $12,6 \times 10^{-6}$ mol Cu L⁻¹ de CuCl₂ e nano-CuO, respectivamente, as algas apresentaram menores ϕ_M quanto maiores as concentrações e o tempo de exposição ao metal, o que indica que o cobre afetou significativamente o rendimento quântico máximo do PSII da alga, tanto na forma de cobre dissolvido quanto na forma de nanopartículas. Considerando-se que os valores de ϕ_M encontrados para cada concentração de CuCl₂ foram semelhantes aos encontrados para as concentrações de nano-CuO, e levando-se em conta que as concentrações do sal de cobre testadas foram muito mais baixas que as da nanopartícula, pode-se inferir que o cobre dissolvido, na forma do sal, gerou efeitos mais acentuados no ϕ_M da alga do que as nano-CuO. Essa redução do ϕ_M dependente do tempo de exposição e da concentração do metal também foi reportada em outros trabalhos (Corcoll et al., 2011; Herlory et al., 2013; Mallick e Mohn, 2003) e indica que a estrutura do PSII foi danificada por esses metais. Assim como no presente estudo, Lombardi e Maldonado (2011) também encontraram valores de ϕ_M para a alga *P. cordata* semelhantes aos do controle, nas concentrações mais baixas de cobre, enquanto que nas concentrações mais altas o ϕ_M reduziu em relação ao controle. O rendimento quântico máximo é um parâmetro extremamente sensível a alterações do CCL do PSII dos tilacóides (Corcoll et al., 2011).

A eficiência do complexo de evolução do oxigênio (CEO) do PSII (F_o/F_v) reflete o estado do processo de foto-oxidação da água (Herlory et al., 2013). Nossos resultados demonstram que o parâmetro F_o/F_v foi o mais sensível ao cobre, com aumentos maiores que 300%, em relação ao F_o/F_v do controle, nas concentrações mais altas de CuCl₂ ($2,29 \times 10^{-6}$ mol Cu L⁻¹) e de nano-CuO ($12,6 \times 10^{-4}$ mol Cu L⁻¹) a partir de 72 horas de exposição, chegando a um valor mais de 6 vezes maior que o do controle (0,55) na concentração mais alta de nano-CuO (3,36). Esses resultados indicam que a eficiência do CEO do PSII ficou debilitada conforme o aumento das concentrações de cobre. O aumento de F_o/F_v nas concentrações maiores que $0,67 \times 10^{-6}$ mol Cu L⁻¹ do tratamento com o sal de cobre e maiores que $12,6 \times 10^{-6}$ mol Cu L⁻¹, do tratamento com nano-CuO, revelaram uma severa alteração no estado de foto-oxidação da água, o que é reforçado pela redução dos valores de F_m nas concentrações mais altas de cobre. A F_m reduziu cerca de 70% em $2,29 \times 10^{-6}$ mol Cu L⁻¹ (tratamento com CuCl₂) e em $12,6 \times 10^{-4}$ mol Cu L⁻¹ (tratamento com nano-CuO), em relação a F_m do controle. A F_v foi apenas 13% e 10% da F_v do controle para essas mesmas concentrações de cobre, respectivamente.

Segundo Herlory et al. (2013), o parâmetro F_o/F_v também evidenciou que o complexo de evolução do oxigênio foi o principal sítio de ação do urânio na microalga *C. reinhardtii*. O urânio levou a uma alteração no estado de foto-oxidação da água, o que aumentou os valores de F_o/F_v nas maiores concentrações do metal, assim como no presente trabalho. Nossos resultados também corroboram os encontrados por Mallick e Mohn (2003), ao expor a alga *Scenedesmus obliquus* a diferentes metais. Os autores relataram grandes aumentos em F_o/F_v para as concentrações mais altas de Cu, Cr e Cd, mesmo após exposição imediata a cada metal, e sugerem que esses metais têm grande impacto na eficiência do CEO quando comparados com outros, possivelmente pela substituição de manganês (Mn) dentro do sistema de separação da água. Já foi demonstrado que o cobre pode afetar a fotoquímica do PSII no lado oxidante do fotossistema através de uma interação com o doador de elétrons primário, o resíduo de Tirosina (Tyr_z) (Juneau et al., 2002). É através do Tyr_z que os elétrons provenientes da oxidação da água, no complexo de evolução do oxigênio, são transferidos para o centro de reação do PSII.

