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

Avaliação da microalga marinha *Lingulodinium Polyedrum*
exposta ao fenol: biotransformação e atividade antioxidante

Paula Larangeira Garcia Martins

São Paulo
2011

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

Avaliação da microalga marinha *Lingulodinium Polyedrum*
exposta ao fenol: biotransformação e atividade antioxidante

Paula Larangeira Garcia Martins

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientador:
Prof. Dr. Pio Colepicolo Neto

São Paulo
2011

Paula Larangeira Garcia Martins

Avaliação da microalga marinha *Lingulodinium Polyedrum* exposta ao
fenol: biotransformação e atividade antioxidante

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

1º. examinador

2º. examinador

3º. examinador

São Paulo, _____ de _____.

Aos meus maiores amores:
Meus pais João e Márcia e meu marido Rafael.

AGRADECIMENTOS

A meu orientador Pio Colepicolo, pela oportunidade e principalmente pela confiança sempre em mim depositada.

As minhas meninas do CEPEMA, Elen, Déborah, Kelly, Rafa, Ingrid, Louise e Marcela, por todo o auxílio com as análises e a amizade que permanecerá. E aos colegas de laboratório Ednaíson, Renato, Luiza, Ângela, Aline, Diogo e João pelos experimentos e apoio fundamental no desenvolvimento dos cultivos e diversas atividades pertinentes a este trabalho. Várias dúvidas, necessidades e dificuldades em que sem vocês não seria possível chegar aqui.

Aos doutores, Claudio Martin Pereira de Pereira e Maria Anita Mendes, pelos planejamentos e disponibilidade em auxiliar.

Aos coordenadores e funcionários do CEPEMA-USP pelo total apoio estrutural dos laboratórios, equipamento e reagentes utilizados.

As agências CNPq, FAPESP e FUSP pelas bolsas e auxílios concedidos.

A meus pais e marido que compartilharam, viveram comigo cada momento, sempre demonstrando auxílio, muito amor, dedicação e paciência.

A todos os meus amigos que sempre me divertem e animam, em especial a Aline, minha amiga de tanto anos e de todas as horas.

Aos professores Adriana Florentino e José Calixto por toda a sabedoria.

A todas as pessoas que eventualmente não foram aqui nominadas e que de uma maneira ou de outra, colaboraram para execução desse trabalho.

Meus mais sinceros agradecimentos: “Longos dias e belas noites” a todos.

“Se emprego tantas horas para me convencer de
que tenho razão, não será que exista alguma razão
para ter medo de que eu esteja equivocada?”
(Jane Austen)

RESUMO

Martins P. L. G. Avaliação da microalga marinha *Lingulodinium Polyedrum* exposta ao fenol: biotransformação e atividade antioxidante. 2011. 131p. Dissertação (MESTRADO). Programa de Pós-Graduação em Toxicologia e Análises Toxicológicas. Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Devido à necessidade de se conhecer os impactos que as diversas atividades antropogênicas exercem sobre os ecossistemas torna-se relevante o estudo dos organismos aquáticos perante os resíduos tóxicos resultantes, com o objetivo de facilitar a identificação de áreas poluídas ou contaminadas e estudos de meios atingidos por estes agentes poluentes. Estudo da microalga em contato com o fenol em concentrações conhecidas, compreende a determinação dos efeitos tóxicos e geração de metabólitos, caracterizando uma possível utilização deste microorganismo como bioindicador para contaminações do poluente. Determinou-se as concentrações de fenol capazes de em 24 horas inibirem o crescimento das células de *L. polyedrum* em 20 e 50% (IC 20 e IC 50) respectivamente $40 \mu\text{mol.L}^{-1}$ e $120 \mu\text{mol.L}^{-1}$. Identificou-se a necessidade de padronização das variáveis na execução dos ensaios dose-resposta com algas, permitindo construir protocolos que auxiliariam a obtenção de legislações que assegurem os limites de compostos tóxicos aos organismos costeiros. Calculou-se que a microalga *L. polyedrum* possui uma taxa de biodegradação do fenol por célula na média de aproximadamente ($0,02 \mu\text{mol.h}^{-1}.\text{cel}^{-1}$), capaz de biotransformar $120 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de fenol em um período de 16 horas. Vias de biotransformação do fenol na microalga *L. polyedrum* se dão pela conjugação com a glutathione, catalisada por glutathione S-transferase e pela via metabólica de fenol hidroxilase e catecol 2,3-dihidroxigenase. Identificou-se a geração de ácido 2-hidroxi-mucônico semialdeído, 1,2-dihidroxibenzeno (Catecol) e

ácido 2-oxo 4-pentenóico como metabólitos resultantes da exposição de *L. polyedrum* ao fenol. O composto orgânico fenol é capaz de induzir um estado de aumento na atividade antioxidante da microalga *L. polyedrum*, sendo as enzimas superóxido dismutase e catalase os melhores biomarcadores, por terem sua expressão até três vezes maior no grupo exposto. Determinou-se que a razão GSH/GSSG no grupo tratado com fenol é menor, devido ao aumento de 20 ng.mL⁻¹ de GSSG, expressando o efeito oxidativo no sistema glutathiona, que em condições normais possui os níveis de GSSG muito abaixo dos de GSH. A avaliação fotossintética sugeriu que o fenol interferiu relativamente na fotossíntese da microalga em um curto intervalo de tempo, demonstrando a promissora sensibilidade a este poluente presente no ambiente marinho.

Palavras-chave: toxicologia ambiental; poluente orgânico; metabolismo; atividade enzimática.

ABSTRACT

Martins PLG. Evaluation of marine microalgae *Lingulodinium polyedrum* exposed to phenol: biotransformation and antioxidant activity. 2011. 131 p.

Due necessity of knowing and understand the impacts of diverse anthropogenic activities exerted above ecosystems became relevant the study of aquatic organisms exposed to toxic waste, this can facilitate the identification of polluted or contaminated areas. Study of microalgae in contact with phenol at known concentrations, comprehended a determination of the toxic effects and generation metabolites of characterizing the possible use of the organism as a bioindicator to contamination of the pollutant. In this work it was determined in 24 hours those inhibitor phenol concentrations of cell growth of *L.polyedrum* on 20% and 50% (IC 20 and IC 50) respectively $40 \mu\text{mol.L}^{-1}$ and $120 \mu\text{mol.L}^{-1}$. Acknowledged need for standardization of variables in the implementation of dose-response tests with algae, allowing you to build protocols that would help to obtain laws that ensure the limits of toxic compounds to coastal organisms. It was assumed that the *L. polyedrum* microalgae has a biodegradation rate of phenol per cell on average of about ($0,02 \mu\text{mol.h}^{-1}.\text{cel}^{-1}$), capable of biotransformation $120 \mu\text{mol.L}^{-1}$ of phenol in a period of 16 hours. Biotransformation pathways of phenol in the microalgae *L. polyedrum* occur by conjugation with glutathione, catalyzed by glutathione S-transferase and the metabolic pathway of phenol hydroxylase and catechol 2,3-dihydroxygenase. We identified 2- hydroxy muconic semialdehyde acid, 1,2-dihydroxybenzene (catechol) and 2-oxo-4-pentenoic acid as metabolites resulting from exposure to phenol. The phenol is able to induce a high active antioxidant enzymes on *L. polyedrum*, and the

enzymes superoxide dismutase and catalase the best biomarkers since were induced three times more in the exposed group. It was determined that the GSH / GSSG ratio in the group treated with phenol, GSSG has an increase of 20 ng.mL⁻¹. Evaluation suggested that the phenol interfered on photosynthesis of microalgae in a short time, showing promising sensitivity to this pollutant in the marine environment.

Keywords: environmental toxicology; organic pollutant; metabolism; enzymatic activity.

LISTA DE ABREVIATURAS

APx: Ascorbato peroxidase

ATSDR: Agency for Toxic Substances and Disease Registry (Agência de Registro de Substâncias Tóxicas e Doenças)

CAT: Catalase

CETESB: Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental

CG-EM: Cromatógrafo a gás acoplado a um espectrômetro de massas

CL50 : Concentração Letal 50%

CLAE: Cromatografia líquida de alta eficiência

CONAMA: Conselho Nacional do Meio Ambiente

DL50 : Dose Letal 50%

ϵ = Coeficiente de extinção molar

EC: Concentração efetiva

EROs: Espécies reativas de oxigênio

GSH: Glutathione reduzida

GSSG: Glutathione oxidada

GST: Glutathione S-transferase

IC50 e IC20: Inibição de crescimento de 50% e 20%, respectivamente

IBAMA: Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis

Kow: Coeficiente de partição octanol/água

L.Tox (T.I.M.C.): Limite de Toxicidade (Teste de Inibição da Multiplicação Celular)

Log Kow: Logaritmo de Kow

NCEAS: Centro Nacional de Análises e Sínteses Ecológicas

OSHA: Segurança ocupacional e Administração da saúde

PAH: Hidrocarbonetos poliaromáticos

PAM: Pulso saturante de amplitude modulada

PCB: Bifenilas policloradas

pH: Potencial hidrogeniônico

PH: Fenol hidroxilase

SOD: Superóxido dismutase

TBT: Tributilestanho

TLm: 50% dos organismos testados mostraram comportamento anormal

TR: Tempo de retenção

U.S.EPA: Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos

UV-Vis: Ultravioleta-visível

λ : Comprimento de onda

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Mapa mundial do impacto de atividades humanas nos oceanos (NCEAS, 2010). _____	23
Figura 2 - Mapa de ocorrência mundial da microalga <i>L. polyedrum</i> (DALE, 1996). _	28
Figura 3 - O ciclo de vida da <i>L. polyedrum</i> . _____	32
Figura 4 - <i>Lingulodinium polyedrum</i> - desenho esquemático da célula inteira em visão ventral. Adaptado de University of Liverpool, 2003. _____	33
Figura 5 - Microscopia eletrônica de varredura da célula de <i>L. polyedrum</i> com teca e em fase cística. _____	35
Figura 6 - Estrutura molecular do Fenol. _____	40
Figura 7 - Ressonância global do fenol. _____	43
Figura 8 - Metabolismo de xenobióticos. _____	48
Figura 9 - Biotransformação do fenol pela microalga <i>Minutocellus polymorphus</i> (CAMPOS, 2008). _____	49
Figura 10 - Rotas completas de biodegradação enzimática do Fenol. _____	50
Figura 11 - Esquema de conjugação com GSH. _____	51
Figura 12 - Danos celulares causados por estresse oxidativo originado da metabolização de xenobióticos. Adaptado de Boelsterli (2003). _____	53
Figura 13 - Reações enzimáticas antioxidantes. _____	55
Figura 14 - Fotografia dos cultivos de <i>Lingulodinium polyedrum</i> na incubadora. ____	60
Figura 15 - Pontos de coleta de água do mar da Bacia de Santos-SP. _____	62
Figura 16 - Representação da geração de $O_2^{\bullet -}$ no ensaio de atividade da SOD. ____	69

Figura 17 - Gráfico da Curva de Crescimento celular da <i>L. polyedrum</i> por microscopia óptica.	75
Figura 18 - Gráfico da Curva de Crescimento celular da <i>Lingulodinium polyedrum</i> por absorção em espectrofotômetro a 680nm.	76
Figura 19 - Gráfico do teste de sobrevivência celular da <i>L. polyedrum</i> na % água do mar de Santos. A densidade celular de todas as aclimações acompanhou a curva de crescimento pré-EMtabelecida.	77
Figura 20 - Cromatogramas e equação linear da curva de calibração do fenol em CLAE.	82
Figura 21 - Curva de calibração do fenol em CLAE. Os valores são de média das triplicatas com os desvios padrão.	83
Figura 22 - Gráfico linear da curva de calibração do fenol em CG.	84
Figura 23 - Exposições ao fenol - Imagem das células por microscopia óptica com corante Azul de Evan's.	85
Figura 24 – Gráfico de Dose-resposta da Inibição do crescimento celular após 24 horas de exposição ao fenol.	87
Figura 25 - Cromatogramas – Amostra de material intracelular, após 8 e 24 horas de	90
Figura 26 – Cromatograma e Espectros de massas – Amostra de material intracelular, após 8 h de exposição ao fenol, determinado por CG-EM.	91
Figura 27 – Gráfico do consumo de fenol pela taxa de biodegradação celular. Exposição à 0,12 mmol.L ⁻¹ de fenol.	92
Figura 28 - Cromatograma da amostra de material intracelular via CG-EM.	93
Figura 29 - Via sugerida para a biodegradação do fenol pela <i>L.polyedrum</i> .	96
Figura 30 - Atividade de SOD em cultivos de <i>L. polyedrum</i> após 24 horas de exposição a 0,10 mmol.L ⁻¹ de fenol.	97

Figura 31 - Atividade de CAT em cultivos de <i>L. polyedrum</i> após 24 horas de exposição a 0,10 mmol.L ⁻¹ de fenol. _____	98
Figura 32 - Atividade de APX em cultivos de <i>L. polyedrum</i> após 24 horas de exposição a 0,10 mmol.L ⁻¹ de fenol. _____	100
Figura 33 - Atividade de GST em cultivos de <i>L. polyedrum</i> após 24 horas de exposição a 0,10 mmol.L ⁻¹ de fenol. _____	101
Figura 34 - Curva de calibração de GSH via LC-EM. _____	102
Figura 35 - Curva de calibração de GSSG via LC-EM. _____	103
Figura 36 - GSH em cultivos de <i>L. polyedrum</i> exposta a 0,10 mmol.L ⁻¹ de fenol. _	103
Figura 37 - GSSG em cultivos de <i>L. polyedrum</i> exposta a 0,10 mmol.L ⁻¹ de fenol. Os valores representam a média das triplicatas com os desvios padrão. _____	104
Figura 38 - Razões de GSH/GSSG em cultivos de <i>L. polyedrum</i> exposta a 0,10 mmol.L ⁻¹ de fenol. _____	105
Figura 39 - Desempenho fotossintético dos cultivos em torno de 8×10^3 células.mL ⁻¹ da <i>L. polyedrum</i> exposta a 0,12 mmol.L ⁻¹ de fenol durante 24 horas. _____	106
Figura 40 - Esquema ilustrativo da reação de fluorescência da clorofila e transporte de elétrons no processo de fotossíntese. _____	108

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Classificação da microalga segundo Fensome <i>et al.</i> , 1993.	31
Tabela 2 - Parâmetros da água do mar na Bacia de Santos analisados nos anos de 2006/7.	39
Tabela 3 - Contaminações por metais pesados e benzo(a)pireno em sedimentos da Bacia Hidrográfica de Santos.	39
Tabela 4 - Propriedades Físico-Químicas e Ambientais do fenol.	41
Tabela 5 - Limites máximos de concentrações em águas do fenol estabelecidos pela res. 357/05 do CONAMA.	45
Tabela 6 - Toxicidade do fenol para organismos aquáticos. Fonte: Adaptado de DeLorenzo, 2009.	46
Tabela 7 - Análises das amostras de água do mar coletadas na Bacia Hidrográfica de Santos.	78
Tabela 8 - Eficiência da extração de fenol na curva de calibração em CG-EM.	84
Tabela 9 – Valores de IC 20 e IC 50 de células tratadas com fenol.	87
Tabela 10 - Exemplos de ensaios dose-resposta com algas expostas ao fenol.	89
Tabela 11 - Metabolismo - Pesos moleculares encontrados em CG-EM.	94

SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

LISTA DE ABREVIATURAS

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

1. INTRODUÇÃO	19
1.1. Ambiente marinho	20
1.1.1. Biomarcadores de poluição marinha	25
1.2. Diversidade das Algas	26
1.2.1. A microalga <i>Lingulodinium polyedrum</i>	27
1.2.1.1. Características gerais	30
1.2.1.2. Constituintes celulares	33
1.2.1.3. Capacidade fotossintética	36
1.3. Poluentes orgânicos — Presença nos oceanos	36
1.3.1. Contaminação marinha – Litoral brasileiro	36
1.3.2. O contaminante fenol	40
1.3.2.1. Propriedades físico-químicas	40
1.3.2.2. Síntese Industrial do fenol	42
1.3.2.3. A força dos fenóis como ácidos	42
1.3.2.4. Concentrações limites de fenol	44
1.4. Biotransformação do fenol	47
1.4.1. Vias de metabolismo estabelecidas	49
1.5. Estresse oxidativo induzido por xenobióticos	52
1.5.1. Componentes biológicos de função antioxidante	54
2. OBJETIVOS	57
2.1. Objetivo geral	58
2.1.1. Objetivos específicos	58
3. MATERIAIS E MÉTODOS	59
3.1. Cultivos Celulares	60

3.1.1. Manutenção dos cultivos	60
3.1.2. Curvas de crescimento	61
3.1.3. Determinação da sobrevivência celular em água de cultivo original da Bacia Hidrográfica de Santos	62
3.2. Cromatografia das amostras para análises qualitativas e quantitativas de fenol	63
3.2.1. Curvas de Calibração	63
3.2.1.1. Equipamentos e condições cromatográficas	64
3.2.2. Preparação das amostras	65
3.2.2.1. Quantificação do fenol no meio de cultivo	65
3.2.2.2. Quantificação do fenol intracelular	65
3.2.2.3. Identificação dos metabólitos de fenol	65
3.3. Avaliação Metabólica — Ensaios dose-resposta de inibição do crescimento celular	66
3.4. Ensaios enzimáticos — Avaliação da atividade antioxidante e biotransformação de fase II	67
3.4.1. Preparação dos extratos	67
3.4.2. Quantificação de proteína	68
3.4.3. Superóxido dismutase (SOD)	68
3.4.4. Catalase (CAT)	70
3.4.5. Ascorbato peroxidase (APX)	70
3.4.6. Glutathione S-transferase (GST)	71
3.5. Avaliação dos níveis intracelulares da razão GSH/GSSG	71
3.5.1. Curva de calibração	71
3.5.2. Condições cromatográficas	72
3.5.3. Preparação das amostras	72
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	74
4.1. Cultivos de <i>Lingulodinium polyedrum</i>	75
4.1.1. Curvas de Crescimento	75
4.1.2. Determinação da sobrevivência celular em água de cultivo original da Bacia Hidrográfica de Santos	77
4.2. Avaliação Metabólica — Ensaios dose-resposta de inibição do crescimento celular	82
4.2.1. Curvas de calibração para quantificação do fenol	82
4.2.1.1. Curva CLAE	82
4.2.1.2. Curva CG	83
4.2.2. Ensaios dose-resposta de inibição do crescimento celular	85
4.2.3. Nível intracelular de fenol	90
4.2.4. Consumo de fenol	92
4.2.5. Identificação de metabólitos do fenol	93
4.3.2. Atividade de CAT (E.C.: 1.11.1.6)	98

4.3.3. Atividade APX (E.C.:1.11.1.11)	99
4.3.4. Atividade GST (E.C.: 2.5.1.18)	101
4.4. Avaliação da razão GSH/GSSG.	102
4.5. Avaliação da Capacidade Fotossintética	106
5. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	109
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	112
7. ANEXOS	125

1. INTRODUÇÃO

1.1. Contaminantes marinho

A diversidade de ações humanas que influenciam no meio ambiente cresce cada vez mais. Desta forma, aumentam a demanda ambiental de controle de contaminação em águas marinhas (DEPLEDGE; BILLINGHURST, 1999).

