

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas
(Bioquímica)

Sara Cristina Gonçalves Campos

Título da Tese de Doutorado:

**Aspectos oxidativos e de biotransformação do poluente
fenol na microalga *Minutocellus polymorphus***

Orientador: Prof. Dr. Pio Colepicolo Neto

São Paulo

Data do Depósito na SPG: 28 de novembro de 2008

Sara Cristina Gonçalves Campos

**Aspectos oxidativos e de biotransformação do poluente
fenol na microalga *Minutocellus polymorphus***

Tese apresentada ao Instituto de Química da
Universidade de São Paulo para obtenção do
Título de Doutor em Ciências (Bioquímica)

Orientador: Prof. Dr. Pio Colepicolo Neto

São Paulo
2008

Sara Cristina Gonçalves Campos

**Aspectos oxidativos e de biotransformação do poluente fenol na
microalga *Minutocellus polymorphus***

Tese apresentada ao Instituto de Química da
Universidade de São Paulo para obtenção do
Título de Doutor em Ciências Biológicas
(Bioquímica).

Aprovado em: _____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

*Aos meus amados e queridos pais, **Isaac e Helena**, pelo amor incondicional, pelo exemplo de força e vontade, pelo incentivo, pelo empenho na minha educação, pelas palavras sábias... A vocês devo tudo o que consegui hoje. Obrigada por tudo!!!*

*Ao meu querido Jô, um presente em minha vida, por todo o amor,
paciência, compreensão e carinho. Por estar presente nos meus
momentos mais difíceis, mas principalmente pela paz que me traz.*

AGRADECIMENTOS

Ao meu querido orientador Prof. Dr. Pio Colepicolo, pelos ensinamentos, pela amizade e por me proporcionar um amadurecimento científico.

A minha querida mestra Prof^ª. Dra. Maísa Ribeiro Pereira Lima Brigagão, por me iniciar nesse maravilhoso mundo da bioquímica.

Ao Prof. Dr. Ernani Pinto, pela amizade e ajuda inicial no trabalho.

Ao Prof. Dr. Maurício Yonanime, pela amizade, pela grande disposição e interesse no trabalho, pela colaboração nas análises de CG/MS.

Ao Prof. Dr. Frank Hebert Quina e ao Prof. Dr. Cláudio Augusto Oller do Nascimento pela confiança e auxílio na conquista da bolsa.

A amiga Daniela M. L. de Paula pela preciosa ajuda ao trabalho e pelo auxílio na operação do CG/MS.

Aos amigos e companheiros de laboratório: Adriana, Ana, Anderson, Ângela, Diogo, Douglas, Eloísa, Fabyana, Humberto, João, Karina, Lígia, Luiza, Marcelo, Meron, Moacir, Paula, Patrícia, Sidnei, Tereza, Thaís, Tona, Vanessa Falcão, Vanessa, Vânia, pela convivência, pela amizade e pelo auxílio na utilização de aparelhos, além de diversas discussões muito produtivas.

Ao técnico e amigo Ed, pela amizade e pela preciosa ajuda.

A querida Sandrinha, pelo cuidado ao laboratório e pelas palavras amigas.

A minha grande e querida amiga Amandinha, uma pessoa doce e companheira, pelo carinho e pela força nos momentos mais difíceis.

A minha grande e querida amiga Paulinha, anjo em minha vida, pela força, pelo companheirismo, pela ajuda nos experimentos, pela enorme ajuda na fase final desse doutorado. Fico sem palavras para expressar minha enorme gratidão por vc. Obrigada pela linda amizade!

Aos meus grandes amigos Sabrina, Fabiana, Henrique e Ingrid que mesmo apesar da distância continuam muito presentes em minha vida. Nossa amizade e nossos momentos de alegria sempre são lembrados com muito carinho.

Aos amigos candangos, Simone e Fábio e Camila e Natanael, por tornar os nossos dias mais alegres.

As professoras de bioquímica da EFOA, Terezinha e Denise, pelo carinho, ensinamentos e incentivo.

Aos meus queridos e amados irmãos, Junior e Diego, pelo amor e companheirismo.

Aos meus queridos avôs, João e Alzira (sempre presente em meu coração), José e Maria, pelo amor, carinho e orações.

A minha segunda família, D. Edna, Sr. Zezé e Netinho, pelo carinho, amor e amizade.

A Capes, CNPq, FAPESP e ao CEPEMA (Centro de Capacitação e Pesquisa em Meio Ambiente) pelo apoio financeiro.

A todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

“Só existem duas maneiras de você viver sua vida. Uma é como se nada fosse um milagre. A outra, como se tudo fosse um milagre.”

Albert Einstein

RESUMO

Campos, S.C.G. **Aspectos oxidativos e de biotransformação do poluente fenol na microalga *Minutocellus polymorphus***. 2008. 141p. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Ciências (Bioquímica). Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Minutocellus polymorphus é uma microalga marinha cosmopolita, encontrada em diversas áreas. É sensível a vários tipos de toxicantes e por isso foi escolhida para investigar a metabolização do fenol, assim como os efeitos de estresse oxidativo induzido por este poluente.