O rendimento quântico máximo do controle dos dois tratamentos, após 96 horas, indica que mais de 65% da luz absorvida pela microalga foi usada para fotossíntese, o que sugere que a microalga foi mantida em bom estado fisiológico ao longo do experimento, sem indução de estresse por limitação de nutrientes (Herlory et al., 2013). Os resultados de Φ_M da alga, após 96 horas de exposição ao cobre, revelaram que quanto mais alta a concentração de cobre, tanto menor a porcentagem da luz absorvida pela microalga que pôde ser usada na fotossíntese. Para a concentração mais alta de $CuCl_2$ ($2,29 \times 10^{-6}$ mol $Cu L^{-1}$), menos de 40% da luz absorvida pôde ser usada para este fim, e para a maior concentração de nano-CuO ($12,6 \times 10^{-4}$ mol $Cu L^{-1}$) esta porcentagem foi ainda menor (25%). Herlory et al. (2013) encontrou resultados semelhantes aos do presente trabalho, contaminando *C. reinhardtii* com urânio. Segundo os autores, o metal afetou a Φ_M da microalga de forma que menos de 20% da luz absorvida pôde ser usada pela alga na fotossíntese. Segundo Baumann et al. (2009), alguns metais, como Hg^{2+} , Cd^{2+} , Zn^{2+} , Ni^{2+} e o Cu^{2+} , são conhecidos por substituir o átomo de Mg^{2+} central na molécula da clorofila, o que provoca uma redução no rendimento quântico da fluorescência e resulta em alteração do espectro de fluorescência. Essa substituição do Mg^{2+} por um íon metálico leva à formação de moléculas de clorofila com metal incorporado nelas, que são impróprias para a fotossíntese devido à sua menor estabilidade quando excitada e menor tendência de se prender a ligantes axiais. Além disso, a energia do estado excitado dessas moléculas de clorofila alteradas pode se acidentalmente transferida a moléculas de oxigênio, resultando na produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), que causam dano oxidativo (Thomas et al., 2013).

O Φ_M' expressa a proporção de luz absorvida pela clorofila associada ao PSII que é usada em fotoquímica (Herlory et al., 2013). O rendimento quântico efetivo (Φ_M'), parâmetro

que está relacionado com o fluxo de elétrons através do PSII, reduziu nas concentrações mais altas dos dois compostos de cobre. Este parâmetro representa o rendimento efetivo fotoquímico do PSII quando o transporte de elétrons se encontra em estado estável e está relacionado com a eficiência do PSII quando o transporte de elétrons entre PSII e PSI está em estado de equilíbrio (Genty et al., 1989). Após 96 horas de exposição ao metal, o Φ_M' na concentração mais alta de CuCl_2 reduziu cerca de 46% e na mais alta de nano-CuO foi cerca de 60% menor que o Φ_M' encontrado para o controle de cada tratamento, indicando uma inibição no fluxo de transporte de elétrons durante a atividade fotossintética que ocorre na presença de luz. Esses resultados estão de acordo com os encontrados por Corcoll et al. (2011), que reportaram uma redução de 23% do Φ_M' em biofilmes fluviais contaminados com zinco. Thomas et al. (2013) também encontraram uma redução do Φ_M' nas concentrações mais altas de cobre, quando expuseram a macrófita *C. demersum* a concentrações ambientalmente relevantes de cobre. Esse efeito de redução do Φ_M' por metais pode ser atribuído à substituição do magnésio, o átomo central da clorofila, por metais pesados, levando a um colapso da fotossíntese. Uma vez que o cobre afeta o aparato fotossintético tanto no lado oxidante quanto no lado redutor do PSII, as mudanças no Φ_M' indicam o efeito do cobre em toda a cadeia de transporte de elétrons fotossintética (Juneau et al., 2002).

Os coeficientes de dissipação fotoquímica (qP) e não fotoquímica (qN) permitem avaliar quanto da energia aprisionada pelos centros de reação do PSII pode ser utilizada para transporte de elétrons ou dissipada por processos não-fotoquímicos (Herlory et al., 2013). Quando todos os centros de reação estão abertos $qP = 1$ e quando todos estão fechados $qP = 0$ (Schreiber et al., 1986). O centro de reação é considerado “aberto” quando Q_A está oxidada e capaz de aceitar um elétron a partir do centro de reação via feofitina. Em outras palavras, o qP representa o estado de redução/oxidação da Q_A , de forma que o estado de oxidação/redução do *pool* de plastoquinona pode influenciar qP (Cosgrove e Borowitzka, 2010). O ótimo uso da energia fotoquímica no metabolismo do carbono é caracterizado por altos valores de qP (Lombardi e Maldonado, 2011). Os resultados de qP, no presente estudo, não apresentaram diferença entre o controle e as concentrações de cobre nos dois tratamentos. Os altos valores de qP encontrados para todas as concentrações de cobre indicam que a alga tinha capacidade de investir em fotoquímica, mas não foi o que ocorreu, como se nota pela redução dos rendimentos fotossintéticos que foi observada nos dois tratamentos. Nossos resultados não estão de acordo com os encontrados por Herlory et al. (2013), que encontraram que a exposição da microalga *C. reinhardtii* a $10^3 \mu\text{g L}^{-1}$ de urânio resultou em uma redução de 25% do qP.