As contaminações do ambiente marinho ocorrem quando os nutrientes, produtos químicos tóxicos e agentes patogênicos estão presentes nos meios em concentrações maiores do que as encontradas naturalmente, ou resultam em efeitos adversos sobre o ambiente aquático (ROBERTS; JOHNSTON; POORE, 2008 a). Os compostos tóxicos incluem produtos químicos agrícolas e industriais (por exemplo, metais pesados, polímeros orgânicos, herbicidas e praguicidas) (ALZIEU, 1991) ou até mesmo compostos gerados por descartes domésticos (como esgoto e outros detritos).

Os nutrientes (em especial os nitratos e fosfatos) são uma das ameaças mais difundidas para o meio marinho e podem alterar os ecossistemas, promovendo o crescimento em excesso de produtores primários marinhos, como fitoplâncton e algas, o que muitas vezes causam danos às outras espécies. Os nutrientes são descarregados para o ambiente marinho através de águas residuais tratadas, águas pluviais e descargas industriais, da aquicultura, e das vias navegáveis ou transportados por águas subterrâneas. Patógenos incluindo bactérias, vírus e algas tóxicas são tipicamente encontrados em águas estagnadas com níveis elevados de nutrientes facilitadores da proliferação destes microorganismos capazes de desequilibrar os biomas naturais. Neste sentido, também representam riscos para a saúde dos seres humanos e dos animais que entram em contato por ingestão de frutos do mar oriundos de áreas afetadas.

A exploração do petróleo é reconhecida como um dos principais fatores de risco de contaminação dos oceanos, não apenas diretamente pelos derrames de petróleo, mas também através de águas residuais (água formada durante a recuperação de petróleo), lamas de perfuração (lubrificantes utilizados na extração de petróleo e gás), e os hidrocarbonetos resultantes de seu refino (LEAHY; COLWELL, 1990).

As operações portuárias que utilizam rotineiramente tintas anti-incrustantes, contendo em sua composição componentes como o tributilestanho (TBT), nos cascos de navios também afetam os oceanos na medida em que substâncias remanescentes desse processo podem persistir por longos períodos, e acumulando-se na biota causando sérios impactos para a saúde animal e humana mesmo em concentrações muito baixas (ROBERTS; JOHNSTON; POORE, 2008 b).

Há outros problemas vinculados a contaminações, também oceânicas, como o excesso de deposição de sedimentos que pode resultar na diminuição da disponibilidade do oxigênio para a flora e fauna marinhas, sufocando-as e ainda aumentando a turbidez na coluna d'água. Descargas de águas hipersalinas ou residuais, a partir de fontes industriais, em temperaturas variadas, afetam negativamente os ecossistemas marinhos locais, particularmente quando estas temperaturas estão além dos limites da variação natural, segundo Fukue *et al.* (1999). O lixo não biodegradável despejado no meio ambiente oceânico também é uma ameaça para os animais marinhos, seja pela ingestão ou emaranhamento.

Em relação aos produtos químicos orgânicos acumulados nos oceanos, tais como fenóis, organoclorados e hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) encontram-se presentes em quantidades significativas e por isso são estudados

diversos organismos por eles afetados. Os estudos de identificação e quantificação dos contaminantes em organismos biológicos são chamados de biomonitoramento.

O biomonitoramento é uma forma freqüente de avaliação da reação à contaminação dos sistemas marinhos. Através da medição de contaminantes em bioacumulação de espécies sentinelas, pode-se identificar as regiões potencialmente impactadas por atividades antrópicas (RAINBOW; PHILLIPS, 1993). Biomarcador é um termo referente a alterações biológicas específicas de determinados organismos que identifiquem uma exposição crônica ou aguda aos contaminantes. Os biomarcadores são utilizados em estudos ambientais como ferramenta no biomonitoramento, questão que encontra-se descrita com maior atenção no item 1.1.1. adiante.

Devido à enorme complexidade do ambiente marinho, impactos por menores que sejam, afetam vastas regiões e biomas que geram transformações e descaracterizações em diferentes espécies de organismos vivos. Desta forma, foi elaborado pela NCEAS (2010) (National Center for Ecological Analysis and Synthesis – Califórnia, Estados Unidos), uma série de mapas que retratam as condições de todos os oceanos, com relação a diversos parâmetros, como contaminações por compostos orgânicos e pesca predatória. De todos os dados levantados por estas pesquisas, o relevante foram as observações das diversas implicações de diferentes atividades humanas no aumento de compostos orgânicos nos oceanos. A Figura 1 apresenta o mapa de contaminações e alterações oceânicas mundiais.

Figura 1 - Mapa mundial do impacto de atividades humanas nos oceanos (NCEAS, 2010).

Observa-se que em áreas de impacto ambiental muito alto (representadas pela cor vermelha) localizam-se nos litorais dos países com maior atividade industrial, como China, Japão, Estados Unidos e em grande parte do continente Europeu. No Brasil, não é surpresa que o litoral da região sudeste possua a situação mais grave. Em particular o Estado de São Paulo, que comporta o maior polo industrial brasileiro, corresponde a um campo de coloração vermelha. De maneira geral, a imagem mais forte que o mapa nos ilustra é a coloração alaranjada que expressa um alto impacto médio na maior área oceânica mundial.

Desta forma o biomonitoramento com utilização de organismos marinhos pode expressar os efeitos de baixas concentrações dos contaminantes e é importante para a identificação deste alto impacto ambiental dos oceanos mundiais, observado na Figura 1, implicando no desenvolvimento de ações para contenção e recuperação do cenário atual. Contudo, a toxicidade aos organismos aquáticos (ou biomonitoramento) estuda os efeitos tóxicos de agentes físicos e químicos sobre os

organismos representativos do ambiente aquático, de acordo com Tatken e Lewis (1983). Por ser impossível testar todas as espécies que fazem parte do ecossistema aquático, o critério mais amplamente aceito é o de se escolher espécies expressivas de diferentes níveis tróficos como algas, micro-crustáceos, moluscos e peixes (CESTESB, 1981).

O estudo dos efeitos de agentes tóxicos sobre a vida aquática pode ser realizado através de ensaios biológicos "in loco" ou em condições laboratoriais, sendo estes últimos mais utilizados por permitirem um controle mais efetivo dos fatores ocasionais (temperatura, pH, duração de exposição, meio e concentração). Ao se avaliar a toxicidade de xenobióticos ou misturas destes, frente a um vetor biológico, determina-se a concentração responsável por um efeito tóxico que pode variar entre: efeito letal, sub-letal, crônico, subcrônico, agudo, subagudo, imobilização ou modificação do comportamento, entre outros. Estes experimentos podem ser realizados utilizando-se sistemas de fluxo contínuo, semi-estáticos ou estáticos. Quanto ao meio, pode-se utilizar meio aquático do tipo água continental ou marinha, que podem ser provenientes de uma fonte natural ou preparadas (The American Water Works Association , 1971).

Pesquisas voltadas ao ambiente marinho englobam estudo dos contaminantes (metais, compostos orgânicos, inorgânicos, óleos, entre outros) e de uma série de espécies de animais, organismos fotossintetizantes e microorganismos marinhos. Neste sentido, as algas destacam-se promissora como organismos bioindicadores por permitirem a detecção de agentes poluidores que estejam em baixas concentrações, já que inseridas no habitat aquático, compõem a base da cadeia trófica, transformando-as em excelentes indicadores primários de contaminações das águas marinhas (COLEPICOLO et al, 1992).

1.1.1. Biomarcadores de poluição marinha

A atividade antropogênica aumenta muito mais rápido do que as precauções ambientais. Acompanhar o impacto dos poluentes sobre formas de vida aquática é um desafio devido à sensibilidade diferenciada dos organismos a um determinado poluente. A importância de utilizar biomarcadores para contaminação de ambientes marinhos têm sido ignorada ou mal caracterizada.

Outra dificuldade é a incapacidade de avaliar os efeitos em longo prazo de poluentes persistentes nos ecossistemas, bioacumulados em níveis tróficos superiores. Segundo Volkman (1998) microalgas marinhas são particularmente promissoras para servirem de espécies indicadoras de poluentes ou contaminantes orgânicos e inorgânicos, uma vez que normalmente, são as formas de vida mais abundante nos ambientes aquáticos e ocupam a base da cadeia alimentar.

A prática do biomonitoramento é definida pela UNEP (United Nations Environment Program) como a observação repetitiva de um ou mais elementos biológicos em horários e locais previamente determinados, realizando análises e comparações, utilizando métodos padronizados. Estas análises fornecem informações importantes sobre a biologia dos organismos e sobre os níveis de contaminações, relatando os efeitos tóxicos sobre a biota (TORRES, 2008).

Conforme o objetivo do biomonitoramento, biomarcadores diferentes são utilizados como ferramenta no acompanhamento de áreas impactadas. Dentre os biomacadores mais empregados, a avaliação do sistema antioxidante para observação de estresse oxidativo, danos oxidativos em proteínas e as enzimas envolvidas no metabolismo de substâncias químicas com potencial ação tóxica, destacam-se em vários organismos estudados.

1.2. Diversidade das Algas

Os organismos conhecidos como algas não podem ser incluídos em um único grupo. De forma simplificada e com inúmeras exceções, pode-se dizer que algas são organismos aquáticos fotossintetizantes autotróficos, tipicamente menores e menos complexos estruturalmente se comparados com as plantas terrícolas (GRAHAM; WILCOX, 2000).

Várias características são utilizadas para classificar as algas, incluindo a natureza da(s) clorofila(s), a constituição química da parede celular e a flagelação. Uma característica comum é que todos os tipos de algas contêm clorofila *a*. No entanto, a presença de fitopigmentos além da clorofila *a* é característica de uma divisão especial de algas.

A estrutura molecular do polímero reserva, sintetizado como resultado da fotossíntese, é uma variável-chave utilizada na classificação de algas. Classificam-se também em macroalgas as pluricelulares e em microalgas as unicelulares, como uma das características marcantes. É importante ressaltar, porém, que foram elaborados muitos esquemas de classificação utilizados em períodos e discussões distintos, por exemplo, utiliza-se a definição de Bold e Wynne (1985), onde as divisões das algas incluem: Cyanophyta, Prochlorophyta, Phaeophyta, Chlorophyta, Charophyta, Euglenophyta, Chrysophyta, Pyrrophyta, Criptofitas e Rhodophyta.

Existem também, vários grupos taxonômicos de microalgas marinhas, no entanto, as principais são as diatomáceas e os dinoflagelados. Estes são os principais componentes do fitoplâncton marinho (LOBBAN; HARRISON; DUNCAN, 1985).

As algas estão envolvidas numa enormidade de associações bióticas, algumas delas obrigatórias. Os recifes de corais, que ocupam grande parte das

águas tropicais oceânicas, são dependentes de inquilinos intracelulares – algas microscópicas conhecidas como zooxantelas – que fornecem alimento e oxigênio em troca de dióxido de carbono e amônia liberados pelas células dos corais. O fato de essa relação ser obrigatória explica o porquê da distribuição dos recifes de corais estar limitada a águas rasas e bem iluminadas (BUICK, 1992).

Cianobactérias constituem o primeiro grupo de organismos fotossintetizadores oxigênicos, e atribui-se a elas o processo de formação de uma atmosfera rica em oxigênio (O₂), sem a qual não se originaria a vida eucariótica na Terra (BUICK, 1992).

Um dos motivos das algas serem muito estudadas se dá justamente por serem organismos importantes e de sobrevivência tão fundamental para a cadeia trófica e para a preservação de todo o ecossistema aquático.

Inclusos no grupo de microalgas, os dinoflagelados são, em sua maioria, unicelulares, possuem dois flagelos e pertencem ao plâncton marinho. Podem produzir bioluminescência, devido à oxidação da luciferina pela luciferase resultando no fenômeno conhecido como maré vermelha e liberando toxinas (BALECH, 1988).

1.2.1. A microalga *Lingulodinium polyedrum*

A alta ocorrência de *L. polyedrum* no ambiente aquático, marinho (como ilustra a Figura 2), garante a ela um potencial bioindicador interessante.

Figura 2 - Mapa de ocorrência mundial da microalga *L. polyedrum* (DALE, 1996).

A distribuição da *L. polyedrum* nos oceanos restringe-se ao hemisfério norte, em águas mais frias do Oceano Atlântico.

Estudos realizados com a *L. polyedrum* exploraram os vários processos fisiológicos regidos pelo seu relógio biológico, tais como bioluminescência, a divisão celular, migração vertical, fotossíntese e atividades das enzimas nitrato redutase e superóxido dismutase (CARDOZO *et al.*, 2007), fornecendo conhecimentos bioquímicos aprofundados, que permitem um maior entendimento do comportamento

da microalga perante o estudo e avaliação de contaminação por fenol realizados neste trabalho.

A escolha desta espécie de microalga também se deu devido à observação da necessidade de utilizar microorganismos marinhos em testes de toxicidade padronizados. A vasta literatura em ensaios bioquímicos desta espécie sob exposição a diferentes agentes tóxicos favorece a análise de sua sensibilidade frente a contaminações.

Avaliações de amostras líquidas marinhas realizadas em diferentes organismos são padronizadas por órgãos internacionais, destacando-se espécies de peixes, tais como, *Cyprinodon variegatus*, que possui teste de toxicidade crônica por meio de avaliação da mortalidade (U.S. EPA, 2002). Devido às algas e os crustáceos estarem abaixo dos peixes na cadeia trófica, permitem uma maior especificação para biomonitoramento de áreas ainda pouco afetadas.

A capacidade antioxidante da *L. polyedrum* perante outros poluentes e o comportamento celular de aclimação já estipulados, favorece esta espécie como bom modelo de microrganismo a ser utilizado para teste de toxicidade, assim como a avaliação de sua capacidade fotossintética perante a toxicidade de diferentes agentes químicos, por exemplo, em testes realizados por Kirk (1993), podendo variar ou não. Desta maneira, a microalga *L. polyedrum*, configura-se como precursora dos estudos de ecotoxicidade e com relação à sua aplicação como biodegradação ou indicador de contaminação de diferentes classes químicas.

Sendo assim, este organismo já foi testado por Leitão e colaboradores (2003) com relação a impactos sobre suas defesas antioxidantes e aclimação celular durante exposição a bifenilas policloradas (PCBs), resultando em inibição significativa, o que permite enriquecer a discussão dos resultados obtidos durante o

desenvolvimento deste projeto. A exposição de microalgas ao fenol também foi explorada, sendo utilizadas outras espécies resultando, por exemplo, em um trabalho de Semple e Cain (1996) que descreve a biotransformação do fenol pela microalga *Ochromonas danica*. Desta forma, a *L. polyedrum* compõe um importante grupo celular a ser investigado como passível de sofrer efeitos tóxicos causados por compostos fenólicos e abrange a capacidade de se estudar as reações metabólicas resultantes da exposição ao poluente, agregando dados bioquímicos para a ecotoxicologia.

1.2.1.1. Características gerais

A microalga marinha bioluminescente *Lingulodinium polyedrum* pertence à Divisão Dinophyta (Pyrrhophyta) – dinoflagelados (dois flagelos) – possui organização celular eucarionte; parede celular composta de celulose e contém pigmentos como: clorofilas *a* e *c₂*; xantofilas (peridinina, neoperidinina, dinoxantina, neodinoxantina) e carotenos (principalmente β -caroteno). Na Tabela 1 encontram-se informações específicas de classificação da *L. polyedrum* após 1993.

Tabela 1 – Classificação da microalga segundo Fensome *et al.*, 1993.

CLASSIFICAÇÃO	<i>Microalga Lingulodinium polyedrum</i> após 1993
Divisão	Dinoflagellata - (Butschli 1885)
Subdivisão	Dinokaryota
Classe	Dinophyceae - (Pacher 1914)
Subclasse	Peridiniphycidae
Ordem	Gonyaulacales - (Taylor 1980)
Subordem	Gonyaulacineae
Família	Gonyaulacaceae
Subfamília	Cribroperidinioideae
Gênero	Lingulodinium
Espécie	<i>L. polyedrum</i>

Com relação à reprodução celular da *L. polyedrum*, que ocorre na fase escura (isenta de luz fotossintetizante), é um parâmetro indispensável a ser analisado nos ensaios com este organismo em cultivos de laboratório. A Figura 3 ilustra, resumidamente, o ciclo de vida da *L. polyedrum*. Três processos importantes devem ser evidenciados: reprodução vegetativa, formação de fases císticas e reprodução sexual (HOLLNAGEL, 2000). Além da reprodução sexual, condições adversas também induzem a fase cística, como alterações de luminosidade, temperatura, salinidade e estresse ambiental de origem mecânica ou química.

Figura 3 - O ciclo de vida da *L. polyedrum*.

1. Quando as condições estão adequadas para prevalecer o desencistamento, é formada uma célula desprovida de parede celular, que leva horas para ser refeita. 2. Reprodução vegetativa por fissão binária – por divisão da parede celular ou 3. ecdise. 4. 5. Torna-se possível formar os gametas que se fundem formando o 6. Planozigoto. 7. Os cistos começam a ser formados dentro da membrana e da teca, quando completo, a parede celular é eliminada e 8. a fase cística ocorre até que haja condições apropriadas para o desencistamento (LEWIS; HALLETT, 1997).

1.2.1.2. Constituintes celulares

Os constituintes da célula de *L. polyedrum* estão ilustrados na Figura 4. A parede celular é formada de placas celulósicas rígidas, sendo também denominada teca. Essas placas encontram-se em vesículas no interior da membrana plasmática e não externamente como a parede celular da maioria das algas.

Figura 4 - *Lingulodinium polyedrum* - desenho esquemático da célula inteira em visão ventral. Adaptado de University of Liverpool, 2003.

As células são de contorno poliédrico com tecas fortemente esculpidas e robustas. Estes dinoflagelados são rodeados por uma membrana celular designada plasmalema. Por baixo dela existe uma camada simples de vesículas anfigiesmais (NETZEL; DÖRR, 1984). Cada vesícula anfigiesmal contém uma placa da teca. Entre as placas, existem suturas que dão flexibilidade e permitem o crescimento. O arranjo destas placas (tabulação) é constante para a espécie. A célula está protegida por

um invólucro protéico e flexível. O teor protéico total atinge 4403 pg. célula⁻¹ e as placas de teca contém em torno de 1673 pg. célula⁻¹ de carboidratos.

Os flagelos localizam-se dentro de dois sulcos: um rodeando a célula como um cinto (cíngulo), e o outro perpendicular a este. O batimento desses flagelos faz o dinoflagelado rodopiar e ter propulsão (FACCINI, 2009). Os dois flagelos diferentes originam a partir de um único poro. O flagelo transversal tem forma de fita ondulante, circunda o corpo e está, normalmente, alojado no sulco equatorial denominado cíngulo. Outro, longitudinal, é geralmente cilíndrico e menos ondulante, estende-se para o exterior a partir de um sulco médio (sulco longitudinal ou sulcus) e é responsável por movimentos de translação. O bater simultâneo dos flagelos permite-lhes manter a posição no meio aquático e deslocarem-se com movimento helicoidal. A migração na água pode atingir velocidades entre 75 a 370 $\mu\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$, ou seja, 20 a 30 metros em 24 horas (SOUSA; RIVAS-CARBALLO; PAIS, 1999).

O núcleo celular dos dinoflagelados é tipicamente eucariota (mesocariótico), caracterizado pela presença de cromossomos permanentemente condensados e visíveis durante o ciclo mitótico. Além disso, a mitose é "fechada", ou seja, a membrana nuclear não se rompe durante a divisão mitótica e o fuso cromático é extranuclear, não estando associado aos centríolos; os filamentos passam através de invaginações que se formam no núcleo durante a prófase. Outra característica é conter uma elevada quantidade de DNA sem histonas (proteínas básicas) e, portanto, de nucleossomas.

O teor de DNA na microalga foi estipulado, por Holm-Hansen (1969), atingindo em torno de 200 pg . célula⁻¹. Este é um valor relativamente maior do que os encontrados em outros dinoflagelados, que em geral possuem uma maior quantidade de DNA nuclear do que outras microalgas (com variação típica entre 0,1-

0,2 pg . células⁻¹) (RIZZO, 1987). De acordo com isso, existem números relativamente grandes de cromossomos no núcleo dos dinoflagelados, na *L. polyedrum* este número já foi descrito com 163 (SOUSA; RIVAS-CARBALLO; PAIS, 1999).

Com relação ao citoplasma da célula de *L. polyedrum*, nele estão contidos cloroplastos, vacúolos, complexo de Golgi, mitocôndrias, microcorpos e reservas alimentares. As reservas são principalmente óleo e amido (HOLM-HANSEN, 1969).

A espécie produz cistos esféricos com numerosos espinhos de morfologia variável conforme o observado na Figura 5.

Figura 5 - Microscopia eletrônica de varredura da célula de *L. polyedrum* com teca e em fase cística.

1: Visão ventral da célula de 50 µm; 2: Visão da célula tecada; 3: Epiteca; 4: Hipoteca; 5: Divisão celular, mostrando a distribuição de placas; 6: Cisto com espinhos muito curtos; 7: Cisto com espinhos pequenos e 8: Cisto com espinhos grandes (LEWIS; HALLETT, 1997).

1.2.1.3. Capacidade fotossintética

Recentemente, dados de seqüências nucleotídicas têm sido utilizados para evidenciar que, ao longo da evolução, os dinoflagelados sofreram numerosas perdas de capacidade fotossintética (LEWIS; HALLETT, 1987). Porém, não há nenhum tipo de controvérsia quanto à característica dos cloroplastos presentes nas diferentes espécies de dinoflagelados. Cada célula de *L. polyedrum* contém numerosos cloroplastos, com 2 a 3 tilacóides por banda e envoltório constituído por 3 membranas, sendo a mais externa do retículo endoplasmático.

1.3. Poluentes orgânicos — Presença nos oceanos

Os compostos que levam a contaminação das águas incluem um amplo espectro de produtos químicos orgânicos. A poluição orgânica muda ambientes costeiros marinhos em ambas as regiões, metropolitanas ou rurais (BICEGO; WEBER; Ito, 1996).

1.3.1. Contaminação marinha – Litoral brasileiro

As fontes de contaminação podem ser de origem industrial, agrícola ou doméstica. No esgoto doméstico prevalecem poluentes não-degradáveis, de particulados orgânicos, detergentes, coliformes fecais e surfactantes. Independente da fonte, os contaminantes atingem o mar e acumulam-se em sedimentos ou são levados por correntezas. Em áreas de estuário, estes processos de dispersão dos

poluentes se agravam, juntamente com o aumento da atividade industrial, como o que ocorre no litoral paulista brasileiro (CETESB, 2009).

Sistemas estuarinos podem se distinguir dos demais pela sua alta produtividade biológica costeira que apresenta ecossistemas de valor econômico, possuindo uma intensa atividade humana que permite capacitar às alterações das funções e propriedades naturais deste vasto meio marinho. A otimização dos usos múltiplos nas zonas costeiras exige a adaptação de interesses contidos dentro de um quadro regulamentar que assegure uma degradação muito menor, ou reversível, e que conservem sempre os recursos marinhos (BICEGO; WEBER; Ito, 1996).

Uma vez que esta ação de preservação exige um grande número de variáveis, bem como sejam levados em conta os processos de interação, qualquer decisão de gestão enfrenta uma avaliação de problemas complexos. Tentando por em prática estas ações, o monitoramento das áreas de alto risco é realizado periodicamente, inclusive no litoral brasileiro (ARFI; PATRITI, 1997).

Na Bacia Hidrográfica de Santos constitui-se uma área de transição entre o litoral norte, com planície costeira muito estreita e o litoral sul, com planície mais desenvolvida, formada por deposição marinha. As ilhas dessa unidade juntamente com as do litoral sul, são predominantemente sedimentares. É a mais urbanizada e populosa das três sub-unidades do litoral paulista. Possui 2.402 km² de área, entre os nove municípios que a compõem (CETESB, 2009).

A atividade industrial é intensa na região, principalmente nos municípios de Cubatão, Santos e Guarujá. Essas atividades representam risco permanente tanto para o solo quanto para a água e o ar, afetando todo o ambiente e a qualidade de vida dessa região. Além da atividade industrial, devem ser destacadas aquelas geradas pelo Porto de Santos, o maior do Brasil. Diariamente inúmeros navios

carregam e descarregam produtos oriundos de vários países, como matérias-primas e produtos industrializados que originam a atividade de tancagem, juntamente com as demais atividades marítimas realizadas no porto. Toda esta movimentação favorece a ocorrência de acidentes ambientais, como derramamento de produtos químicos, por exemplo. Para que haja a manutenção das atividades do porto, há a necessidade de dragagem periódica dos canais de navegação, removendo solo do fundo do mar e dispersando contaminantes que estavam sedimentados.

Tudo isso, associado ao fato de que esses municípios recebem grande quantidade de banhistas para temporada, faz com que apresentem os piores índices de balneabilidade do litoral paulista (principalmente, Santos, São Vicente e Praia Grande). Portanto, desde 1996 é realizado o gerenciamento da qualidade da água da Bacia de Santos, atendendo aos requisitos ambientais. Tais cuidados são necessários em decorrência do acúmulo histórico de contaminantes em certas zonas de sedimentação do estuário. Estudos realizados na área concluíram que a ocorrência de substâncias químicas já não têm sido detectada com frequência na água, mas principalmente no sedimento e nos organismos que vivem no canal (sobretudo os crustáceos e moluscos); como esses animais são consumidos pelo ser humano, é necessário especial atenção ao assunto (CETESB, 2009).

Buscando especificar a composição tóxica das águas na região foram publicados diversos trabalhos que mensuram tanto o teor dos contaminantes na água como em animais ou sedimentos. Na Tabela 2 estão listados alguns dos resultados analíticos na água da Bacia Hidrográfica de Santos baseados em dois trabalhos distintos (AGUIAR; BRAGA, 2007; FIORI, 2007), realizados entre os anos de 2006 e 2007. Os valores registrados referem-se aos máximos e mínimos obtidos na região.

Tabela 2 - Parâmetros da água do mar na Bacia de Santos analisados nos anos de 2006/7.

Bacia de Santos	T (C°)	Sal (UPS)	O.D. (mL.L ⁻¹)	O₂ (%)	pH	SS (mg.L ⁻¹)	MOD (mg.L ⁻¹)	Clor. a (µg.L ⁻¹)	FID (µM)
Mínimo	18	29	3.3	73	8.0	43	32	0	19.9
Máximo	28	34	6.5	144	8.4	68	216	404	396

T = Temperatura; Sal = Salinidade; O.D.= Oxigênio Dissolvido; O₂ = Oxigênio Saturado; SS = Sólidos Suspensos; MOD = Matéria orgânica dissolvida; Clor. a = Clorofila a livre e FID = Fosfato Inorgânico Dissolvido.

Adaptado de (AGUIAR; BRAGA, 2007; FIORI, 2007).

Os dados expressos na Tabela 2 foram coletados nas sazonalidades do inverno e verão, por esse motivo as temperaturas máximas e mínimas possuem uma alta variação de 10°C. A salinidade permanece com valores próximos, em especial proximidade o pH.

Além das análises descritas acima, são realizados estudos de quantificações de espécies químicas específicas como: metais pesados, organoclorados, praguicidas, derivados de petróleo e de compostos fenólicos. O fenol possui especial atenção por ser um composto químico que pode ser resultado da degradação ou oxidação de outros compostos orgânicos aromáticos como, por exemplo, o benzeno (Zagatto, 2008). Alguns dados referentes à contaminação por metais pesados e benzo(a)pireno dos sedimentos dragados da margem esquerda do Porto de Santos no ano de 1995 por Jaagumagi e Persaud estão listados na Tabela 3.

Tabela 3 - Contaminações por metais pesados e benzo(a)pireno em sedimentos da Bacia Hidrográfica de Santos.

<i>Chumbo</i>	<i>Cromo</i>	<i>Mercúrio</i>	<i>Níquel</i>	<i>Zinco</i>	<i>Benzo(a)pireno</i>
66 mg.Kg ⁻¹	170 mg.Kg ⁻¹	0,2 mg.Kg ⁻¹	100 mg.Kg ⁻¹	200 mg.Kg ⁻¹	110 µg.Kg ⁻¹

Fonte: Jaagumagi e Persaud, 1995.

1.3.2. O contaminante fenol

Compostos que possuem um grupo hidroxila diretamente ligado a um anel benzênico são chamados de fenóis. Assim, o fenol é o nome específico para o hidroxibenzeno e é o nome geral para a família de compostos derivados do hidroxibenzeno.

Desta forma o fenol é um composto orgânico de seis átomos de carbono que possui um grupamento hidroxila ligado ao carbono sp^2 aromático (Figura 6), o que lhe compete as propriedades físico-químicas listadas na Tabela 4.

Figura 6 - Estrutura molecular do Fenol.

1.3.2.1. Propriedades físico-químicas

A presença de grupamento hidroxila na molécula de fenol confere semelhanças de propriedades com os alcoóis. Sua capacidade de perda de hidrogênio faz com que os fenóis e os álcoois sejam associados, possuindo portanto, pontos de ebulição (p. e.) mais elevados do que os hidrocarbonetos de peso molecular igual. Por exemplo, o fenol (p.e. 182°C), possui um ponto de ebulição superior a 70°C , mais alto do que o tolueno (p.e. $110,6^{\circ}\text{C}$), apesar dos dois compostos possuírem quase o mesmo peso molecular. A Tabela 4 descreve outras importantes propriedades físico-químicas e ambientais do fenol.

Tabela 4 - Propriedades Físico-Químicas e Ambientais do fenol.

Peso molecular 94,11	Ponto de ebulição 181,8 °C	Ponto de fusão 42 a 43 °C
Temperatura crítica 421,1 °C	Pressão crítica 60,5 atm	Pressão de vapor 0,001 atm
Calor de combustão - 7445 cal.g ⁻¹	Viscosidade 7,90 cP	pH 5 em [50g.L ⁻¹]
Constante de equilíbrio - pKa 9,89		Coeficiente de partição - Log P 1,46
Densidade relativa do líquido 1,058 à 41 °C		Solubilidade na água 8,4 g.100 mL ⁻¹ à 20°C
Degradabilidade Biodegradável (72% da demanda teórica de oxigênio após 2 dias de incubação em ensaio de DBO).		
Demanda Bioquímica de oxigênio (DBO) 200%		
Toxicidade – limites e padrões no ar L.P.O.– Limite de Percepção Olfativa = 0,05 ppm I.P.V.S.– Imediatamente Perigoso à Vida ou à Saúde = 250 ppm L.T.m Brasil – Limite de Tolerância médio de 48 h = 4 ppm L.T. Brasil – Limite de Tolerância teto = 8 ppm L.T. EUA (TWA) – Limite de exposição prolongada = 5 ppm (pele)		

O peso molecular do fenol é 94,11 e os espectros de massa / carga (m/z) deste composto sempre apresentam um pico de íon molecular proeminente M^{+} . Os fenóis que possuem um hidrogênio benzílico produzem um pico $M^{+} - 1$ que pode ser maior que o pico M^{+} (SILVERSTEIN, 1994).

A capacidade de formar fortes ligações de hidrogênio com as moléculas de água confere ao fenol uma considerável solubilidade em água, como o observado na Tabela 4, onde o pKa do fenol é igual a 9,89. Outra característica importante é o seu coeficiente de partição octanol/água igual a 1,46. Um detalhe significativo referente à solubilidade do fenol é que mesmo em água do mar 27 % salina

(utilizada nos cultivos deste trabalho) a solubilidade permanece alta, muito próxima a taxa de água não salina sob os 20°C também utilizados.

O fenol está presente em efluentes de indústrias de gaseificação de carvão, produção de coque, farmacêutica, praguicidas, fertilizantes, refinarias, siderúrgicas, indústrias de cerâmicas e de resinas fenólicas, produção de tintas, química sintética, polpa de papel, entre inúmeras outras, sendo considerado como um dos principais poluentes do meio ambiente pelas agências de proteção ambiental de vários países.

1.3.2.2. Síntese Industrial do fenol

O fenol é um composto químico industrial muito importante, que serve de matéria-prima para vários produtos comerciais, desde a aspirina (ácido acetil salicílico) à uma variedade de plásticos (polímeros). A produção mundial do fenol é maior que 5 milhões de toneladas por ano. Apenas no estado de São Paulo são produzidas 245.000 toneladas ao ano (LINDENHAYN, 2010). Vários métodos têm sido usados para sintetizar o fenol comercialmente (SOLOMONS, 2001), todos geradores de resíduos tóxicos.

1.3.2.3. A força dos fenóis como ácidos

Apesar dos fenóis serem estruturalmente semelhantes aos álcoois, são ácidos muito mais fortes. Os valores de pka da maioria dos álcoois são da ordem de

18. Contudo, conforme podemos verificar na Tabela 4 de propriedades do fenol, o valor de seu pK_a é menor que 11 (SILVERSTEIN, 1994).

Resultados experimentais e teóricos mostram que a maior acidez dos fenóis em geral com relação aos álcoois é devida, principalmente, a uma distribuição de carga elétrica no fenol que faz com que o oxigênio do $-OH$ seja mais positivo; portanto, o próton H^+ está ligado com menos força. De fato, o anel benzênico do fenol atua como se fosse um grupo retirante de elétrons quando comparado, por exemplo, com o anel de um ciclohexano que compõe o ciclohexanol. É possível compreender este efeito observando que o átomo de carbono que carrega o grupo hidroxila no fenol está hibridizado em sp^2 , enquanto no cicloexano ele está hibridizado em sp^3 . Devido ao seu caráter mais acentuado em orbital s , os átomos de carbono hibridizados em sp^2 são mais eletronegativos que os átomos de carbono hibridizados em sp^3 (VOGEL; JEFFERY, 1992).

Outro fator que influi na distribuição dos elétrons pode ser as contribuições ao híbrido da ressonância global do fenol, feitas pelas estruturas **2**, **3** e **4** da Figura 7. Observa-se que o efeito dessas estruturas é de retirar os elétrons do grupamento hidroxila e tornar o oxigênio positivo (SIGGLE; THOMAS, 1986). Naturalmente, por possuir apenas carbonos saturados, nenhuma estrutura de ressonância pode ser descrita para o cicloexano ou seus ânios.

Figura 7 - Ressonância global do fenol.

Outra explicação alternativa para a maior acidez do fenol, com relação ao cicloexanol, pode basear-se nas estruturas de ressonância semelhantes para o íon fenóxido. Diferentes das estruturas para o fenol, as estruturas de ressonância para o íon fenóxido (**2**, **3** e **4**) não envolvem a separação de carga. De acordo com a teoria de ressonância, tais estruturas deveriam estabilizar o íon fenóxido **2**, **3** e **4** mais do que essas estruturas estabilizam o fenol. A maior estabilização do íon fenóxido que do fenol, possui um efeito de aumentar a acidez (SIGGLE; STREITWIESER; THOMAS, 1988).

Este aspecto ácido do fenol enfatiza seu poder reativo, já que o oxigênio pode perder o próton e ganhar poder oxidativo em relação a outras moléculas.

1.3.2.4. Concentrações limites de fenol

No Brasil, os padrões de qualidade de água estabelecem concentrações de fenol de até $3 \mu\text{g.L}^{-1}$ para águas de classe I (destinadas ao abastecimento para consumo humano, com desinfecção; à preservação do equilíbrio natural das comunidades aquáticas; e à preservação dos ambientes aquáticos em unidades de conservação de proteção integral). Os padrões de emissão correspondem a valores de $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ (CONAMA, 2005). Outros valores limites para o fenol expressos na resolução CONAMA estão listados na Tabela 5.

Tabela 5 - Limites máximos de concentrações do fenol em águas estabelecidos pela resolução 357/05 do CONAMA.

<i>Águas</i>	<i>Classe</i>	<i>Limite máximo de fenol</i> (reação com 4-aminoantipirina)
Doces	I	0,003 mg.L ⁻¹
	III	0,01 mg.L ⁻¹
Salinas	I	60 µg.L ⁻¹
Salobras	I	0,003 mg.L ⁻¹
Lançamento de efluentes	—	0,5 mg.L ⁻¹

Embora sendo biodegradável tanto por via aeróbia como anaeróbia, o fenol é tóxico para a maioria dos microrganismos, principalmente não aclimatados, em concentração de apenas 10 mg L⁻¹, podendo ser inibidor do crescimento mesmo para as espécies que possuem atividade metabólica usando-o como substrato, por gerar metabólitos de maior toxicidade, causando problemas em estações de tratamento de efluentes (SANTOS; LINARDI, 2004; TAY; HE; YAN, 2001; PASSOS et al, 2009).

A utilização de um padrão conhecido de poluente, no caso o fenol, permite a especificação de resultante ao meio contaminado, tornando possível a visualização de prováveis efeitos causados por derramamentos deste material e de compostos que o derivem no meio marinho. Em se tratando das características físico-químicas do fenol, alta polaridade, boa solubilidade em água e capacidade de absorção pela parede celular, este composto quando assimilado pelo organismo, pode ser metabolizado por vias que utilizam enzimas como a fenol monooxigenase, derivando o catecol e posteriormente hidroquinona, que é biodegradada até CO₂ e H₂O no ciclo de Krebs. Algas como a *Ochromonas danica*, *Chlorella pyrenoidosa* e *Scenedesmus sp* foram estudadas detectando-se o metabolismo do fenol e as

concentrações em que ocorre a intoxicação, atingindo doses letais (ARFI; PATRITI, 1997).

Os testes dos processos de avaliação da toxicidade do fenol são realizados em diversos meios e condições: no ar, por via inalatória ou contato dérmico e em exposição aguda ou crônica. E em diversos organismos: bactérias, fungos, ratos e camundongos. Dentre todos estes estudos e resultados, destacam-se os ecotoxicológicos (voltados à preservação ambiental) de efeitos do fenol sobre organismos aquáticos (CETESB, 2008), valores que estão expressos na Tabela 6.