O coeficiente de dissipação não-fotoquímica (qN) é uma medida da fração da fluorescência variável máxima de amostras adaptadas ao escuro que é dissipada na luz. NPQ é uma medida da dissipação não fotoquímica total e descreve a capacidade fotoprotetora de

dissipar, como calor, o excesso de energia absorvida, pela média de diversos processos de dissipação não fotoquímica. Acredita-se que o sítio primário para o desenvolvimento de processos de dissipação não fotoquímica seja o complexo coletor de luz e este é altamente independente do estado de oxidação/redução da Q_A . (Cosgrove e Borowitzka, 2010). Não houve muita variação nos valores de qN para as algas tratadas com os dois compostos de cobre, no presente trabalho, mas o valor de NPQ reduziu gradativamente nas três concentrações mais altas de nano-CuO ($12,6 \times 10^{-5}$; $6,28 \times 10^{-4}$ e $12,6 \times 10^{-4}$ mol Cu L⁻¹) após 96 de exposição ao metal. Essa constância nos valores de qN , para os dois tratamentos, e redução nos valores de NPQ, no tratamento com nano-CuO, sugerem que os mecanismos de fotoproteção da alga podem ter sido danificados. Esses resultados estão em concordância com os encontrados por Lombardi e Maldonado (2011), que também reportaram menores valores de NPQ nas concentrações mais altas de cobre (5×10^{-11} e $7,9 \times 10^{-11}$ mol Cu L⁻¹), quando contaminaram o meio de cultivo da alga *P. cordata* com o metal, e com os de Juneau et al. (2002), que encontraram valores de qN iguais a zero em *C. reinhardtii*, *S. capricornutum* e *C. vulgaris* expostas a 25 µg L⁻¹ de cobre por 96 horas.

A redução de parâmetros de fluorescência, como a F_m e F_0 , e diminuição dos rendimentos quânticos máximo e efetivo na presença de metal já foram reportadas em vários estudos (Corcoll et al., 2011; Herlory et al., 2013; Thomas et al., 2009), indicando o impacto desses contaminantes no aparato fotossintético de organismos fotossintetizantes e a utilidade desses parâmetros como indicadores de toxicidade. De acordo com Cid et al. (1995), a inibição do fluxo de elétrons no lado doador do centro de reação do PSII provoca uma redução na fluorescência da clorofila *a*, enquanto uma inibição produzida no lado aceptor do centro de reação do PSII, leva a um aumento da fluorescência. Em concordância com esses mesmos autores, os resultados dos parâmetros de fluorescência da chl-*a* encontrados no presente estudo indicam que o efeito inibitório do cobre na atividade do PSII está localizado no lado oxidante do seu centro de reação, provavelmente devido à inativação de alguns desses centros de reação pelo cobre. Os resultados encontrados para os parâmetros de fluorescência e rendimento quântico, de maneira geral, indicam alterações mais acentuadas nas algas expostas a nano-CuO, o que pode sugerir um modo de ação diferente do cobre em forma de nanopartículas em comparação com o cobre dissolvido em forma de sal. Possivelmente, além da liberação de íons pelas nanopartículas, as próprias partículas podem ter danificado o aparato fotossintético das algas através do entupimento de canais iônicos celulares, devido à tendência de formação de agregados quando em meio aquoso.

A redução do Φ_M' do PSII sugere a ativação de processos não-fotoquímicos pela alga (Herlory et al., 2013). Mas isso não ocorreu para *R. subcapitata* neste trabalho, apesar da redução gradativa do Φ_M' conforme se aumentou as concentrações dos dois compostos de cobre. Uma vez que houve alteração em Φ_M e Φ_M' , e levando-se em conta que os valores de

qN permaneceram praticamente inalterados mesmo em concentrações tóxicas de cobre, o que também foi reportado por Thomas et al. (2009), pode-se concluir que a fotoquímica, mediada pelo PSII, é mais vulnerável à toxicidade do cobre do que a regulação da dissipação não fotoquímica do excesso de energia. Já o aumento no F_0/F_v quanto maiores eram as concentrações do metal sugerem que o cobre tem um grande impacto no processo de foto-oxidação da água, como também foi reportado por Mallick e Mohn (2003) para o Cu, Cr, Cd, Ni e Zn, e por Herlory et al. (2010) para urânio. Como qP é indicador apenas dos centros de reação ativos do PSII, ele é menos representativo que Φ_M' , qN (Peña-Vásquez et al., 2010) e F_0/F_v , uma vez que esses parâmetros integram todos os efeitos do cobre no transporte de elétrons fotossintético e seus processos relacionados (Juneau et al., 2002). Nenhum dos parâmetros de fluorescência avaliados chegou a zero, o que demonstra que o transporte de elétrons dependente do PSII não foi completamente inibido mesmo em concentrações tão altas quanto $12,6 \times 10^{-4} \text{ mol Cu L}^{-1}$.

7. CONCLUSÕES

Os resultados deste trabalho podem contribuir para o melhor entendimento dos riscos potenciais da contaminação dos ambientes aquáticos com nano-CuO. Grande parte das concentrações testadas, principalmente do CuCl_2 , possivelmente podem ser encontradas em ambientes contaminados com cobre. A alga *R. subcapitata* respondeu à presença de cobre no meio de cultivo, o que foi demonstrado pelos efeitos de inibição em seu crescimento e alteração em sua composição bioquímica. O estresse causado pelo metal aumentou a síntese de carboidratos e lipídios totais, o que levou a um aumento do peso seco da alga. As classes lipídicas também alteraram em resposta ao cobre, principalmente as classes ST e ALC no tratamento com o sal, e HC e TAG nas algas tratadas com nano-CuO. Os fosfolipídios representaram a maior porcentagem dos lipídios totais encontrados nas células contaminadas com as concentrações mais altas do cobre nos dois tratamentos. A resposta da alga ao cloreto foi mais intensa para todos os componentes avaliados, o que indica maior toxicidade do CuCl_2 em relação à nanopartícula de CuO, sugerindo que o efeito iônico do cobre na microalga é maior que possíveis efeitos da nanopartícula em si.

O cobre afetou a F_0 e F_m das algas nos dois tratamentos, que refletiu na redução de ϕ_M e ϕ_M' . Os sítios de ação dos dois compostos de cobre foram os mesmos, uma vez que ambos afetaram os mesmos parâmetros de fluorescência. De forma geral, as alterações de fluorescência e rendimento quântico foram mais severas nas algas expostas a nano-CuO, o que sugere um modo de ação diferente do cobre em forma de nanopartículas em comparação com o cobre dissolvido em forma de sal. Como evidenciado pelo F_0/F_v , o complexo de evolução do oxigênio (CEO) do PSII II foi o parâmetro mais sensível ao CuCl_2 e a nano-CuO, tendo sido identificado como principal sítio de ação do cobre, através da alteração do processo de foto-oxidação da água, tanto para o CuCl_2 quanto para nano-CuO. Em comparação com ϕ_M , ϕ_M' , qN e qP , o F_0/F_v foi um melhor indicativo das mudanças do estado fisiológico da alga, emergindo como um bom parâmetro para avaliar o impacto de estresse causado por cobre na fisiologia da alga.