Tabela 6 - Toxicidade do fenol para organismos aquáticos. Fonte: Adaptado de DeLorenzo, 2009.

Organismo	Espécie	Parâmetro	Valor (mg . L ⁻¹)
ALGAS	<i>Microcystis aeruginosa</i>	L.Tox (T.I.M.C.)	4,6
	<i>Scenedesmus quadricauda</i>		7,5
	<i>Chlorella pyrenoidosa</i>		233
PEIXES	<i>Lepomis macrochirus</i>	TLm	19
	<i>Carassius auratus</i>		44,5 *
CRUSTÁCEOS	<i>Daphnia pulex</i>	CL₅₀	16
	<i>Crangon crangon</i>		40
	<i>Artemia salina</i>		68

L.Tox (T.I.M.C.) = Limite de Toxicidade (Teste de Inibição da Multiplicação Celular) – 24 h.

TLm – 50% dos organismos testados mostraram comportamento anormal.

CL₅₀ – Concentração Letal 50% - 24 h.

* 48 h.

Observa-se na Tabela 6 que as duas espécies de algas, *Microcystis aeruginosa* e *Scenedesmus quadricauda* possuem uma maior sensibilidade a baixas concentrações de fenol, sendo capaz de reduzir seu crescimento em 50 %. Os crustáceos também apresentam sensibilidade elevada, atingindo valores letais sob exposição a pequenas concentrações de fenol.

A taxa de toxicidade do fenol aos organismos aquáticos é na faixa de: TLm (50% dos organismos testados mostraram comportamento anormal em 96 h) = 10 ppm – 100 ppm.

1.4. Biotransformação do fenol

Um dos mecanismos de geração do fenol é por biotransformação do benzeno através do Citocromo P450 2E1, e talvez outros citocromos P450, produzindo o fenol, como segue o esquema da Figura 8, que demonstra as possibilidades de biotransformação dos xenobióticos e exemplifica o caso do benzeno oxidado à fenol, sendo na Fase II, sulfatado através da catálise da fenol sulfotransferase para facilitar a excreção. Estes processos de detoxificação ocorrem em diversos organismos portadores de complexos enzimáticos capazes de realizar algumas das etapas abaixo (ALCOCK *et al.*, 1998).

Figura 8 - Metabolismo de xenobióticos.

Diversos mecanismos de metabolização do fenol já foram elucidados e alguns serão relatados no próximo item 1.4.1..

1.4.1. Vias de metabolismo estabelecidas

Campos (2008) investigou a biotransformação do fenol pela microalga *Minutocellus polymorphus*. Como resultado, o trabalho demonstrou que a possível via metabólica para o fenol é a da Figura 9 que ilustra o catecol sendo oxidado pela enzima catecol 2,3-dioxigenase e biotransformado em piruvato.

Figura 9 - Biotransformação do fenol pela microalga *Minutocellus polymorphus* (CAMPOS, 2008).

As possíveis vias de metabolismo enzimático (não catalisadas por citocromos) do fenol estão representadas na Figura 10, segundo Snyder, 1996 e Powley, 2001.

Figura 10 - Rotas completas de biodegradação enzimática do Fenol.

A Figura 10 ilustra que o fenol pode ser hidroxilado via catálise da fenol hidroxilase, para formar a hidroquinona ou o 1,2-dihidroxibenzeno (catecol) que por sua vez pode ser oxidado via catecol 1,2 ou 2,3-dioxigenase. Conforme o produto gerado na primeira etapa de hidroxilação e dioxigenação, as vias metabólicas seguem similares, obtendo por resultante o piruvato e acetaldeído ou acetil-coenzima A e succinato que terminam como integrantes do ciclo do ácido tricarboxílico e geradores de CO₂ e água.

As reações de acoplamento oxidativo também resultam na destoxificação de contaminantes fenólicos e podem ser catalisadas por uma série de citocromos P450 (ZERBE *et al.*, 2004). Outra forma de metabolismo do fenol investigada é a reação de conjugação com a glutatona em estado reduzido (GSH), catalisada pela Glutathione S-transferase (JAMES, et al, 1988), como o representado no esquema da Figura 11.

Figura 11 - Esquema de conjugação com GSH.

Os substratos da Glutathione S-transferase são compostos eletrófilos resultantes, em geral, de reações da Fase I. Caso que pode ocorrer com metabólitos do fenol, como o 2-hidroximucônico semialdeído (KLECKA; GIBSON, 1981).

O sistema glutathione S-transferase consiste em um grupo de isoenzimas que conjugam a GSH a compostos eletrofílicos (WILCE; PARKER, 1994). As células com uma atividade aumentada de glutathione S-transferase possivelmente caracterizam a atuação do mecanismo de detoxificação por conjugação com GSH.

A glutathione pode encontrar-se na forma reduzida (GSH) ou oxidada (GSSG, forma dimerizada da GSH) e é caracterizada por ser um tripéptido linear, constituído por três aminoácidos: ácido glutâmico, cisteína e glicina, sendo o grupo tiol da cisteína o local ativo responsável pelas suas propriedades bioquímicas (LEAHY; COLWELL, 1990).

1.5. Geração de espécies reativas de oxigênio induzida por xenobióticos

Ao serem biotransformados (Figura 12) ou por Fase I (com oxidações e biodegradação desempenhadas pelos Citocromos P450 diversos, entre outros complexos enzimáticos) ou por Fase II (conjugação com glutathione e demais mecanismos), os xenobióticos geram espécies químicas, em geral reativas, denominadas radicais livres.

O termo radical livre é frequentemente usado para designar qualquer átomo ou molécula com existência independente, contendo um ou mais elétrons não pareados, nos orbitais externos (DRÖGE, 2002). Biologicamente, são átomos ou moléculas produzidas continuamente durante os processos metabólicos e atuam como mediadores para a transferência de elétrons em várias reações bioquímicas, desempenhando funções relevantes no metabolismo (WILCE; PARKER, 1994).

A produção excessiva de radicais livres pode conduzir a diversas formas de dano celular, como o esquema da Figura 12 ilustra. O metabolismo pode gerar diferentes moléculas reativas, dentre elas estão as espécies reativas de oxigênio (ERO) como, por exemplo, o oxigênio singlete ($^1\Delta_g\text{O}_2$) ou o radical ânion superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$), de acordo com Halliwell (1987).

Figura 12 - Danos celulares causados por estresse oxidativo originado da metabolização de xenobióticos. Adaptado de Boelsterli (2003).

1.5.1. Componentes biológicos de função antioxidante

Para se defender das espécies reativas de oxigênio e de outros radicais livres (como NO_x), as células aeróbicas desenvolveram vários mecanismos antioxidantes. Antioxidante é qualquer substância que, quando presente em baixa concentração, comparada à do substrato oxidável, regenera o substrato ou previne significativamente a oxidação do mesmo (HALLIWELL, 1995).

Os antioxidantes agem enzimaticamente, a exemplo da superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione peroxidase (GPx), ou, não enzimaticamente a exemplo do sistema GSH/GSSG, peptídeos de histidina, proteínas ligadas ao ferro (transferrina e ferritina), ácido diidrolipóico, α -tocoferol (vitamina “E”), β -caroteno (provitamina “A”), ácido ascórbico (vitamina “C”) e vários compostos orgânicos, onde se destacam os flavonóides e poliflavonóides (HALLIWELL, 1995).

Em se tratando das defesas antioxidantes não enzimáticas, a importância do sistema glutathione é tal que a razão GSH/GSSG vem sendo largamente utilizada para estimar o estado redox (potencial de oxidação/redução) dos sistemas biológicos. Em situações normais a GSSG representa apenas uma pequena fração da glutathione total (menos de 10%) (FERREIRA ; MATSUBARA, 1997). A microalga *Lingulodinium polyedrum* teve seus níveis da razão GSH/GSSG alterados quando cultivada em laboratório (Leitão *et al.*, 2003) e em condições de exposição ao cobre, assim como outras microalgas também sofreram essa alteração, o que confirma estresse oxidativo induzido por contaminantes (MALLICK, 2004).

Das defesas enzimáticas, a enzima antioxidante superóxido dismutase compreende duas formas: citoplasmática (SOD1) - Cu/Zn e a mitocondrial (SOD2) - Mn. A enzima SOD catalisa a dismutação do ânion superóxido em O_2 e H_2O_2 , que

pode ser posteriormente degradado por peroxidases (a exemplo a ascorbato peroxidase — APx e a glutatona peroxidase — GPx) (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007), segundo reações na Figura 13.

Figura 13 - Reações enzimáticas antioxidantes.

Diversos estudos sobre a atividade da SOD são relatados em algas sob condições fisiológicas normais devido a sua extrema importância no metabolismo de detoxificação de ERO. A atividade da SOD sofre variações circadianas, como foi mostrado na microalga *L. polyedrum*, assim como variações, determinadas por Walsh e colaboradores (1988), ao longo da fase exponencial e estacionária de crescimento da microalga *Minutocellus polymorphus*. Os mecanismos regulatórios de expressão da SOD em diferentes dinoflagelados também já foram descritos por Okamoto e colaboradores (2001). Induções de atividade das enzimas CAT e APx também foram demonstradas na alga *Kappaphycus alvarezii* tratada com clofibrato (BARROS *et al.*, 2003).

Existem outras defesas antioxidantes não enzimáticas biossintetizadas em algas e plantas superiores, como os carotenóides que são efetivos seqüestradores da maioria dos radicais livres, em razão da sua cadeia de polienos

constituir uma ampla classe de tetraterpenos insaturados e podendo ter suas concentrações reduzidas em caso de contaminações agudas ou crônicas, contribuindo para uma situação de estresse oxidativo (PINTO *et al.*, 2000; OKAMOTO *et al.*, 1996; COLEPICOLO *et al.*, 1992).

Perante todo o contexto apresentado, justifica-se a necessidade de estudar as alterações no sistema antioxidante da microalga marinha *L. polyedrum* e sua capacidade de biotransformação de xenobióticos frente concentrações de fenol, composto orgânico de enorme presença e significativas preocupações ambientais, afim de avaliar o comportamento bioquímico da microalga, objetivando adicionar conhecimentos ecotoxicológicos que permitam o emprego de um promissor teste de toxicidade padrão.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Tendo em vista a atual necessidade de entendimento e contenção do impacto gerado sobre os ecossistemas marinhos, o principal objetivo desse trabalho foi: **Estudar os efeitos tóxicos do fenol sobre a microalga *Lingulodinium polyedrum*, enfatizando os processos de biotransformação e atividade antioxidante.**

2.1.1. Objetivos específicos

- ❖ Estabelecimento da Curva de Crescimento da microalga *Lingulodinium polyedrum*;
 - ❖ Determinação da sobrevivência celular da microalga em água de cultivo original da Bacia Hidrográfica de Santos;
 - ❖ Realização de ensaios dose-resposta de toxicidade de fenol sobre cultivos de *L. polyedrum* e determinação das concentrações de inibição de crescimento de 20% e 50 % das células (IC 20 e IC 50);
 - ❖ Avaliação metabólica: observação dos níveis de fenol intracelular em concentração de exposição maior ou igual à IC 50 e identificação dos metabólitos, com acompanhamento do processo de biotransformação na Fase II da atividade enzimática de Glutathione S-transferase;
 - ❖ Avaliação das defesas da microalga em contato com o fenol. Análises de atividade enzimática antioxidante da: superóxido dismutase, catalase e ascorbato peroxidase. Avaliação da razão GHS/GSSG;
 - ❖ Avaliação da capacidade de fotossíntese da microalga na presença de fenol.
-

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Cultivos Celulares

3.1.1. Manutenção dos cultivos

Células de *Lingulodinium polyedrum* foram cultivadas em meio Guillard f/2 (Anexo I) à 20 °C, durante períodos alternados de 12 horas de iluminação branca (GUILLARD; RYTHER, 1962). Os cultivos foram mantidos em câmara de germinação com fotoperíodo de marca Tecnal[®] e modelo TE-4001(Figura 14), com intensidade de luz mensurada pelo Luxímetro-Fotômetro Digital Portátil LDR-225 ($50 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$).

Figura 14 - Fotografia dos cultivos de *Lingulodinium polyedrum* na incubadora.

Na prateleira de cima e da esquerda para a direita, o primeiro frasco corresponde a um cultivo de 7 dias e aproximadamente 4×10^3 células.mL⁻¹. E ao seu lado está um cultivo com 2 dias e aproximadamente $1,8 \times 10^3$ células.mL⁻¹.

3.1.2. Curvas de crescimento

Estabeleceu-se a curva de crescimento celular realizando-a em triplicata nos frascos de erlenmeyer com capacidade de 2 Litros, partindo inicialmente de uma densidade celular igual a 1×10^3 células.mL⁻¹ (COLEPICOLO et al, 1992; Leitão *et al.*, 2003). Até o fim dos nutrientes e morte celular dos cultivos, foram retiradas amostras diárias de 1 mL que foram analisadas conforme o crescimento celular por contagem realizada em Câmara de Neubauer Improved® (valor de contagem multiplicado pelo fator de diluição das amostras, segundo WMED Oligos (2009)) no microscópio óptico de marca Nikon®, modelo E200 e por espectrofotômetro de UV-Visível da Shimadzu® modelo UV-2450, no comprimento de onda de 680 nm.

O aumento dos valores de absorbância no espectrofotômetro compõe uma ferramenta indireta de medição do crescimento celular (já que o comprimento de onda de 680 nm é padrão para análises de células), que foi correlacionado com as contagens por microscopia, a fim de facilitar a utilização do espectrofotômetro como indicador de crescimento ideal para replicação dos cultivos.

Porém, a contagem em microscópio foi sempre a medida do crescimento celular tomada como exata e reproduzida para todos os experimentos de dose-resposta, porque através da curva de crescimento em microscópio que foi possível identificar o perfil de crescimento da microalga e estabelecer o dia ideal para a exposição ao poluente fenol.

3.1.3. Determinação da sobrevivência celular em água de cultivo original da Bacia Hidrográfica de Santos

Foi coletada água da Bacia de Santos para teste de viabilidade de cultivo da *L. polyedrum* e os pontos de coletas são apresentados na Figura 15:

Figura 15 - Pontos de coleta de água do mar da Bacia de Santos-SP.

Foram coletadas duas amostras denominadas **A** (atrás da Ilha de Palmas) e **F** (frente à Ilha de Palmas), de latitudes e longitudes respectivamente correspondentes a: **A** = -24° 0' 30.33", -46° 19' 39.62" e **F** = -23° 59' 28.70", -46° 19' 09.92". A profundidade de coleta variou de 8 à 15 metros.

Os cultivos foram testados na água do mar de Santos (filtrada e autoclavada) da seguinte maneira: 80% água do mar já utilizada (original da Bacia Hidrográfica de São Sebastião) e 20 % água do mar de Santos, e as proporções

foram sendo alternadas a cada nova replicação (período de aclimação em torno de 20 à 24 dias) até se utilizar 100% da água do mar de Santos.

Análises à disposição foram utilizadas para uma prévia avaliação da composição da água amostrada: determinação instrumental de pH (pHmetro Tectnal[®] TEC-3MP), condutividade (condutímetro Tecnal[®] TEC-4MP), oxigênio dissolvido (O.D.) (oxímetro Digimed[®] DM-4P), turbidez (turbidímetro Tecnal[®] TB-1000) e quantidade de carbono orgânico total (TOC Thermo[®]); metodologias retiradas do Standard Methods (2005) para análises fotométricas de cloretos e fenóis totais; demanda química de oxigênio (DQO) e análises de sólidos dissolvidos totais (SDT).

3.2. Cromatografia das amostras para análises qualitativas e quantitativas de fenol

3.2.1. Curvas de Calibração

As soluções padrões foram preparadas com fenol (Merck[®]), água MiliQ[®] e no caso das amostras injetadas no cromatógrafo à gás (CG — onde a cromatografia deve ser isenta de água) foi utilizado clorofórmio (Vetec[®]) como solvente. Partindo das soluções iniciais de fenol com concentração de 10 mmol.L⁻¹ em água e em clorofórmio, foram preparadas as diluições nas concentrações correspondentes aos pontos das curvas de calibração de 0,05 a 1,0 mmol.L⁻¹. Para injeção no cromatógrafo gasoso a etapa de extração líquido-líquido necessária foi realizada com a adição de clorofórmio 2:1 e após 2 minutos de agitação em vórtex a fase orgânica foi recuperada (CRISTINA *et al.*, 2009).

3.2.1.1. Equipamentos e condições cromatográficas

As curvas de calibração para detecção do fenol e seus metabólitos foram desenvolvidas nos equipamentos:

- ❖ Cromatógrafo Gasoso (CG) de marca Varian[®], modelo 3800, injetor automático CP8400, coluna 5 MS (95% polifenil siloxano e 5% fenil), fase móvel composta por gás Hélio e detector de massas (MS) ion trap de modelo Saturn 2200.
- ❖ Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência (CLAE) de marca Shimadzu[®], modelo UFLC, injetor automático, coluna C18, fase móvel composta por acetonitrila/H₂O e detector de UV-VIS no comprimento de onda de 254nm.

As condições de injeção das amostras nos equipamentos foram:

- ❖ Rampa de temperatura do CG = injeção em 250 °C; temperatura inicial do forno de 50 °C durante 5 minutos; acréscimo de 10,75°C por minuto até atingir 280°C em um tempo total de corrida de 26 minutos.
- ❖ Gradiente de fase móvel do CLAE — Ultrapuro e P.A.:

Fase móvel A = Água contendo 0,2% de ácido fórmico.

Fase móvel B = Acetonitrila contendo 0,2% de ácido acético.

Gradiente de fase móvel, de 0 a 3 min. concentração de Fase B = 22%; de 3 a 15 min. 62% e de 15 a 17 min. retornando a 22%, em um tempo total de corrida de 17 min., com a temperatura da coluna a 35°C (THAKUR; VENNA; UPADHAYAYA, 2002).

3.2.2. Preparação das amostras

3.2.2.1. Quantificação do fenol no meio de cultivo

Amostras de 1 mL foram coletadas do meio de cultivo, filtradas em milipore de 0,22 μm para a retirada das células e injetadas no CLAE para quantificação da concentração de fenol. O branco, contendo meio e fenol, ausente de células também foi utilizado para garantir a comprovação da permanência do fenol nos experimentos.

3.2.2.2. Quantificação do fenol intracelular

As células (4×10^3 células. mL^{-1}) com 8 e 24h de exposição ao fenol ($0,12 \text{ mmol.L}^{-1}$) foram separadas do meio de cultivo por filtração em membrana, pesadas em aproximadamente 50 mg e sofreram lise celular por sonicação (no Ultrassom - Q335D de marca Quimis[®]) em solução 60%/40% volume de água/acetonitrila (Ultrapuro Sigma-Aldrich[®]) para possibilitar a injeção no CLAE (conforme condições analíticas já descritas no item 3.2.1.1.) do conteúdo intracelular dissolvido, a fim de detecção do fenol absorvido pelas células.