Este estudo é de grande importância do ponto de vista ecotoxicológico, pois servirá de base para aos legisladores ambientais que atuam na avaliação e regulação das concentrações máximas de nanopartículas de óxido de cobre em ambientes aquáticos. No nosso conhecimento, não existem trabalhos na literatura que abordem de forma tão aprofundada aspectos fisiológicos da bioquímica e fotossíntese de microalgas expostas a nanomateriais. Nosso estudo também poderá ajudar outros trabalhos que utilizam microalgas como modelo para avaliação da toxicidade de nanomateriais em ambientes aquáticos.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AFNOR, Association Française Normalisation, 1980. Norme expérimentale. T90-304. Essais de seuils de détermination de l'inhibition de *Scenedesmus subspicatus* par une substance, Paris, France.
- Adam, N., Vakurov, A., Knapen, D., Blust, R., 2015. The chronic toxicity of CuO nanoparticles and copper salt to *Daphnia magna*. *Journal of Hazardous Materials* 283, 416-422.
- Aggarwal, A., Sharma, I., Tripathi, B. N., Munjal, A. K., Baunthiyal, M., Sharma, V., 2012. Metal toxicity and photosynthesis, in *Photosynthesis: Overview on Recent Progress and Future Perspectives*, eds S. Itoh, P. Mohanty, and K. N. Guruprasad (New Delhi: IK International Publishing House (Pvt) Limited).
- Amorim, M. J. B., Scott-Fordsmand., 2012. Toxicity of copper nanoparticles and CuCl₂ salt to *Enchytraeus albidus* worms: survival, reproduction and avoidance responses. *Environmental Pollution*, 164, 164-168.
- Aruoja, V., Dubourguier, H-C, Kasamets, K., Kahru, A., 2009. Toxicity of nanoparticles of CuO, ZnO and TiO₂ to microalgae *Pseudokirchneriella subcapitata*. *Science of the Total Environment*, 407, 1461-1468.
- Baumann, H. A., Morrison, L., Stengel, D. B., 2009. Metal accumulation and toxicity measured by PAM – Chlorophyll fluorescence in seven species of marine macroalgae. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 72, 1063-1075.
- Bicudo, C. E. M.; Bicudo, R. M. T., 1970. *Algas de águas continentais Brasileiras*. Fundação Brasileira para Desenvolvimento de Ensino de Ciências (FUNBEC), Editora Universidade de São Paulo, São Paulo, 228p.
- Bilger, W., Björkman, O., 1990. Role of the xanthophyll cycle in photoprotection elucidated by measurements of light-induced absorbance changes, fluorescence and photosynthesis in leaves of *Hedera canariensis*. *Photosynthesis Research*, 25, 173-185.
- Binnig, G., Quate, C., Gerber, C., 1986. Atomic Force Microscope. *Physical Review Letters*, 56, 930-933.
- Bondarenko, O., Juganson, K., Ivask, A., Kasemets, K., Mortimer, M., Kahru, A., 2013. Toxicity of Ag, CuO and ZnO nanoparticles to selected environmentally relevant test organisms and mammalian cells in vitro: a critical review. *Archives of Toxicology*, 87, 1181-1200.
- Bossuyt, B. T. A., Janssen, C. R., 2004. Long-term acclimation of *Pseudokirchneriella subcapitata* (Korshikov) Hindak to different copper concentrations: changes in tolerance and physiology. *Aquatic Toxicology*, 68, 61-74.

- Campos, V. B.; Barbarino, E.; Lourenço, S. O., 2010. Crescimento e composição química de dez espécies de microalgas marinhas em cultivos estanques. *Ciência Rural*, 40 (2), 339-347.
- Cid, A., Herrero, C., Torres, E., Abalde, J., 1995. Copper toxicity on the marine microalga *Phaeodactylum tricornutum*: effects on photosynthesis and related parameters. *Aquatic Toxicology*, 31, 165-174.
- Chang, Y.N., Zhang, M., Xia, L., Zhang, J., Xing, G., 2012. The toxic effects and mechanisms of CuO and ZnO nanoparticles. *Materials* 5, 2850-2871.
- Chia, M. A., Lombardi, A. T., Melão, M. G. G., Parrish, C. C., 2013. Lipid composition of *Chlorella vulgaris* (Trebouxiophyceae) as a function of diferente cádmium and phosphate concentrations. *Aquatic Toxicology*, 128-129, 171-182.
- Chia, M. A., Lombardi, A. T., Melão, M. G. G., Parrish, C. C., 2015. Combined nitrogen limitation and cádmium stress stimulate total carbohydrates, lipids, protein and amino acid accumulation in *Chlorella vulgaris* (trebouxiophyceae). *Aquatic Toxicology*, 160, 87-95.
- Corcoll, N., Bonet, B., Leira, M., Guasch, H., 2011. Chl-a fluorescence parameters as biomarkers of metal toxicity in fluvial biofilms: an experimental study. *Hydrobiologia*, 673, 119-136.
- Cosgrove J., Borowitzka M. A., 2010. Chlorophyll fluorescence terminology: an introduction. In Suggett D. J., Prášil O., Borowitzka M. A. (eds), *Chlorophyll a Fluorescence in Aquatic Sciences: Methods and Applications*, *Developments in Applied Phycology*. Vol. IV. Springer, New York, 1–17.
- Echols, B.S., Currie, R.J., Cherry, D.S., 2010. Preliminary results of laboratory toxicity tests with the mayfly, *Isonychia bicolor* (Ephemeroptera: Isonychiidae) for development as a standard test organism for evaluating streams in the Appalachian coalfields of Virginia and West Virginia. 169, 487-500.
- Fortin, C., Campbell, P. G. C., 2000. Silver uptake by the green algae *Chlamydomonas reinhardtii* in relation to chemical speciation: influence of chloride. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 19, 2769-2778.
- Franklin, N. M., Rogers, N. J., Apte, S. C., Batley, G. E., Gadd, G. E., Casey, P. S., 2007. Comparative toxicity of nanoparticulate ZnO, Bulk ZnO, and ZnCl₂ to a freshwater microalga (*Pseudokirchneriella subcapitata*): The importance of particle solubility. *Environmental Science and Technology*, 41, 8484-8490.