3.2.2.3. Identificação dos metabólitos de fenol

O preparo das amostras para estudo de biotransformação difere do item 3.2.2.2. na análise instrumental que foi realizada no CG-EM (em coluna SPB-20 que é adequada para detecção de compostos mais polares, como ácidos carboxílicos, que são metabólitos esperados para a via de biotransformação do fenol) e por isso utilizou clorofórmio como solvente extrator no processo de sonicação e a água residual do cultivo foi retirada com sal anidro de sulfato de sódio (Vetec[®]).

3.3. Avaliação Metabólica — Ensaios dose-resposta de inibição do crescimento celular

Ensaios dose-resposta de toxicidade de fenol sobre cultivos de *L. polyedrum* e determinação estatística das concentrações de inibição de crescimento (OECD, 1987) de 20% e 50 % das células (U. S. EPA, 1971; 2007 — IC 20 e IC 50 que são as porcentagens de inibição do crescimento e são recomendadas para determinar os efeitos dos organismos perante as concentrações do poluente em estudo) foram realizados com concentrações conhecidas de fenol (de 0,05 a 1,0 mmol.L⁻¹ — ou de 4,8 a 94 mg.L⁻¹) adicionadas aos cultivos com densidade de aproximadamente 4 x 10³ células.mL⁻¹ e os efeitos de indução da fase cística e crescimento celular foram observados após 24 horas por microscopia óptica (HEASMAN, 2000) adicionando-se gotas do corante Azul de Evan's (Sigma-Aldrich®) na placa de contagem celular, para determinação da viabilidade célula. Este corante é capaz de infiltrar-se na parede celular danificada (corando a matéria orgânica em decomposição), revelando a coloração azul apenas nas células não saudáveis, que não são consideradas na contagem numérica para o crescimento celular. Os testes foram realizados em triplicata de cultivos e de amostras de 1 mL, utilizando controle (células sem exposição) e branco (meio sem células).

As concentrações de fenol no meio de cultivo foram determinadas via CLAE, por método padronizado pela curva de calibração e descrito no item 3.2., não foi necessário adicionar padrão interno nas amostras porque as concentrações pretendidas foram quantificadas adequadamente pelo equipamento, recuperando, de 98 à 102 % do fenol diluído em cultivo no início dos ensaios. Com base no

desaparecimento do fenol no meio de cultivo celular, foram executados testes de consumo de fenol pela taxa de crescimento celular, utilizando o valor de IC 50 como concentração inicial de fenol e coletando amostras de 1 mL durante o acompanhamento de 16 horas de exposição. Após 24 horas de exposição ao fenol, os metabólitos encontrados foram identificados via CG-EM como o descrito no componente 3.2.3.3. de preparo das amostras.

3.4. Ensaios enzimáticos — Avaliação da atividade antioxidante e biotransformação de fase II

3.4.1. Preparação dos extratos

Todos os testes de atividade enzimática para a avaliação do estresse oxidativo foram preparados com extratos adquiridos da seguinte maneira: no dia das análises, foram retirados 10 mL de cultivo (7 dias de incubação, com concentração de aproximadamente 4×10^3 células.mL⁻¹ e exposto a 0,10 mmol.L⁻¹ de fenol por 24 horas) e armazenados em tubo falcon de 50 mL, previamente pesado, mantido sob gelo e submetido aos procedimentos divididos nas etapas;

1ª etapa – de Centrifugação – durante 20 minutos em 3500 rpm à 4°C (Centrífuga Refrigerada modelo CT 6000R, Cientec[®]). O meio sobrenadante foi retirado, o tubo pesado novamente e pode-se calcular a massa aproximada da amostra (em média 50 mg). Ao tubo falcon contendo a amostra devidamente pesada adicionou-se o tampão de ressuspensão gelado, que é composto por 100 mmol de fosfato de

sódio com adição de 1 μmol de fluoreto de fenilmetilsulfonila (PMSF) em etanol, atingindo um pH final de 7,4;

2ª etapa – Sonicação – mantendo sobre gelo, 3 vezes de 15 segundos com 15 segundos de intervalo (totalizando 1,5 minutos), utilizando o banho de ultrason (Lavadora Ultrassonica Maxi Clean 1450, Unique[®]);

3ª etapa – Centrifugação final – 20 minutos em 3500 rpm à 4°C (Centrífuga Refrigerada modelo CT 6000R, Cientec[®]). O sobrenadante contém as proteínas a serem submetidas às análises e deve ser utilizado no mesmo momento ou armazenado no freezer.

3.4.2. Quantificação de proteína

Para determinação de proteínas totais em mg, utilizou-se o método Bradford (1976) que utiliza o reagente de Coomassie[®] (cromóforo Brilliant Blue G 250) e albumina de soro bovino (Merck[®]), utilizaram-se cinco alíquotas de (20-100 μL , 0,10 mg.mL^{-1}) em triplicatas, para a construção da curva de calibração do espectrofotômetro. Na cubeta de quartzo de capacidade de 1 mL, foi adicionado 10 μL de amostra, 200 μL de reagente de Bradford e completado o volume com 790 μL de água, realizando a leitura a 595 nm.

3.4.3. Superóxido dismutase (SOD)

A atividade da SOD total é medida indiretamente (MCCORD; FRIDOVICH, 1968), mediante a inibição da redução do citocromo c (Cyt c, Sigma-

Aldrich[®]), onde SOD compete com Cyt c por $O_2^{\bullet-}$, gerado pelo sistema xantina/xantina oxidase (Sigma-Aldrich[®]) representado na Figura 16. A reação é iniciada pela adição de xantina oxidase e a redução de Cyt c é acompanhada no espectrofotômetro a 550 nm.

Figura 16 - Representação da geração de $O_2^{\bullet-}$ no ensaio de atividade da SOD.

O meio de reação na cubeta de 1 mL foi composto por $50 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de xantina, $20 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de citocromo c (Sigma[®]), volumes variados de extrato celular e tampão fosfato $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$, pH 7,8.

Uma unidade de SOD é definida como a quantidade de enzima (volume do extrato das amostras por quantidade de proteína — método Bradford) que é suficiente para inibir 50% da redução de Cyt c a 25°C em pH 7,8. A atividade específica de SOD foi expressa em $\text{U.mg proteína}^{-1}$.

3.4.4. Catalase (CAT)

A atividade da CAT foi feita segundo Aebi (1984), monitorando-se por espectrofotômetro a decomposição de H_2O_2 10 mmol ($\epsilon_{240} = 39,4 \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) durante 100 segundos. A atividade de CAT está relacionada proporcionalmente ao decaimento do peróxido e a quantidade de proteína da amostra, sendo definida como a quantidade de enzima em μmol que catalisa a decomposição de 1 μmol de H_2O_2 por minuto a 30°C em pH 7.0. O ensaio utilizou uma cubeta de quartzo com capacidade para 1 mL, 800 μL de solução de H_2O_2 e foram adicionados a 200 μL de amostra para obtenção da leitura em absorbância de 240 nm acompanhada durante 100 s.

3.4.5. Ascorbato peroxidase (APX)

A determinação da atividade da APX (ASADA, 1984) foi realizada através do monitoramento da oxidação do ascorbato a deidroascorbato na presença de H_2O_2 . O meio de reação foi composto por tampão fosfato de sódio 50 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ pH 7,0; 0,5 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ de ácido ascórbico (Sigma®) e amostra. A reação foi iniciada pela adição de 100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ de H_2O_2 seguindo o decaimento de absorbância em 290 nm por 3 minutos. Controles na oxidação do ascorbato por algum componente da amostra e sua oxidação não enzimática pelo H_2O_2 foram também considerados. Uma unidade de atividade de APX representa a quantidade de enzima necessária para oxidar 1 μmol de ascorbato ($\epsilon_{290} = 2,8 \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) por minuto a 25°C em pH 7,0 e corresponde a $\mu\text{mol} \cdot \text{mg}$ de proteína $^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$.

3.4.6. Glutathione S-transferase (GST)

A determinação de GST (PINTO, 2002; PFLUGMACHER *et al.*, 2000) é proporcionada pelo monitoramento de 30 mmol de 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB, Synth[®]) na presença de 90 mmol de GSH (Sigma[®]) por 60 segundos ($\epsilon_{340} = 9600 \text{ mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$). Uma unidade de GST representa a quantidade de enzima que catalisa o desaparecimento de 1 μmol de CDBN por minuto a 30°C em pH 6,5. A cinética desta reação de conjugação é acompanhada no espectrofotômetro a 340 nm durante 1 minuto e resulta na determinação de atividade da GST em $\mu\text{mol.mg}$ de proteína⁻¹. min.⁻¹.

3.5. Avaliação dos níveis intracelulares da razão

GSH/GSSG

A determinação de GSH e GSSG (ROMANO, 2009) foi obtida através de cromatógrafo líquido acoplado à espectrômetro de massas (CL-EM), da marca Applied Biosystems[®] e espectrômetro de massas do tipo triplo quadrupolo híbrido íon trap linear, modelo 3200 QTrap.

3.5.1. Curva de calibração

Para evitar a oxidação de GSH nas amostras padrão de preparo da curva e das próprias amostras, foi adicionado N-etilmaleimida (1 mol. mL⁻¹) como agente derivatizante, que permitiu garantir a estabilidade química necessária. As curvas

foram preparadas com padrões Sigma-Aldrich[®] com cinco pontos, de 0,05 a 5 µg.mL de GSH e GSSG.

3.5.2. Condições cromatográficas

Utilizou-se coluna C18 (Luna, Phenomenex[®]), fase móvel composta por: Fase móvel **A** utilizada foi água com 5 mM de acetato de amônio e 0,1% de ácido fórmico e Fase móvel **B** constituiu-se de metanol/água (% 65/35 v/v) contendo 5 mM de acetato de amônio e 0,1% de ácido fórmico. O fluxo usado foi de 0,9 mL/min, com gradiente de solventes que atinge 100 de %**B** em 5 minutos, concluindo a corrida em 10 minutos.

3.5.3. Preparação das amostras

As amostras foram injetadas no CL-EM no mesmo solvente da fase móvel **A** (assim como as soluções padrão da curva de calibração) e foram produzidas conforme os mesmos procedimentos de preparo dos extratos descritos no item 3.4.1., exceto pela adição de N-etilmaleimida e aumento no tempo de sonicação. Amostras contaminadas com concentrações conhecidas de GSH e GSSG foram extraídas por este mesmo método de preparo para testar a eficiência desta extração.

3.6. Avaliação da capacidade fotossintética

O desempenho fotossintético pode ser mensurado através do equipamento Diving-PAM (Walz®) que é capaz de emitir pulsos saturantes – Aplicação de pulso de luz com amplitude modulada (PAM), tolera uma razão de sinal de $1:10^5$ entre a fluorescência da amostra e ruído do ambiente, possui ajuste auto-zero, controla a temperatura e intensidade luminosa (variáveis registradas) e permite definir a intensidade de luz actínia incidida na amostra.

Composto por um cabo de fibra óptica (de aproximadamente 10 mm), que foi inserido em tubos do tipo eppendorf contendo 1 mL de amostra dos cultivos (concentração de todas as amostras em torno de 8×10^3 células.mL⁻¹) controle e trato com fenol ($0,12$ mmol.L⁻¹) por 24 h, formando a construção gráfica da taxa de transporte de elétrons (ETR) por energia actínia (PAR).

3.7. Análise estatística

Todos os experimentos foram realizados em triplicata, sendo que para verificar diferenças do grupo tratado em relação ao grupo controle foi utilizada a análise de variância One-Way ANOVA, aceitando-se o nível de 5% de significância ($p < 0,05$).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Cultivos de *Lingulodinium polyedrum*

4.1.1. Curvas de Crescimento

A Figura 17 contém o gráfico com os dados da Curva de Crescimento monitorada por contagem em microscopia óptica:

Figura 17 - Gráfico da Curva de Crescimento celular da *L. polyedrum* por microscopia óptica.

O crescimento foi expresso em escala logarítmica de densidade celular (células . mL⁻¹) e acompanhado todos os 24 dias. A curva proporcionou o perfil de crescimento celular do cultivo da microalga e permitiu a conclusão de que o dias 6 e 7 são os melhores dias para iniciar a exposição ao fenol, pois a densidade celular atinge aproximadamente 4×10^3 células . mL⁻¹ (quantidade suficiente para trabalhar as análises) e continua em fase exponencial de crescimento. Este perfil de crescimento da microalga combina com o encontrado em outros trabalhos, por exemplo, como relata Sigaud-Kutner (2005).

O gráfico representado na Figura 18 contém os dados da curva de crescimento da microalga monitorada por espectrofotometria em comprimento de onda de 680 nm.

Figura 18 - Gráfico da Curva de Crescimento celular da *Lingulodinium polyedrum* por absorção em espectrofotômetro a 680nm.

Nota-se no gráfico acima, que a correlação entre a absorção espectrométrica e a contagem celular em microscopia óptica não é muito grande. Porém, é possível observar que há um crescimento de absorção quase freqüente em todos os dias de amostragem.

As curvas de crescimento além de serem primordiais para a construção das metodologias de análises com exposição ao fenol, também serviram de ferramenta para a manutenção dos cultivos, para que se replicasse um novo inóculo com a concentração de células adequada.

4.1.2. Determinação da sobrevivência celular em água de cultivo

original da Bacia Hidrográfica de Santos

O crescimento celular da microalga respondeu a curva pré-determinada no item anterior (4.1.1.), afirmando a viabilidade de cultivo em laboratório de *L. polyedrum* na água do mar de Santos, como pode ser acompanhado através do gráfico na Figura 19. Não houve alteração perceptível na velocidade ou quantidade de crescimento, permanecendo, a média de duração de cada cultivo em 20 até 25 dias. Os cultivos sofreram aclimação na água do mar de Santos de acordo com as porcentagens gradativas do gráfico abaixo, onde a cada novo inóculo, a % era aumentada:

Figura 19 - Gráfico do teste de sobrevivência celular da *L. polyedrum* na % água do mar de Santos. A densidade celular de todas as aclimações acompanhou a curva de crescimento pré-estabelecida.

A Tabela 7 apresenta os parâmetros da água do mar de Santos avaliados e comparados com os valores máximos descritos na legislação ambiental do CONAMA (Conselho Nacional do Meio Ambiente – Resolução 357 de 2005):

Tabela 7 - Análises das amostras de água do mar coletadas na Bacia Hidrográfica de Santos.

Parâmetros Analisados	Res. 357/05 CONAMA	Resultados Amostra <u>A</u> trás	Resultados Amostra <u>F</u> rente
Turbidez	Nula	2,44 NTU	2,57 NTU
O.D.	> 6 mg.L ⁻¹	7,7 mg.L ⁻¹	8,5mg.L ⁻¹
pH	6,5 – 8,5	8,36	8,25
Fenol	< 60 µg.L ⁻¹	340 µg.L ⁻¹ *	360µg.L ⁻¹ *
Condutividade	—	38,22 ms.cm ⁻¹	36,45 ms.cm ⁻¹
DQO	—	62	59
Cloretos	—	12000 ppm	12000 ppm
TOC	3 mg.L ⁻¹	18 mg.L ⁻¹ *	19 mg.L ⁻¹ *
SDT	—	23581 mg.L ⁻¹	25084 mg.L ⁻¹

* Significância ANOVA $p \leq 0,05$.

Como é possível notar na Tabela 7, de acordo com o local da coleta das amostras, os resultados encontrados não foram alarmantes. As amostras que ultrapassaram as quantidades máximas estipuladas pela legislação CONAMA foram justamente as de fenol (em concentração de 3,8 µmol, insignificante para efeitos na microalga *L. polyedrum*) e TOC (fontes de carbono de origem orgânicas diversas), que representam uma maior contaminação de compostos orgânicos como também

foi descrito em outros trabalhos que quantificaram em amostras dos sedimentos no local (como já descrito, o acúmulo de contaminantes em sedimentos de locais estuários é evidente e mais preocupante do que o disperso na água), como nos sedimentos analisados nos exemplos citados a seguir:

Próximo a área onde foram coletadas estas amostras A e F, o estudo de matéria orgânica nos sedimentos marinhos da Baía de Santos e Estuário foram apresentados por Medeiros e Bicego (2004). Os marcadores geoquímicos foram identificados e quantificados: hidrocarbonetos alifáticos (normal e alcanos isoprenóides) marcadores de petróleo, alquilbenzenos lineares e hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs). As amostras de sedimentos, coletadas em 15 locais na baía circundante e canais, foram extraídas e analisadas por cromatografia gasosa com ionização por chama e detectores de espectrometria de massa. As concentrações totais variaram $0,17-107,80 \mu\text{g.g}^{-1}$ de alifáticos, de 47,2 para $2.560,1 \text{ ng.g}^{-1}$ de marcadores de petróleo, $16,9-430,6 \text{ ng.g}^{-1}$ para alquilbenzenos e $79,6-15.389,1 \text{ ng.g}^{-1}$ para HPAs. Contribuições antropogênicas foram evidentes, indicando a influência do complexo industrial de Cubatão, emissários de esgoto ao longo da área, o depósito de resíduos da cidade de Santos e instalações de armazenagem de petróleo e derivados, com base nas concentrações mais elevadas de marcadores geoquímicos detectados.

Em outro trabalho do mesmo grupo, Nishigima e Bicego (2001), as amostras de sedimento de Santos também foram analisadas por GC-EM para identificação de hidrocarbonetos alifáticos e aromáticos, a fim de reunir informações sobre o grau de contaminação por hidrocarbonetos e outras contribuições

biogênicas. A concentração total dos *n*-alcanos em Santos variaram de 1,05-4,29 mg.g⁻¹ e hidrocarbonetos aromáticos 0,08-42,39 mg.g⁻¹.

No presente trabalho, as amostras A e F de água do mar também foram injetadas em CG-EM, mas como a quantificação demonstrada nos trabalhos acima realizada em sedimentos já se mostrou muito baixa (em relação a sensibilidade analítica) em água e com a necessidade de um processo de extração contendo maiores dificuldades, não foram encontrados picos de compostos orgânicos. Mesmo que detectável, os picos de compostos orgânicos voláteis nas amostras de água do mar seriam bem menores do que os encontrados no sedimento do mesmo local.

Alternativas de detecção dos compostos orgânicos nas amostras foram tentadas sem sucesso. A varredura em espectrofotômetro foi uma delas, e resultou em uma maior absorção no UV de 215 nm. Comprimento de onda este que foi utilizado em CLAE a fim de notarmos algum pico de compostos, porém nenhum pico foi encontrado.

Condições e aspectos que também foram estipulados para as amostras A e F de água do mar de Santos estão resumidos a seguir:

- a) Verificação do efeito não tóxico crônico a *L. polyedrum*;
 - b) Ausência de materiais flutuantes visualmente;
 - c) Óleos e graxas: visualmente ausentes;
 - d) Substâncias que produzem odor e turbidez: visualmente ausentes;
 - e) Corantes provenientes de fontes antrópicas: visualmente ausentes;
 - f) Resíduos sólidos objetáveis: visualmente ausentes.
-

Com relação aos valores de DQO e TOC (demonstrados nos resultados da Tabela 7) diluíram-se as amostras de água do mar (9X) para diminuir a interferência de íons cloretos (quantificados em 12000 ppm — dentro da média máxima de 19000 ppm para água salina). Na DQO utiliza-se nitrato de prata, que reage com íons cloretos e forma precipitado podendo interferir nos resultados. O equipamento TOC requisita a menor concentração de cloretos possíveis. Como os valores de DQO e TCO foram similares nos dois pontos, pode-se supor que a interferência de cloreto tenha sido minimizada. Por este efeito variável é que o CONAMA não indica análises de DBO ou DQO para águas salinas. Mas pode-se observar que o valor de DQO encontrado, coincide com uma resposta à alta concentração de Carbono orgânico total dos resultados do TOC, tanto para amostra A como para a F, ocasionando em uma coerente relação que permite confirmar as interferências de contaminações antropogênicas no local das coletas.