- Franklin, N. M., Stauber, J. L., Lim, R. P., 2001. Development of flow cytometry-based algal bioassays for assessing toxicity of copper in natural waters. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 20 (1), 160-170.
- Genty, B., Briantais, J-M., Baker, N. R., 1989. The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – General Subjects*, v. 990, n.1, 87-92.
- Gomes, S. I. L., Novais, S. C., Gravato, C., Guilhermino, L., Scott-Fordsmand, J. J., Soares, A. M. V. M., Amorim, M. J. B. M., 2012. Effect of Cu-nanoparticles versus one Cu-salt: Analysis of stress biomarkers response in *Enchytraeus albidus* (Oligochaeta). *Nanotoxicology*, 6(2), 134-143.
- Gunawan, C., Teoh, W. Y., Marquis, C. P., Amal, R., 2011. Cytotoxic origin of copper (II) oxide nanoparticles: comparative studies with micron-sized particles, leachate, and metal salts. *ACS Nano*, 5 (9), 7214-7225.
- Guschina, I. A., Harwood, J. L., 2006. Lead and copper effects on lipid metabolism in cultured lichen photobionts with different phosphorus status. *Phytochemistry*, 67, 1731-1739.
- Herlory, O., Bonzom, J-M., Gilbin, R., 2013. Sensitivity evaluation of the green alga *Chlamydomonas reinhardtii* to uranium by pulse amplitude modulated (PAM) fluorometry. *Aquatic Toxicology*, 140-141, 288-294.
- Hoháček, K., 2002. Chlorophyll fluorescence parameters: the definitions, photosynthetic meaning and mutual relationships. *Photosynthetica*, v. 40, n.1, 12-29.
- Hu, Q., Sommerfeld, M., Jarvis, E., Ghirardi, M., Posewitz, M., Seibert, M., Darzins, A., 2008. Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production: perspectives and advances. *Plant Journal*, 54, 621–639.
- Juneau, P., El Berdey, A., Popovic, R., 2002. PAM Fluorometry in the determination of the sensitivity of *Chlorella vulgaris*, *Selenastrum capricornutum*, and *Chlamydomonas reinhardtii* to copper. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 42, 155-164.
- Krause, G. H., Weis, E., 1991. Chlorophyll fluorescence and photosynthesis: the basics. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, v. 42, n. 1, 313-349.
- Kriedemann, P. F., Graham, R. D., Wiskich, J. T., 1985. Photosynthetic dysfunction and *in vivo* chlorophyll a fluorescence from manganese-deficient wheat leaves. *Aust. J. Agric. Res.*, 36, 157-169.

- Lim, C. Y., Yoo, Y. H., Sidharthan, M., Ma, C. W., Bang, I. C., Kim, J. M., Lee, K. S., Park, N. S., Shin, H. W., 2006. Effects of copper (I) oxide on growth and biochemical compositions of two marine microalgae. *Journal of Environmental Biology*, 27 (3), 461-466.
- Liu, D; Wong, P.T.S; Dutka, B.J., 1973. Determination of carbohydrate in lake sediment by a modified phenol-sulfuric method. *Water Research*, 7, 741-746.
- Lombardi, A. T., Hidalgo, T. M. R., Vieira, A. A. H., Sartorim A. L. 2007. Toxicity of ionic copper to the freshwater microalga *Scenedesmus acuminatus* (Chlorophyceae, Chlorococcales). *Phycologia*, 46 (1), 74-78.
- Lombardi, A. T., Maldonado, M. T., 2011. The effects of copper on the photosynthetic response of *Phaeocystis cordata*. *Photosynth. Res.*, 108, 77-87.
- Lombardi, A. T., Wangersky, P. J., 1991. Influence of phosphorus and silicon on lipid class production by the marine diatom *Chaetoceros gracilis* grown in turbidostat cage cultures. *Marine Ecology Progress Series*, 77, 39-47.
- Mahmoudi, M., Lynch, I., Ejtehadi, M. R., Monopoli, M. P., Bombelli, F. B., Laurent, S., 2011. Protein-nanoparticle interactions: opportunities and challenges. *Chemical Reviews* 111, 5610-5637.
- Mallick, N., Mohn, F. H., 2003. Use of chlorophyll fluorescence in metal-stress research: a case study with the green microalga *Scenedesmus*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 55, 64-69.
- Markou, G., Angelidaki, I., Georgakakis, D., 2012. Microalgal carbohydrates: an overview of the factors influencing carbohydrates production, and of main bioconversion technologies for production of biofuels. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 96, 631-645.
- Martínez-Ruiz, E. B., Martínez-Jerónimo, F., 2015. Nickel has biochemical, physiological, and structural effects on the green microalga *Ankistrodesmus falcatus*: An integrative study. *Aquatic Toxicology*, 169, 27-36.
- McLarnon-Riches, C. J., Rolph, C. E., Greenway, D. L. A., Robinson, P. K., 1998. Effects of environmental factors and metals on *Selenastrum capricornutum* lipids. *Phytochemistry*, 49 (5), 1241-1247.
- Melegari, S. P., Perreault, F., Costa, R. H. R., Popovic, R., Matias, W. G., 2013. Evaluation of toxicity and oxidative stress induced by copper oxide nanoparticles in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Aquatic Toxicology* 142-143, 431-440.

- Miazek, K., Iwanek, W., Remacle, C., Richel, A., Goffin, D., 2015. Effect of metals, metalloids and metallic nanoparticles on microalgae and industrial product biosynthesis: a review. *International Journal of Molecular Sciences*, 16, 23929-23969.
- Miao, X. e Wu, Q., 2006. Biodiesel production from heterotrophic microalgal oil. *Bioresource Technology*, 97, 841-846.
- Mock, T., Kroon, B. M. A., 2002. Photosynthetic energy conversion under extreme conditions-I: important role of lipids as structural modulators and energy sink under *N*-limited growth in Antarctic sea ice diatoms. *Phytochemistry*, 61, 41-51.
- Moore, M. N., Depledge, M. H., Readmen, J. W., Leonard, D. R. P., 2004. An integrated biomarker-based strategy for ecotoxicological evaluation of risk in the environmental management. *Mutation Research*, 552, 247-268.
- Mosulén, S., Domínguez, M.J., Vígara, J., Vílchez, C., Guiraum, A., Vega, J.M., 2003. Metal toxicity in *Chlamydomonas reinhardtii*. Effect on sulfate and nitrate assimilation. *Biomolecular Engineering* 20: 199-203.
- Moura Junior, A. M.; Bezerra Neto, E.; Koenig, M. L.; Leça, E. E., 2006. Composição química de microalgas em cultivo semi-intensivo: *Chaetoceros gracilis* Schutt, *Isochrysis galbana* Parke e *Thalassiosira weissflogii* (Grunow) G. Fryxell & Hasle. *Ver. Ciênc. Agron.*, 37(2), 142-148.
- Navarro, E., Baun, A., Behra, R., Hartmann, N. B., Filser, J., Miao, A. J., Quigg, A., Santschi, P. H., Sigg, L., 2008. Environmental behavior and ecotoxicity of engineered nanoparticles to algae, plants, and fungi. *Ecotoxicology* 17, 372-386.
- Nelson, D. L.; Cox, M. M., 2002. *Lehninger Princípios de Bioquímica*. 3 ed. Tradução: Arnaldo Antonio Simões, Wilson Roberto Navega Lodi. Worth Publishers, Inc.
- Oliveira, A. C., 2007. Toxicidade de elementos-traço para consumidores primários na presença de exopolissacarídeos produzidos por organismos fitoplanctônicos (Chlorophyceae e Cyanophyceae). 2007. Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo, São Carlos.
- Oxborough, K., Baker, N. R., 1997. Resolving chlorophyll *a* fluorescence images of photosynthetic efficiency into photochemical and non-photochemical components – calculation of qP and F_v'/F_m' without measuring F_0' . *Photosynthesis Research*, 54, 135-142.
- Parrish, C. C., 1988. Dissolved and particulate marine lipid classes: a review. *Marine Chemistry*, 23, 17-40.
- Parrish, C. C., 1999. Determination of total lipid, lipid classes, and fatty acids in aquatic samples. In *Lipids in freshwater ecosystems* (ed. M. T. Arts and B. C. Wainman), New York: Springer-Verlag, p.4-20.