Era de se esperar que não fosse possível a sobrevivência das células de *L. polyedrum* mantidas em cultivo. Mas, bastou a filtração e autoclavagem da água para que as células permanecessem com seu ciclo de vida normal. Este teste foi importante como indicador de contaminação na água de Santos e sugere-se a repetição sob as mesmas condições após o término da dragagem do canal do porto de Santos afim de comparações do nível de interferência que este processo possa trazer ao ambiente marinho do local. Com a dragagem e a exploração do Pré-sal acredita-se em uma piora significativa ambiental (OREIRO, 2008).

4.2. Avaliação Metabólica — Ensaios dose-resposta de inibição do crescimento celular

4.2.1. Curvas de calibração para quantificação do fenol

4.2.1.1. Curva CLAE

As Figuras 20 e 21 contêm os cromatogramas, gráfico e os valores lineares da curva de calibração para quantificação do fenol por CLAE com detecção à 254 nm:

Figura 20 - Cromatogramas e equação linear da curva de calibração do fenol em CLAE.

Figura 21 - Curva de calibração do fenol em CLAE. Os valores são de média das triplicatas com os desvios padrão.

A cromatografia líquida permitiu uma ótima quantificação do fenol (como pode ser confirmado na Figura 21) e foi utilizada em todas as amostras que precisaram ter as concentrações estimadas.

4.2.1.2. Curva CG

A Tabela 8 e a Figura 22 relatam os valores encontrados para a eficiência de extração do fenol e a linearidade das curvas de calibração do fenol por CG-EM. Observa-se que a eficiência na extração não é suficientemente adequada para quantificações, por haver 70% de recuperação na concentração mais baixa e uma faixa de 80% nas demais:

Tabela 8 - Eficiência da extração de fenol na curva de calibração em CG-EM.

Fenol CG			
Concentração de fenol	Diluição em Clorofórmio	Recuperado na Extração	Eficiência da Extração
mmol.L ⁻¹	Área	Área	%
0,0	0	0	100
0,05	14,715	10,547	71,675
0,10	32,182	26,698	82,959
0,25	65,322	54,512	83,451
0,50	131,100	107,126	81,713
1,00	281,713	276,890	98,288
Média Total:			86,35

Figura 22 - Gráfico linear da curva de calibração do fenol em CG.

Os valores são as médias das triplicatas com os desvios padrão.

Foi possível concluir que o CG-EM não possui uma quantificação tão precisa quanto o CLAE devido à etapa de extração em clorofórmio, porém este

equipamento foi utilizado para identificar os metabólitos de fenol (item a ser descrito em 4.2.5.) através do detector de espectrometria de massas que nele é acoplado. Portanto, fez-se uso das duas técnicas analíticas.

4.2.2. Ensaios dose-resposta de inibição do crescimento celular

A viabilidade celular de *L. polyedrum* foi comprovada através de corante, desta maneira, foi possível definir através de microscopia óptica a densidade das células saudáveis (células.mL⁻¹) nos ensaios de inibição de crescimento. Na Figura 23, apresenta o registro fotográfico da coloração observada em células dos cultivos controle e tratado:

Figura 23 - Exposições ao fenol - Imagem das células por microscopia óptica com corante Azul de Evan's.

Nota-se que não há coloração azul nas células pertencentes ao grupo controle, e fica nítida a cor azul em algumas células do grupo tratado, que não foram consideradas para contagem de crescimento. Pode-se observar também que em azul encontram-se a parede celular totalmente desprendida das células que entraram na fase cística, o que indica que o fenol torna o meio adverso para as células, que desprendem a parede celular formando cisto (que quando saudáveis não apresentam coloração em azul). Esta formação cística da *L. polyedrum* também foi observada quando exposta a outros contaminantes, como peróxido de hidrogênio e ácido nítrico (GANINI *et al.*, 2006), além de ocasionada por alterações climáticas, temperatura da água ou intensidade de luz (que foram evitadas aos cultivos, por serem aclimatados em condições completamente controladas pela incubadora).

A retirada de uma alíquota de células (100 mL) para um novo cultivo com ausência de fenol no meio, foi realizada para avaliar a célula de *L. polyedrum* no processo de desencistamento após o período de condição adversa. Também foi utilizado o corante para observação celular em microscópio e determinou-se que as células voltam a crescer após a troca de meio para o não contaminado, seguindo a mesma característica não corada do teste de Azul de Evan's e comprovando que o fenol é o agente do meio capaz de causar a formação cística.

Sendo assim, com o auxílio do corante Azul de Evan's e a determinação das concentrações de fenol via cromatografia líquida realizou-se o teste que a Figura 24 demonstra, com gráfico de ensaio dose-resposta de inibição do crescimento celular pelas concentrações de fenol (0,05; 0,10; 0,25; 0,50; 1,0 e 2 mmol.L⁻¹), onde o ponto de concentração 0 refere-se ao cultivo controle, sem a exposição ao fenol.

Figura 24 – Gráfico de Dose-resposta da Inibição do crescimento celular após 24 horas de exposição ao fenol.

Cultivos iniciais com densidade $\approx 4,6 \times 10^3$ células.mL⁻¹ no momento do inócuo, conforme maior contaminação por mmol.L⁻¹ de fenol, o crescimento celular sofreu decréscimos. Os valores correspondem às médias encontradas e os desvios padrão.

Estipulando estatisticamente, de acordo com as coordenadas do gráfico na Figura 24 e o programa Inhibition Concentration Percentage Estimate (ICPIN.EXE), têm-se os valores de concentração IC 20 e IC 50 (após 24 horas de exposição) na Tabela 9:

Tabela 9 – Valores de IC 20 e IC 50 de células tratadas com fenol.

<i>Concentração celular</i>	<i>Concentração de fenol</i>
Inibição do crescimento de 20% células IC 20 ($\approx 3,8 \times 10^3$ células.mL ⁻¹)	0,04 mmol.L ⁻¹ ou 40 µmol.L ⁻¹
Inibição do crescimento de 50% células IC 50 ($\approx 2,4 \times 10^3$ células.mL ⁻¹)	0,12 mmol.L ⁻¹ ou 120 µmol.L ⁻¹

A concentração de IC 50 encontrada foi utilizada nos ensaios de: consumo do fenol (taxa de biodegradação pela *L. polyedrum*), identificação de metabólitos e nos ensaios de verificação da capacidade fotossintética da microalga. Para os testes enzimáticos, a concentração de fenol utilizada para o grupo tratado foi de 0,10 mmol.L⁻¹, valor um pouco menor que a concentração de IC 50 devido a necessidade de maior massa algal para a realização dos testes.

Para a microalga marinha *M. polymorphus* a concentração de fenol IC 50 encontrada foi de 2,3 mmol.L⁻¹ e a concentração IC 20 foi de 1,5 mmol.L⁻¹ (WALSH *et al.*, 1988). Estes valores demonstram que a *M. polymorphus* é mais resistente a fenol do que a *L. polyedrum*. Porém, a comparação pode ser controversa já que as condições de exposição ao fenol não são padronizadas. Eklund e Kautsky (2003) discutem justamente à respeito da necessidade de criação dos padrões para análises comparativas de IC ou EC (concentração que causa algum efeito) e exemplificam a dificuldade de comparação dos resultados demonstrados na Tabela 10, que relaciona diferentes condições de macroalgas expostas ao fenol.

Contudo, a Tabela 10 seguramente indica a necessidade de padronização dos testes de toxicidade com algas, para gerar subsídios aos órgãos legisladores e a governos locais sobre os valores de IC ou EC dos diferentes compostos a serem utilizados na análise de contaminações e para determinar os níveis críticos de poluentes na zona costeira. O desenvolvimento de testes em macroalgas e microalgas é particularmente útil, pois um impacto adverso sobre tais organismos é um efeito no início da cadeia alimentar, o que implica efeitos secundários sobre níveis tróficos superiores (LYTLE, 2001).

Tabela 10 - Exemplos de ensaios dose-resposta com algas expostas ao fenol.

Alga Teste	[] fenol (nmol.L ⁻¹)	Efeito	Tempo de exposição	Referências
<i>G. tenuistipitata</i> (R) Cultivo à 25°C, Iluminação contínua e com intensidade de 100–200 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e em água do mar natural 6% salina.	1541	Redução do crescimento em ensaio semi-EMtático (EC50)	4 dias	Haglund <i>et al.</i> (1996)
	1583	Redução do crescimento em ensaio estático (EC50)	4 dias	
<i>C. strictum</i> (R) Cultivo à 22°C, Iluminação de 16 horas e com intensidade de 35 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e em água do mar natural 20% salina.	21	Inibição do desenvolvimento de órgãos reprodutivos femininos (EC20)	3 dias	Eklund (1998)
	64	Inibição do desenvolvimento de órgãos reprodutivos femininos (EC50)	3 dias	
	414	Inibição da fertilização e maturação de cistocarpos (EC50)	7 dias	
	1063	Funcionamento inibido dos órgãos reprodutivos masculino (EC50)	3 dias	
<i>L. hyperborea</i> (B) Cultivo à 10°C, em água do mar natural.	1003	Redução da respiração	24 horas	Hopkin e Kain (1978)

Adaptado de Eklund e Kautsky (2003).

O uso regular de vários testes de toxicidade regularizados e assim padronizados em algas (como já ocorre com outros organismos), realizados em diferentes zonas climáticas e em ambientes relevantes, iria melhorar muito o conhecimento e avaliação dos impactos sobre os ecossistemas costeiros.

4.2.3. Nível intracelular de fenol

O fenol absorvido pelas células foi detectado via CLAE-UV gerando os cromatogramas apresentados na Figura 25:

Figura 25 - Cromatogramas – Amostra de material intracelular, após 8 e 24 horas de exposição ao fenol, determinado por CLAE-UV ($\lambda = 254$ nm).

Conforme o observado nos cromatogramas acima, após 8 horas de exposição o fenol foi detectado no material intracelular da microalga em concentrações quantificados em CLAE que variaram nas replicatas de 0,029 até 0,086 mmol.L⁻¹. Após 24 horas de exposição o fenol já não é mais encontrado, e

outro pico é formado (metabólito) que foi posteriormente estudado e identificado via CG-EM (item 4.2.5.). Estas mesmas amostras também foram analisadas no CG-EM para a verificação do conteúdo de fenol intracelular, gerando o cromatograma e os espectros de massas contidos na Figura 26. Observam-se os picos de fenol e de radical molecular resultante da fonte de ionização, com suas m/z correspondentes, pela biblioteca NIST[®] possuem similaridades maiores que 90%.

Figura 26 – Cromatograma e Espectros de massas – Amostra de material intracelular, após 8 h de exposição ao fenol, determinado por CG-EM.

4.2.4. Consumo de fenol

Conforme a observação do desaparecimento do fenol no meio de cultivo (Anexo II) e a comprovação da absorção pela quantificação de fenol intracelular (Figura 25 e 26), foi realizado teste de consumo de fenol determinando-se a Taxa de absorção (biodegradação) do fenol (Tx) dada por:

$$Tx = \frac{\frac{\mu\text{mol de fenol}}{16}}{n^{\circ} \text{ células}}$$

O que gera o Gráfico da Figura 27:

Figura 27 – Gráfico do consumo de fenol pela taxa de biodegradação celular. Exposição à 0,12 mmol.L⁻¹ de fenol.

A microalga *L. polyedrum* foi capaz de biotransformar $0,12 \text{ mmol.L}^{-1}$ de fenol durante 16 horas de exposição, com uma taxa de biodegradação por célula na média de aproximadamente $0,02 \text{ } \mu\text{mol.h}^{-1}.\text{cel}^{-1}$.

Em comparação, a remoção de fenol por *M. polymorphus* foi verificada no meio de cultura ao longo de 6 dias de exposição, houve um decréscimo na concentração de fenol de $250 \text{ } \mu\text{mol.L}^{-1}$. Em células previamente expostas ao poluente a remoção foi de 99% em 2 horas (WALSH, 2008). Como as concentrações de fenol que inibem o crescimento das duas espécies são distintas e não foram realizados testes de exposição longa ou crônica com a *L. polyedrum* há dificuldades para definir o comportamento de ambas as microalgas sob mesmas condições de ensaios, mas, pode-se avaliar superficialmente que a *M. polymorphus* possui uma característica de maior biodegradabilidade de fenol que a *L. polyedrum*.

4.2.5. Identificação de metabólitos do fenol

A injeção dos extratos de material intracelular da *L. polyedrum* em CG-EM, utilizando coluna com afinidade maior a ácidos carboxílicos, gerou o cromatograma da Figura 28:

Figura 28 - Cromatograma da amostra de material intracelular via CG-EM.

Obteve-se um cromatograma contendo vários picos, onde foi possível identificar os três indicados com as letras **A**, **B** e **C**, como sendo metabólitos fenólicos. A Tabela 11 possui os valores de m/z dos íons moleculares encontrados e identificados nos extratos celulares que foram injetados no CG-EM em coluna semi-polar. As letras **A**, **B** e **C** relacionam os compostos identificados aos picos contidos no cromatograma da Figura 28 e seus espectros de massas correspondentes estão em anexo (Anexos III, IV e V).

Tabela 11 - Metabolismo - Pesos moleculares encontrados em CG-EM.

Estrutura molecular do metabólito	m/z íon precursor	Possíveis Fragmentos	m/z íons fragmentos
<p>A PM = 142,00</p>	141	<p>PM = 101,02 PM = 42,01</p>	101 41
<p>B PM = 110,04</p>	110	<p>PM = 84, 02</p>	83
<p>C PM = 114,03</p>	114	<p>PM = 98,04 PM = 72,99</p>	97 71

Portanto, os picos **A**, **B** e **C** correspondem respectivamente aos metabólitos ácido 2-hidroximucônico semialdeído, 1,2-dihidroxibenzeno (Catecol) e ácido 2-oxo 4-pentenóico (TSIROGIANNI *et al.*, 2005), já os outros picos não identificados constituem diferentes componentes celulares ou até mesmo produtos da fonte de ionização.

Não foi possível comparar o espectro de massas obtido do pico **A** com a biblioteca NIST[®], por não existirem referências. A identificação deste metabólito foi realizada através dos valores de m/z obtidos, que conferem com os valores de

massas deste composto na mesma via metabólica, investigada e analisada também em CG-EM por Massunaga *et al.* (1986), e por teste de absorção em UV (CHATTERJEE; DUTTA, 2008). A elevada absorbância à 375 nm (LOH; CHUA, 2002) observada nas amostras do grupo tratado com fenol (Anexo VI), remetem à presença de metabólitos com propriedades absorptivas muito similares ao identificado.

O pico denominado como **B** pode ter sua identificação confirmada, através da biblioteca NIST[®] (2005) conforme Ré-Poppi e Santiago-Silva (2002) e do tempo de retenção do padrão de 1,2-diidroxibenzeno utilizado no CG-EM em coluna semi-polar de 30 m. Foi encontrado pico de massa e fragmentação similares ao catecol, que conferem em 91% com os dados da NIST[®].

A identificação do pico **C** baseou-se além dos valores de massas encontrados e no padrão de fragmentação típico de compostos similares, em mesma via metabólica analisada por Debarati e colaboradores (2004) e já determinada por Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (JUNKER *et al.*, 1994; BASHEER *et al.*, 2007).

Desta forma, os fragmentos encontrados sugerem a via metabólica apresentada na Figura 29, que é a mesma determinada para as microalgas *M. polymorphus* (WALSH *et al.*, 1988), *Chlorella sp* (TIKOO; SCRAGG; SHALES, 1997) e *Ochromonas danica* (SEMPLE; CAIN, 1996; SEMPLE *et al.*, 1999). Além de ser encontrada com atividade nestas outras microalgas (HIROOKA *et al.*, 2003), a enzima catecol 2,3-dioxigenase foi sem dúvida responsável pela clivagem do catecol na via metabólica da *L. polyedrum*, já que o metabólito ácido 2-hidroximucônico semialdeído está presente nos espectros de massas encontrados, assim como o próprio catecol, o que eliminou a necessidade de testes da atividade enzimática da

fenol hidroxilase ou a própria catecol 2,3-dioxigenase que teriam maiores expressões no grupo tratado com fenol.

Figura 29 - Via sugerida para a biodegradação do fenol pela *L.polyedrum*.

Sugere-se que novos testes sejam realizados a fim de explorarem os benefícios da via de biodegradação que a microalga realiza com o fenol. Os metabólitos encontrados podem servir de biomarcadores de contaminação por fenol. Seria muito proveitoso o estudo proteômico da microalga, verificando as demais variações nas concentrações protéicas referentes aos complexos enzimáticos envolvidos no metabolismo e estresse oxidativo que a *L. polyedrum* sofre perante o contaminante fenol, comparando-se, até mesmo, com exposições a outros compostos orgânicos.

4.3. Ensaio enzimáticos — Avaliação da atividade antioxidante e biotransformação de fase II

Exposição da *L. polyedrum*, por um período de 24 horas, ao fenol em concentração, quantificadas em CLAE de $0,10 \text{ mmol.L}^{-1}$. Esta concentração de fenol foi a melhor determinada para a maior sobrevivência celular e conseqüentemente a maior quantidade de proteína total, determinada segundo o item 3.4.2. e desta forma, todos os ensaios foram normalizados pela quantidade de proteína presente.

4.3.1. Atividade de SOD (E.C.: 1.15.1.1)

Atividade de SOD foi aproximadamente três vezes maior no grupo tratado com fenol, atingindo 98 U por miligrama de proteína (Figura 30).

Figura 30 - Atividade de SOD em cultivos de *L. polyedrum* após 24 horas de exposição a 0,10 mmol.L⁻¹ de fenol.

Os valores representam a média das triplicatas com os desvios padrão.

Estes valores constataam que a microalga exposta ao fenol possui uma maior geração de radicais superóxidos, induzindo a uma condição de possível estresse se a razão da geração de radical pela atividade da enzima não forem equilibradas. A provável produção elevada de $O_2^{\bullet -}$ pode ser original do processo de metabolismo do fenol, onde as monooxigenases, como fenol hidroxilase e catecol 2,3-dioxigenase, têm as suas atividades induzidas (ISHIDA; TANAKA; HORIIKE,

2004). Exposta a PCB, a *L. polyedrum* também teve seus níveis de ERO elevados, oriundo do metabolismo deste contaminante (Leitão *et al.*, 2003).