- Parrish, C. C., Wangersky, P. J., 1987. Particulate and dissolved lipid classes in cultures of *Phaeodactylum tricornutum* grown in cage culture turbidostats with a range of nitrogen supply rates. *Marine Ecology Progress Series*, 35, 119–128.
- Pecora, R., 2000. Dynamic light scattering measurement of nanometer particles in liquids. *Journal of Nanoparticle Research* 2, 123-131.
- Peña-Vásquez, E., Pérez-Conde, C., Costas, E., Moreno-Bondi, M. C., 2010. Development of a microalgal PAM test method for Cu(II) in Waters: comparison of using spectrofluorometry. *Ecotoxicology*, 19, 1059-1065.
- Perales-Vela, H. V., Gonzáles-Moreno, S., Montes-Horcasitas, C., Cañizares-Villanueva, R. O., 2007. Growth, photosynthetic and respiratory responses to sub-lethal copper concentrations in *Scenedesmus incrustatus* (Chlorophyceae). *Chemosphere*, 67, 2274-2281.
- Quartacci, M. F., Pinzino, C., Sgherri, C. L. M., Dalla, V. F., 2000. Growth in excess copper induces changes in the lipid composition and fluidity of the PSII enriched membrane in whet. *Physiologia Plantarum*, 108, 87-93.
- Regier, N., Cosio, C., Von Moos, N., Slaveykova, V. I., 2015. Effects of copper-oxide nanoparticles, dissolved copper and ultraviolet radiation on copper bioaccumulation, photosynthesis and oxidative stress in the aquatic macrophyte *Elodea nuttallii*. *Chemosphere*, 128, 56-61.
- Rocha, G. S., Lombardi, A. T., Melão, M. G. G., 2016a. Influence of phosphorus on copper toxicity to *Selenastrum gracile* (Reinsch) Korshikov. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 128, 30-35.
- Rocha, G. S., Parrish, C. C., Lombardi, A. T., Melão, M. G. G., 2016b. Copper affects biochemical and physiological responses of *Selenastrum gracile* (Reinsch). *Ecotoxicology*, DOI 10.1007/s10646-016-1698-7.
- Rocha, G.S., Tonietto, A.E., Lombardi, A.T., Melão, M.G.G., 2016c. Effect of copper contaminated food on the life cycle and secondary production of *Daphnia laevis*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 133, 235-242.
- Ronco, A., Báez, M. C. D., Granados, Y. P., 2004. Ensayos Toxicológicos y Métodos de Evaluación de Calidad de Aguas – Estandarización, Intercalibración, Resultados y Aplicaciones. In: Morales, G. C. (ed). Centro Internacional de Investigaciones para el Desarrollo, Ottawa.
- Sarmiento, H., Unrein, F., Isumbisho M., Stenuite S., Gasol J. M., Descy J.-P., 2008. Abundance and distribution of picoplankton in tropical, oligotrophic Lake Kivu, eastern Africa. *Freshwater Biology*, 53, 756-771
- Schreiber, U., 1986. Detection of rapid induction kinetics with a new type of high-frequency modulated chlorophyll fluorometer. *Photosynthesis research*, v. 9, n. 1-2, 261-272.

- Schreiber, U., Bilger, W., 1993. Progress in chlorophyll fluorescence research: major developments during the past years in retrospect. (H-D. Behnke, U. Lüttge, K. Esser, J. W. Kadereit e M. Runge, Eds.) Progress in Botany / Fortschritte der Botanik, v. 54, p. 151-173.
- Sharma, K. K., Schumann, H., Schenk, P. M., 2012. High lipid induction in microalgae for biodiesel production. Energies, 5, 1532-1553.
- Siddiqui, S., Goddard, R. H., Bilermyer-Fraser, G. K., 2015. Comparative effects of dissolved copper and copper oxide nanoparticle exposure to the sea anemone, *Exaiptasia pallida*. Aquatic Toxicology 160, 205-213.
- Souza, J.P., Melo, D.C., Lombardi, A.T., Melão, M.G.G., 2014. Effects of dietborne cadmium on life history and secondary production of a tropical freshwater cladoceran. Ecotoxicology. 23(9), 1764-1773.
- Stauber, J. L., Florence, T. M., 1987. Mechanism of toxicity of ionic copper and copper complexes to algae. Marine Biology, 94, 511-519.
- Thomas, G., Stärk, H.-J., Wellenreuther, G., Dickinson, B. C., Küpper, H., 2013. Effects of nanomolar copper on water plants – Comparison of biochemical and biophysical mechanisms of deficiency and sublethal toxicity under environmentally relevant conditions. Aquatic Toxicology, 140-141, 27-36.
- Torres, M. A., Barros, M. P., Campos, S. C. G., Pinto, E., Rajamani, S., Sayre, R. T., Colepicolo, P., 2008. Biochemical biomarkers in algae and marine pollution. A review. Ecotoxicology and Environmental Safety, 71, 1-15.
- US-EPA, United States Environmental Protection Agency. 2012. Ecological Effects Test Guidelines: Algal Toxicity. Office of Chemical Safety and Pollution Prevention, Washington, D. C., EPA 712-C-006.
- Vidotti, E.C., Rollemberg, M.C., 2004. Algas: da economia nos ambientes aquáticos à bioremediação e à química analítica. Quim. Nova, 27 (1), 139-145.
- Wilhelm, C.; Jakob, T., 2011. From photons to biomass and biofuels: evaluation of diferente strategies for the improvement of algal biotechnology based on comparative energy balances. Appl Microbiol Biotechnol, 92(5), 909-919.