4.3.2. Atividade de CAT (E.C.: 1.11.1.6)

A CAT, assim como a SOD, possuiu uma maior atividade no grupo tratado, que possui $10,54 \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ e o grupo controle possui $8,39 \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$, como o descrito no gráfico da Figura 31.

* $p < 0.05$ ANOVA significância.

Figura 31 - Atividade de CAT em cultivos de *L. polyedrum* após 24 horas de exposição a $0,10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ de fenol.

Os valores representam a média das triplicatas com os desvios padrão.

Por ser responsável pela captura de H_2O_2 resultante de ERO, a catalase participa intensamente do complexo antioxidante da *L. polyedrum*, sugerindo que o

aumento das atividades destas enzimas ocorram para reparar e não haver excesso de ERO. Por isso a catalase teve a elevação de sua atividade induzida pelo excesso de H_2O_2 presente no grupo exposto ao fenol.

Os valores de atividades das enzimas CAT e SOD sugerem que estas podem ser um dos primeiros marcadores da defesa antioxidante para a contaminação de fenol em células de *L. polyedrum*. Já que durante os processos de biotransformação dos xenobióticos fenólicos, podendo gerar derivados ERO (GOEPTAR *et al.*, 1995) ou pela ciclagem metabólica ou através do sistema redox do citocromo P450 desacoplado, produzindo O_2^- e H_2O_2 , que pode promover danos oxidativos em sistemas biológicos da microalga. A geração de ERO pode ser associada as mudanças nas defesas antioxidantes de diferentes organismos aquáticos (LIVINGSTONE *et al.* 1991).

4.3.3. Atividade APX (E.C.:1.11.1.11)

Ascorbato peroxidase teve um comportamento distinto ao da SOD e CAT, pois o grupo controle teve a atividade maior que o tratado com fenol. É importante considerar que as inúmeras triplicatas deste ensaio obtiveram valores muito variáveis, observados no alto desvio padrão de ambos os grupos (Figura 32), variando no grupo controle de 0,7 a 1,0 $\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ e no grupo tratado com fenol de 0,5 a 0,8 $\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$. Porém, dado ao desvio padrão, os grupos controle e tratado não diferem na atividade de APX.

Parece que a microalga prefere utilizar a catalase como enzima peroxidase mais ativa frente à elevada concentração de H_2O_2 induzido no grupo contaminado com fenol. Provavelmente a *L. polyedrum* tenha adaptado-se a indução

lenta de APX e alta de CAT devido à presença contínua e constante de altas concentrações de H_2O_2 nos cultivos contaminados com fenol.

Dados descritos na Figura 31 sugerem que a CAT é o sistema mais eficaz de decomposição das concentrações de H_2O_2 em *L. polyedrum*. Sabe-se que a enzima APX tem uma maior afinidade ao peróxido de hidrogênio que a CAT, mas estas enzimas encontram-se em um local diferente da organela, APX principalmente nos cloroplastos e a CAT nos peroxissomos, portanto os locais de produção de ERO também devem ser considerados (POLLE, 1996).

Figura 32 - Atividade de APX em cultivos de *L. polyedrum* após 24 horas de exposição a 0,10 mmol.L⁻¹ de fenol.

Os valores representam a média das triplicatas com os desvios padrão.

Comportamento similar de atividade da APX e CAT foi encontrado na alga vermelha *Kappaphycus alvarezii* quando exposta ao composto orgânico cofibrato (BARROS *et al.*, 2003).

Conforme os resultados de atividades das enzimas de defesas antioxidantes SOD e CAT, determina-se que o fenol é capaz de induzir um aumento no complexo enzimático antioxidante da microalga *L. polyedrum*, sendo estas duas enzimas os melhores biomarcadores deste estado de alteração. Sugere-se testar em amostras de águas do mar, como por exemplo da Bacia Hidrográfica de Santos, os ensaios enzimáticos desenvolvidos para investigação de aplicação dos testes como biomarcadores de contaminação.

4.3.4. Atividade GST (E.C.: 2.5.1.18)

Valores quase três vezes maiores de atividade da glutathione S-transferase foram encontrados no grupo tratado com fenol, atingindo a atividade máxima de $0,09 \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ e o controle não passou de $0,03 \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$, Figura 33.

* $p < 0.05$ ANOVA significância.

Figura 33 - Atividade de GST em cultivos de *L. polyedrum* após 24 horas de exposição a $0,10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ de fenol.

Os valores representam a média das triplicatas com os desvios padrão.

Este resultado indica que GST participa no processo de detoxificação do fenol, tornando-o mais rapidamente excretado pela célula. Além da rota metabólica definida na Figura 29, o fenol também sofre processo de biotransformação através da conjugação com a molécula de glutathiona, sugerida pela atividade elevada da GST detectada em amostras dos cultivos tratados.

A GST apresentou menor atividade na microalga *M. polymorphus* exposta ao fenol, correspondendo a 7,8 e 14,0 nmol.min⁻¹.mg⁻¹ no grupo controle e tratado, respectivamente (CAMPOS, 2008), participando também nesta microalga do processo de biotransformação do fenol.

Sendo assim, as vias de biotransformação do fenol na microalga *L.polyedrum* se dão pela conjugação com a glutathiona, catalisada pela GST e pela via metabólica de fenol hidroxilase e catecol-2,3-dioxigenase.

4.4. Avaliação da razão GSH/GSSG.

As curvas de calibração para as detecções de GSH e GSSG em LC-EM encontram-se respectivamente nas Figuras 34 e 35.

Figura 34 - Curva de calibração de GSH via LC-EM.
Os valores representam a média das triplicatas com os desvios padrão.

Figura 35 - Curva de calibração de GSSG via LC-EM.
Os valores representam a média das triplicatas com os desvios padrão.

As extrações das amostras contaminadas com GSH e GSSG obtiveram uma porcentagem de recuperado atingindo 99,28 % e 97,54 % respectivamente, o que correspondeu à confiabilidade das quantificações realizadas nas amostras. Nas Figuras 36 e 37 encontram-se os valores de GSH e GSSG encontrados nas amostras:

Figura 36 - GSH em cultivos de *L. polyedrum* exposta a 0,10 mmol.L⁻¹ de fenol.

Figura 37 - GSSG em cultivos de *L. polyedrum* exposta a 0,10 mmol.L⁻¹ de fenol.

Os valores representam a média das triplicatas com os desvios padrão.

A glutathiona total (oxidada e reduzida) obteve um aumento no grupo tratado, como é possível observar, em principal na forma oxidada que passou de 40 para 60 nmol.L⁻¹. As razões GSH/GSSG resultantes estão expressas na Figura 38.

* $p < 0.05$ ANOVA significância.

Figura 38 - Razões de GSH/GSSG em cultivos de *L. polyedrum* exposta a 0,10 mmol.L⁻¹ de fenol.

Os valores representam a média das triplicatas com os desvios padrão.

Observava-se que a razão GSH/GSSG no grupo tratado com fenol é menor, devido ao aumento de 20 ng.mL⁻¹ de GSSG, expressando o efeito oxidativo no sistema glutational, que em condições normais possui os níveis de GSSG muito abaixo dos de GSH.

Conforme os grupos tratados com fenol tiveram a atividade elevada de GST, nota-se que a reposição de GSH pela biossíntese da microalga foi efetiva, já que os valores de GSH permaneceram com os níveis pouco abaixo dos encontrados nos controles. A alteração relevante nos grupos contaminados com fenol é que os radicais livres EROs foram capazes de oxidar mais GSH, aumentando o nível de GSSG e utilizou-se a GSH também para auxiliar na rápida excreção de fenol das

células, porém o funcionamento do sistema foi recuperado, mantendo os níveis de GSH suficientes para continuar o desempenho biológico da *L. polyedrum*.

4.5. Avaliação da Capacidade Fotossintética

Alguns contaminantes são capazes de agir sobre o sistema fotossintético. O fenol se mostrou como sendo um destes. Na Figura 39, observa-se que o grupo contaminado diminuiu ligeiramente a taxa de transporte de elétrons do fotossistema II da *L. polyedrum*. Nota-se que os valores dos desvios padrões são elevados e que a variação dos dois grupos está dentro deste desvio, não se observando valores discrepantes ou de maior significância.

Figura 39 - Desempenho fotossintético dos cultivos em torno de 8×10^3 células.mL⁻¹ da *L. polyedrum* exposta a 0,12 mmol.L⁻¹ de fenol durante 24 horas. Os valores representam a média das triplicatas com os desvios padrão.

Estes resultados da avaliação fotossintética foram obtidos após exatamente 24 horas de exposição ao fenol, sugerindo que este contaminante interferiu relativamente na fotossíntese da microalga em um curto intervalo de tempo. Este parâmetro é importante, pois revela a sensibilidade da microalga perante este composto orgânico e também pode ser explorado como indicador de alterações biológicas nas células cultivadas com uma enorme vantagem de este teste ser realizado pelo equipamento Diving-PAM. Uma análise rápida que pode se mostrar muito eficiente para observação do desempenho biológico da *L. polyedrum* exposta a fenol ou até mesmo outros contaminantes.

A microalga *L. polyedrum* apresenta como antena de pigmentos (Figura 40), as clorofilas *a* e *c*₂, β -carotenos e xantofilas exclusivas ao grupo (peridinina, neoperidinina) e não exclusivas (dinoxantina e neodinoxantina). Também contêm pequenas quantidades de diadinoxantina e diatoxantina (SALDARRIAGA *et al.*, 2001).

Através da taxa de transporte de elétrons, ilustrada na Figura 40, é que foi possível o estudo da capacidade fotossintética da *L. polyedrum* neste trabalho, com a análise da fluorescência da clorofila *a*, via metodologia de pulso saturante do equipamento Diving-PAM (Aplicação de pulso de luz com amplitude modulada) – Analisador submersível de rendimento fotossintético.

Figura 40 - Esquema ilustrativo da reação de fluorescência da clorofila e transporte de elétrons no processo de fotossíntese.

Diante dos resultados apresentados, a microalga *L. polyedrum* mostrou-se sensível a alterações em seu sistema antioxidante, fotossintético e metabólico, gerados por concentrações do composto aromático fenol. Fato este que permite explorar a sensibilidade encontrada, estudando uma aplicação bioindicadora deste microorganismo para poluentes ou contaminantes marinhos de mesmas características químicas.

5. CONCLUSÕES

- ❖ Através da curva de crescimento celular foi possível definir os dias 6 e 7 de cultivo como sendo os melhores para a exposição ao agente contaminante, devido à se tratar do período exponencial de crescimento dos cultivos de *L. polyedrum*.
 - ❖ Os cultivos realizados com água do mar de Santos sobreviveram bem e podem ser utilizados como bioindicadores de alterações nos graus de contaminação. Devem-se repetir os experimentos após o término do processo de dragagem do canal do porto e início de exploração do pré-sal, para comparação com os dados já obtidos.
 - ❖ Determinou-se as concentrações de fenol capazes de em 24 horas inibirem o crescimento das células de *L. polyedrum* em 20 e 50% (IC 20 e IC 50) respectivamente $0,04 \text{ mmol.L}^{-1}$ e $0,12 \text{ mmol.L}^{-1}$. Identificou-se a necessidade de padronização das variáveis para execução dos ensaios dose-resposta com algas, permitindo construir protocolos que auxiliariam a obtenção de legislações que assegurem os limites de compostos tóxicos aos organismos costeiros.
 - ❖ Calculou-se que a microalga *L. polyedrum* possui uma taxa de biodegradação do fenol por célula na média de aproximadamente $0,02 \text{ } \mu\text{mol.h}^{-1}.\text{cel}^{-1}$, capaz de biotransformar $0,12 \text{ mmol.L}^{-1}$ de fenol em um período de 16 horas.
 - ❖ Vias de biotransformação do fenol na microalga *L. polyedrum* se dão pela conjugação com a glutathione, catalisada por GST e pela via metabólica de fenol hidroxilase e catecol 2,3-dioxigenase.
-

- ❖ Identificou-se a geração de ácido 2-hidroximucônico semialdeído, 1,2-dihidroxibenzeno (Catecol) e ácido 2-oxo 4-pentenóico como metabólitos resultantes da exposição de *L. polyedrum* ao fenol.
 - ❖ O composto orgânico fenol é capaz de induzir um estado de aumento da atividade antioxidante na microalga *L. polyedrum*, sendo as enzimas superóxido dismutase e catalase os melhores biomarcadores, por terem sua expressão até três vezes maior no grupo contaminado. Futuramente, espera-se empregar estes testes em amostras de águas do mar com possíveis contaminações por compostos aromáticos, realizando novos testes para estes diferentes compostos.
 - ❖ Determinou-se que a razão GSH/GSSG no grupo tratado com fenol é menor, devido ao aumento de 20 ng.mL⁻¹ de GSSG, expressando o efeito oxidativo no sistema glutatona, que em condições normais possui os níveis de GSSG muito abaixo dos de GSH.
 - ❖ Avaliação fotossintética sugeriu que o fenol interferiu relativamente na fotossíntese da microalga em um curto intervalo de tempo.
-

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AEBI, H. Catalase in vitro. **Methods in Enzymology**, v. 105, p. 121-126, 1984.

AGUIAR, V. M. C. e BRAGA, E. S. Seasonal and tidal variability of phosphorus along a salinity gradient in the heavily polluted estuarine system of Santos/São Vicente – São Paulo, Brazil. **Marine Pollution Bulletin**, v. 54, p. 464-488, 2007.

ALCOCK, R. E.; BEHNISCH, P. A.; JONES, K. C. e HAGENMAIER, H. Dioxin-likes PCB in the environmant-human expose and the significance of sources. **Chemosphere**, v. 37, n. 8, p. 1457-1472, 1998.

ALZIEU C. Environmental problems caused by TBT in France: assessment, regulations, prospects. **Marine Environmental Research**, v. 32, p. 7, 1991.

ARFI, R. e PATRITI, G. Impact d'une pollution sur la partie zooplanctonique d'un système néritique (Marseille Cortiou). **Hydrobiologia**, v. 144, p.11-23, 1987.

ASADA, K. Chloroplasts: Formation of Active oxygen and its Scavenging. **Methods in Enzymology**, v. 105, p. 422-429, 1984.

AWWA - The American Water Works Association. Weter quality and treatment a handbook of public water supplies. 3. ed. New York: McGraw-Hill Book; 654p. 1971.

BALECH, E. Los Dinoflagelados del Atlantico Sudoccidental.Madrid, Instituto Español de Oceanografia (Publicaciones especiales, 1), p. 310, 1988.

BARROS, M. P.; GRANBOM, M.; COLEPICOLO, P. e PEDERSÉN, M. Temporal mismatch between induction of superoxide dismutase and ascorbate peroxidase correlates with high H₂O₂ concentration in seawater from clofibrate-treated red algae *Kappaphycus alvarezii*. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 420, p. 161-168, 2003.

BASHEER, S.; KUNHI, A.; VARADARAJ, M. e DIVAKAR, S. Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopic Studies on the Microbial Degradation of Mononitrophenol Isomers. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v 23, p. 49-63, 2007.

BICEGO, M. C.; WEBER, R. R. e ITO, R. G. Aromatic hydrocarbons on surface waters of Admiralty Bay, King George Island, Antarctica. **Marine Pollution Bulletin**, v. 32, p. 549-553, 1996.

BOELSTERLI, U. A. Mechanistic Toxicology: The molecular basis of how chemicals disrupt biological targets. Taylor and Francis: London; 2003.

BOLD, H. C. e WYNNE, M. J. Introduction to the algae. Englewood Cliffs, NJ: Prentice-Hall; 516 p, 1985.

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

BUICK, R. The antiquity of oxygenic photosynthesis: evidence from stromatolites in sulphate-deficient Archean lakes. **Science**, v. 255, p. 74-77, 1992.

CAMPOS S. Aspectos oxidativos e de biotransformação do poluente fenol na microalga *Minutocellus polymorphus*. (Doutorado - Tese). Bioquímica, Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo. 2008.

CARDOZO, K. M.; GUARATINI, T.; BARROS, P.M.; FALCÃO, R.; TONON, A. P.; NORBERTO, P.; CAMPOS, S.; TORRES, M. A.; SOUZA, A.O.; COLEPICOLA, P. e PINTO, E. Metabolites from algae with economical impact. Comparative Biochemistry and Physiology. **Toxicology and Pharmacology**, v. 146, n. 1-2, p. 60-78, 2007.

CETESB - Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental. Informe digital, Relatório Anual de Balneabilidade das Praias, 2009.

CETESB – Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental. Manual de produtos químicos – Ficha de informação de produtos químicos. Disponível em:

http://www.cetesb.sp.gov.br/Emergencia/produtos/ficha_completa1.asp?consulta=FE%20NOL%20FUNDIDO. Acesso em: 02/2008.

CETESB - Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental. São Paulo. Legislação básica de poluição ambiental estadual e federal. São Paulo; 72p. 1981.

CHATTERJEE S e DUTTA TK. Complete degradation of butyl benzyl phthalate by a defined bacterial consortium: Role of individual isolates in the assimilation pathway. **Chemosphere**, v. 70, p. 933-994, 2008.

COLEPICOLO, P.; CAMARERO, V. C. P. e HASTINGS, J.W. A circadian rhythm activity of superoxide dismutase in photosynthetic alga *Gonyaulax polyedra*. **Chronobiology International**, v. 9, p. 266-278, 1992.

CONAMA - Conselho Nacional do Meio Ambiente. 2005. Resolução nº 357, 17 de Março de 2005. Disponível em: www.mma.gov.br/port/conama. Acesso em 03/2008.

CRISTINA, I. C.; SILVESTRE, J. L. M.; SANTOS, J. L. F. C. e ZAGATTO, E. A.G. Liquid-liquid extraction in flow analysis: A critical review. **Analytica Chimica Acta**, v. 652, p. 54-65, 2009.

DALE B. Dinoflagellate cyst ecology: modelling and geological applications. In: Jansonius J e McGregor DC. Palynology: Principles and Applications. v. 3. AASP Foundation: Dallas; p. 1249-1275, 1996.

DEBARATI, P.; ASHWINI, C.; GUNJAN, P. e RAKESH, K. J. Degradation of p-hydroxybenzoate via protocatechuate in *Arthrobacter protophormiae* RKJ100 and *Burkholderia cepacia* RKJ200. **Current Science**, v. 87, n. 9, p. 1263-1268, 2004.

DELORENZO, M. E.; SCOTT, G. I. e ROSS, P. E. Toxicity of pesticides to aquatic microorganisms: A review. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 20, n. 1, p. 84-98, 2009.

DEPLEDGE, H. M. e BILLINGHURST, Z. Ecological Significance of Endocrine Disruption in Marine Invertebrates. **Marine Pollution Bulletin**, v. 39, n. 1-12, p. 32-38, 1999.

DRÖGE, W. Free radicals in the physiological control of cell function. **Physiological Reviews**, v. 82, p. 47-95, 2002.

EKLUND, B. Reproductive performance and growth response of the red alga *Ceramium strictum* under the impact of phenol. **Marine Ecology Progress Series**, v. 167, p. 119-126, 1998.

EKLUND, B. T. e KAUTSKY, L. Review on toxicity testing with marine macroalgae and the need for method standardization — exemplified with copper and phenol. **Marine Pollution Bulletin**, v. 46, p. 171-181, 2003.

FACCINI, A. L. Algas I: Microalgas. Universidade Santa Cecília: Santos; 2009. Publicação Eletrônica.

FENSOME, R. A. J.; TAYLOR, G.; NORRIS, W. A. S.; SARJEANT, D. I.; WHARTON, J. e WILLIAMS, G. L. A classification of fossil and living dinoflagellates. **Micropaleontology Press Special Paper**, n. 7, 1993.

FERREIRA, A. L. A. e MATSUBARA, I. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Associação Brasileira de Medicina**, v. 43, p. 61-69, 1997.

FIORI, E. V. Caracterização da macrofauna bentônica de Substrato inconsolidado do estuário de Santos–SP. Trabalho de conclusão de curso. Universidade Santa Cecília. 64p. 2007.

FUKUE, M.; NAKAMURA, T.; KATO, Y. e YAMASAKI, S. Degree of pollution for marine sediments. **Engineering Geology**, v. 53, n. 2, p. 131-137, 1999.

GANINI, D.; HOLLNAGEL, H. C.; COLEPICOLO, P. e BARROS, M. P. Peróxido de hidrogênio e óxido nítrico como mediadores de encistamento celular no dinoflagelado *Lingulodinium polyedrum*. in Anais da 58ª Reunião Anual da SBPC (Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência). Florianópolis, SC, 2006.

GOEPTAR, A. R.; SCHEERENS, H. e VERMEULEN, N. P. E. Oxygen and xenobiotic reductase activities of cytochrome P450. **Critical Reviews in Toxicology**, v. 25, n. 1, p. 25-65, 1995.

-
- GRAHAM, L. E. e WILCOX, L. W. Introduction to the algae: occurrence, relationships, nutrition, definition, general features. In: Graham LE e Wilcox LW, Algae. Prentice-Hall: Upper Saddle River; p.1-21, 2000.
- GUILLARD, R. R. L. e RYTHER, J. H. Studies of marine planktonic diatoms. I. *Cyclotella nana* Hustedt and *Detonula confervacea* Cleve. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 8, p. 229-239, 1962.
- HAGLUND, K.; BJÖRKLUND, M.; GUNNARE, S.; SANDBERG, A.; OLANDER, U. e PEDERSÉN, M. New method for toxicity assessment in marine and brackish environments using the macroalga *Gracilaria tenuistipitata* (Gracilariales, Rhodophyta). **Hydrobiologia**, v 326, p. 317-325, 1996.
- HALLIWELL B. Free radicals and rheumatoid disease Mechanisms and Models in Rheumatoid Arthritis. London: Academic Press; p. 301-316, 1995.
- HALLIWELL, B. e GUTTERIDGE, J. M. C. Free Radicals in Biology and Medicine. 4. ed. Claredon Press: Oxford; 851 p., 2007.
- HALLIWELL, B. Oxidative damage, lipid peroxidation and antioxidant protection in chloroplast. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 44, p. 327-339, 1987.
- HEASMAN, M.; DIEMAR, J.; O'CONNOR, W. A. e FOULKES, L. A. Production of Micro-algal Concentrations for Aquaculture. **Aquaculture Research**, v. 31, p. 637-659, 2000.
- HIROOKA, T.; AKIYAMA, Y.; TSUJI, N.; NAKAMURA, T.; NAGASE, H.; HIRATA, K. e MIYAMOTO, K. Removal of hazardous phenols by microalgae under photoautotrophic conditions. **Journal of bioscience and bioengineering**, v. 95, n. 2, p. 200-203, 2003.
- HOLLNAGEL, H. C.; Aspectos bioquímicos da biossíntese de pigmentos carotenóides em *Gonyaulax polyedra* (dinophyceae). (Mestrado – dissertação). Departamento de Bioquímica, Universidade de São Paulo, São Paulo. 2000.
- HOLM-HANSEN, O. Algae: amounts of DNA and organic carbon in single cell. **Science**, v 163, p. 87-95, 1969.
-

HOPKIN, R. e KAIN, J. M. The effects of some pollutants on the survival, growth and respiration of *Laminaria hyperborea*. **Estuarine Coastal Marine Science**, v. 7, p. 531-553, 1978.

ISHIDA, T.; TANAKA, H. e HORIIKE, K. Quantitative structure-activity relationship for the cleavage of C3/C4-substituted catechols by a prototypal extradiol catechol dioxygenase with broad substrate specificity. **The Journal of Biochemistry**, v. 135, p. 721-730, 2004.

JAAGUMAGI, R e PERSAUD, D. Sediment assessment and remediation-ontario's Approach. In: POSW – Satellite Seminar “Remediation of Contaminated Sediments” Fifth International FZK/TNO, Conference on Contaminated Soil, p.21-32, 1995.

JAMES, M. O.; HEARD, C. S. e HAWKINS, W. E. Effect of 3-methylcholanthrene on monooxygenase, epoxide hydrolase, and glutathione S-transferase activities in small estuarine and freshwater fish. **Aquatic Toxicology**, v. 12, n. 1, p. 1-15, 1988.

JUNKER, F.; FIELD, J. A.; BANGERTER, F.; RAMSTEINER, K.; *et al.* Oxygenation and spontaneous deamination of 2-aminobenzenesulphonic acid in *Alcaligenes sp.* strain 0-1 with subsequent *meta* ring cleavage and spontaneous desulphonation to 2-hydroxymuconic acid. **Biochemical Journal**, v. 300, p. 429-436, 1994.

KIRK, J. T. O. Light and photosynthesis in aquatic ecosystems. Cambridge: Cambridge University Press; 1993.

KLECKA, G. M. e GIBSON, D. T. Inhibition of catechol 2,3-dioxygenase from *Pseudomonas putida* by 3-chlorocatechol. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 41, n. 5, p. 1159-1165, 1981.

LEAHY, J. G. e COLWELL, R. R. Microbial degradation of hydrocarbons in the environment. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 54, p. 305-315, 1990.

LEITÃO, S. M. A.; CARDOZO, K.H. M.; PINTO, E. e COLEPICOLO, P. PCB - Induced Oxidative Stress in the Unicellular Marine Dinoflagellate *Lingulodinium*

polyedrum. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 45, p. 59-65, 2003.

LEWIS, J. e HALLETT, R. *Lingulodinium polyedrum* (*Gonyaulax polyedra*) a blooming dinoflagellate. **Oceanography and Marine Biology**, v.35, p. 97-161, 1997.

LINDENHAYN, M. Notícias Empresariais da Atualidade. Disponível em: <http://www.quimicaederivados.com.br/revista/qd461/atualidades2.html>. Acesso em: 02-08-2010.

LIVINGSTONE, D. R.; VIARENGO, A.; CANESI, L. e PERTICA, M. Seasonal variations in the antioxidant defence systems and lipid peroxidation of the digestive gland of mussels. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 100, n. 1-2, p. 187-190, 1991.

LOBBAN, C. S.; HARRISON, P.J. e DUNCAN, M, J. The physiological ecology of seaweeds. Cambridge, UK: Cambridge University Press; p. 123-131, 1985.

LOH, K. C. e CHUA, S. S. Ortho pathway of benzoate degradation in *Pseudomonas putida*: induction of meta pathway at high substrate concentrations. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.13, p. 487-494, 2002.

LYTLE, J. S. e LYTLE, T. F. Use of plants for toxicity assessment of estuarine ecosystems. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 20, p. 68-83, 2001.

MALLICK, N. Copper-induced oxidative stress in the chlorophycean microalga *Chlorella vulgaris*: response of the antioxidant system. **Journal of Plant Physiology**, v. 161, p. 591–597, 2004.

MASUNAGA, S.; URUSHIGAWA, Y. e YONEZAWA, Y. Biodegradation pathway of o-cresol by heterogeneous culture. Phenol acclimated activated sludge. **Water Research**, v. 20, p. 477-484, 1986.

MCCORD, J. M. e FRIDOVICH, I. The reduction of cytochrome c by milk xanthine oxidase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 243, p. 5753-5760, 1968.

MEDEIROS, P. M. e BICEGO, M. C. Investigation of natural and anthropogenic hydrocarbon inputs in sediments using geochemical markers in Santos, SP—Brazil. **Marine Pollution Bulletin**, v. 49, p. 761–769, 2004.

NCEAS (National Center for Ecological Analysis and Synthesis). Disponível em: <http://www.nceas.ucsb.edu/globalmarine/impacts>. Acesso em: 18-06-2010.

NETZEL, H. e DÖRR, G. Dinoflagellate cell cortex. In Spector DL. Dinoflagellates. Academic Press: Orlando; p. 43-105. 1984.

NISHIGIMA, F. N.; WEBER, R. R. e BICEGO, M. C. Aliphatic and Aromatic Hydrocarbons in Sediments of Santos and Cananéia, SP, Brazil. **Marine Pollution Bulletin**, v. 42, p. 1064-1072, 2001.

NIST. NISTIR 7303: Intercomparison program for organic speciation in PM_{2.5} air particulate matter: description and results for trial III. 2005.

OECD (Organization for Economic Cooperation and Development). OECD Guidelines for Testing of Chemicals. Section 2 – Effects on biotic systems – Test 201– “Algal, growth, inhibition test”. OECD, Paris, France. 1984.

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

OKAMOTO, O. K.; PINTO, E.; LATORRE, L. R.; BECHARA, E. J. H. e COLEPICOLO, P. Antioxidant modulation in response to metal-induced oxidative stress in algal chloroplasts. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 40, p. 18-24, 2001.

OREIRO, S. G.; CUPERTINO, J. A.; SZATMARI, P. e FILHO, A. T. Influence of pre-salt alignments in post-Aptian magmatism in the Cabo Frio High and its surroundings, Santos and Campos basins, SE Brazil: An example of non-plume-related magmatism. **Journal of South American Earth Sciences**, v. 25, p. 116-131, 2008.

PASSOS, C. T.; BURKERT, J. F. M.; KALIL, S. J. e BURKERT, C. A. V. Biodegradação de Fenol por uma nova linhagem de *Aspergillus sp.* isolada no sul do Brasil. **Química Nova**, v. 32, p. 950-954, 2009.

PFLUGMACHER, S.; SCHRÖDER, P. e SANDERMANN, H. Taxonomic distribution of plant glutathione S-transferase acting on xenobiotics. **Phytochemistry**, v. 54, p. 267-273, 2000.

PINTO, E. Modulação dos Níveis de Pigmentos e Ácidos Graxos em Algas Marinhas: Função dos Carotenóides e efeitos do Estresse Ambiental. (Doutorado – tese). Universidade de São Paulo, São Paulo. 2002.

PINTO, E.; CATALANI, L. H.; LOPES, N. P.; DI MASCIO, P. e COLEPICOLO, P. Peridinin as the major biological carotenoid quencher of singlet oxygen in marine algae *Gonyaulax polyedra*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 268, p. 496-500, 2000.

POLLE, A. Mehler reaction: Friend or foe in photosynthesis? **Botanica Acta**, v.109, p. 84-89, 1996.

POWLEY, M. W. e CARLSON, G. P. Hepatic and pulmonary microsomal benzene metabolism in CYP2E1 knockout mice. **Toxicology**, v. 169, n.3, p.187–94, 2001.

RAINBOW, P. S. e PHILLIPS, D.J. H. Cosmopolitan biomonitors of trace metals. **Marine Pollution Bulletin**, v. 26, p. 593-601, 1993.

RÉ-POPPI, N. e SANTIAGO-SILVA, M. R. Identification of polycyclic aromatic hydrocarbons and methoxylated phenols in wood smoke emitted during production of charcoal. **Chromatographia**, v. 55, p. 475-481, 2002.

RIZZO, P. J. Biocheminstry of dinoflagellate nucleus. In Taylor JF. The biology of dinoflagellates. Blackwell Science: Oxford; p. 143-173, 1987.

ROBERTS, D. A.; JOHNSTON, E. L.; POORE, A. G. B. Biomonitors and the assessment of ecological impacts: Distribution of herbivorous epifauna in contaminated macroalgal beds. **Environmental Pollution**, v. 156, n. 2, p. 489-503, 2008 b.

ROBERTS, D. A.; JOHNSTON, E. L.; POORE, A. G. B. Contamination of marine biogenic habitats and effects upon associated epifauna. **Marine Pollution Bulletin**, v. 56, p. 1057-1065, 2008 a.

ROMANO RL. Análise dos efeitos tóxicos de cádmio sobre a microalga *Lingulodinium polyedrum* utilizando cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas (LC-EM/MS). Dissertação de mestrado. Universidade de São Paulo .129 p. 2009.

SALDARRIAGA, J. F. *et al.* Dinoflagellate nuclear SSU rRNA phylogeny suggests multiple plastid losses and replacements. **Journal of Molecular Evolution**, v. 53, p. 204-213, 2001.

SANTOS, V. L. e LINARDI, V. R. Phenol interactions. **Process of Biochemistry**. v. 39, p. 1001- 10023, 2004.

SEMPLE, K. T.; CAIN, R. B. e SCHMIDT, S. Biodegradation of aromatic compounds by microalgae. **Microbiology Letters**, v. 170, p. 291-300, 1999.

SEMPLE, K.T. e CAIN, R. B. Biodegradation of phenols by the alga *Ochromonas danica*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, n. 4, p. 1265-1273, 1996.

SIGGLE, M. R. F e THOMAS, T. D. Why are organic acids stronger acids than organic alcohols? **Journal Ambient Chemistry Society**, v.108, p. 4360-4362, 1986.

SIGGLE, M. R. F; STREITWIESER, A. R. e THOMAS, T. D. The role of resonance and inductive effects in the acidity of carboxylic acids. **Journal Ambient Chemistry Society**, v. 110, n. 2, p. 8022-8028, 1988.

SILVERSTEIN, R. M.; BASSLER, G. e MORRIL, T. C. Identificação espectrométrica de compostos orgânicos. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan; 387 p. 1994.

SNYDER, R. e HEDLI, C. C. An overview of benzene metabolism. **Environ Health Perspect**, v. 104, n. 6, p.1165–71, 1996.

SOLOMONS, T. W. G. Química orgânica. 7. Ed. Rio de janeiro: LTC; v. 2, 2001.

SOUSA, L. M. R.; RIVAS-CARBALLO e PAIS, J. Dinoflagelados: Nomenclatura portuguesa. **Ciências da Terra**, v.13, p. 36-57, 1999.

Standard Methods for the Examination of Water & Wastewater. 21. Ed. Métodos: Argentométrico, 4500-Cl- B; Fotométrico direto, 5530 D; Colorimetric method. 5220 D. 2005.

TATKEN RL E LEWIS RJ. Registry of toxic effects of chemical substances. 3. ed. Washington: Health Service; 1983.

TAY, J. H.; HE, Y. X. e YAN, Y. G. Improved anaerobic degradation of phenol with supplemental glucose. **Journal of Environmental Engineering**, p. 38-45, 2001.

THAKUR, I. S.; VENNA, P. e UPADHAYAYA, K. Molecular cloning and characterization of pentachlorophenol-degrading monooxygenase genes of *Pseudomonas* sp. from the chemostat. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 209, p. 770-804, 2002.

TIKOO, V.; SCRAGG, A. H. e SHALES, S. W. Degradation of pentachlorophenol by microalgae. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 68, p. 425-431, 1997.

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

TSIROGIANNI, I.; AIVALIOTIS, M.; KARAS, M. e TSIOTIS, G. Detection and characterization of catechol 2,3-dioxygenase in an indigenous soil *Pseudomonad* by MALDI-TOF MS using a column separation. **Biodegradation**, v. 16, p. 181-186, 2005.

U.S. EPA (United States Environmental Protection Agency). Algal Assay Procedure: Bottle Test. National Eutrophication Program. Corvallis, Oregon. 1971.

U.S. EPA (US Environmental Protection Agency). Method Guidance and Recommendations for Whole Effluent Toxicity. EPA-821/C-97-001. 2007.

U.S. EPA (US Environmental Protection Agency). Short-term methods for estimating the chronic toxicity of effluents and receiving waters to marine and estuarine organisms. EPA-821/R-02-14. 2002.

UL - University of Liverpool. *Lingulodinium polyedrum*. Disponível em: http://www.liv.ac.uk/hab/Data%20sheets/l_poly.htm. Acesso em 23-07-2010.

VOGEL, A. I. e JEFFERY, G. H. Análise química quantitativa. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 712 p. 1992.

VOLKMAN, J.; BARRETT, S.; BLACKBURN, S.; MANSOUR, M.; SIKES, E. E. GELIN, F. Microalgal biomarkers: A review of recent research developments. **Organic Geochemistry**, v. 29, n. 5-7, p. 1163-1179, 1998.

WALSH, G. E.; MCLAUGHLIN, L. L.; YODER, M. J.; MOODY, P. H.; LORES, E. M.; FORESTER, J. e WESSINGER-DUVALL, P. B. *Minutocellus polymorphus*: a new marine diatom for use in algal toxicity tests. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 7, p. 925-929, 1988.

WILCE, M. C. J. e PARKER, M. W. Structure and function of glutathione S-transferases. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 1205, p. 1-18, 1994.

WMED Oligos Consultoria científica. Catálogo. Câmara Neubauer Improved (Melhorada). Disponível em: www.oligo.com.br/catalogos/laboroptik.pdf Acesso em: 22/06/2009.

ZAGATTO, P. A. e BERTOLETTI, E. Ecotoxicologia Aquática – Princípios e Aplicações. 2. ed. São Carlos: RiMa, 2008. 486 p.

ZERBE, K.; WOITHE, K.; LI, D. B.; VITALI, F.; BIGLER, L. e ROBINSON, J. A. An oxidative phenol coupling reaction catalyzed by oxyB, a cytochrome P450 from the vancomycin-producing microorganism. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 43, n. 48, p. 6709-6722, 2004.

7. ANEXOS

Meio Guilard f/2 para cultivar *Lingulodinium polyedrum*

- 1,2 L de meio contendo:

31,25 µL vitaminas (Solução A)

1250 µL nitrato (Solução B)

1250 µL fosfato (Solução C)

1250 µL metais (Solução D)

960 mL água do mar

250 mL água destilada

- Solução A (vitaminas): tiamina e biotina em água.
 - Solução B (nitrato): NaNO_3 em água.
 - Solução C (fosfato): $\text{Na}_2\text{H}_2\text{PO}_4$ em água.
 - Solução D (metais): FeCl_3 , Na_2EDTA , CuSO_4 , ZnSO_4 , CoCl_2 , Na_2MoO_4 e MnCl_2 em água.
-

Desaparecimento do fenol no meio de cultivo.

Espectro de massas do composto **A**, ácido 2-hidroximucônico semialdeído.

Espectro de massas do composto **B**, 1,2-dihidroxibenzeno.

Espectro de massas do composto **C**, ácido 2-oxo 4-pentenóico.

Espectro de varredura no UV do material intracelular.

Condições de ensaio: os extratos intracelulares foram analisados via espectrofotômetro, e registraram-se as alterações nos espectros de UV-Visível por varredura de 220-400 nm, nas amostras retiradas após 0, 4 e 6 horas de exposição ao fenol.