Na exposição de *M. polymorphus* ao fenol foi observado um aumento na atividade da enzima superóxido dismutase ($143,5 \pm 46,9$ U mg^{-1} para o grupo tratado e $27,1 \pm 12,7$ U mg^{-1} para o grupo controle) e na atividade de catalase ($9,79 \pm 1,32$ $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ no grupo fenol e $7,00 \pm 1,03$ $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ no grupo controle). As enzimas ascorbato peroxidase, deidroascorbato redutase, glutathiona redutase e glutathiona peroxidase não foram afetadas pelo tratamento com fenol.

Fenol foi ainda capaz de provocar uma depressão dos níveis de glutathiona em *M. polymorphus*, o decréscimo da razão de GSH/GSSG foi de aproximadamente 80%. O fenol também provocou uma diminuição nos níveis de clorofila a, no entanto, não alterou outros pigmentos. Os níveis de malondialdéido, importante produto de lipoperoxidação, não foram alterados nas células expostas induzidos a este poluente orgânico.

A remoção de fenol por *M. polymorphus* foi verificada no meio de cultura ao longo do tempo, houve um decréscimo na concentração de fenol de 250 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ depois de 6 dias de exposição. Em células previamente expostas ao poluente a remoção foi de 99% em 2 horas. As enzimas de biotransformação do fenol, fenol hidroxilase (PH) e catecol 2,3-dioxigenase (C2,3-D) também foram induzidas ao longo de 6 dias, no entanto, não foi detectada a atividade de catecol 1,2-dioxigenase (C1,2-D). Estes resultados sugerem que a biotransformação do fenol segue uma via de meta clivagem sendo formado o 2-hidroximucônico semialdéido pela ação de C2,3-D.

A glutatona S-transferase (GST) teve um papel importante na detoxificação do fenol. Em *M. polymorphus* exposta a este poluente por 48 h foi observado um aumento da atividade de GST ($7,4 \pm 1,5 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ no grupo fenol e $14,6 \pm 1,3 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ no grupo controle).

Os resultados apresentados sugerem que a microalga *M. polymorphus* apresenta um potencial a biotransformação de fenol e pode ser considerada um importante bioindicador e SOD, catalase, GST e GSH importantes biomarcadores de poluição aquática.

Palavras-chave: Fenol, *Minutocellus polymorphus*, Microalga, Estresse oxidativo, Biodegradação.

ABSTRACT

Campos, S.C.G. **Oxidative aspects and phenol biotransformation in the microalga *Minutocellus polymorphus***. 2008. 141p. PhD Thesis - Graduate Program in Biochemistry. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Minutocellus polymorphus is a cosmopolitan marine microalgae found in many areas. It is sensitive to several types of toxicants and therefore it was chosen to investigate the phenol biotransformation, as well as the oxidative stress induced by this pollutant.

M. polymorphus exposed to phenol displays an increase in the enzymes superoxide dismutase (143.5 ± 46.9 U mg^{-1} for the treated group and 27.1 ± 12.7 U mg^{-1} for the control group) and catalase activities (9.79 ± 1.32 $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ in the phenol group and 7.00 ± 1.03 $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ in the control). The enzymes ascorbate peroxidase, dehydroascorbate reductase, glutathione reductase and glutathione peroxidase were not affected by the treatment with phenol.

Phenol reduced the levels of glutathione (GSH) in *M. polymorphus*, and therefore, the ratio GSH/GSSG is affected considerably. The intracellular levels of diadinoxanthin and chlorophyll-a were affected by the presence of phenol. The levels of malondialdehyde, important product of lipoperoxidation, were not altered in *M. polymorphus* when cells were exposed to this organic pollutant.

The phenol uptake, by *M. polymorphus*, was followed and a decrease of 250 $\mu\text{mol. L}^{-1}$ in the cell-free medium was estimated after six days of exposure. Cells previously exposed to the pollutant uptakes 99 % in 2 hours of incubation. The enzymes of phenol biotransformation, phenol hydroxylase (PH) and catechol 2,3-dioxygenase (C2,3-D) activities were induced after 6 days incubation. However, the activity of catechol 1,2-dioxygenase (C1,2-D) was not detected. These results suggest that the degradation of the phenol follows a meta clivagem being formed it 2-hydroxymuconic semialdehyde by the action of C2,3-D.

The glutathione S-transferase (GST) also displays an important role in the phenol detoxification. *M. polymorphus* exposed to the phenol for 48 hours had an increase of GST activity ($7.4 \pm 1.5 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ in the phenol group and $14.6 \pm 1.3 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ in the control group).

Our results suggest that the microalgae *M. polymorphus* is a potential to phenol biotransformation and it may be considered an important bioindicator and SOD, catalase, GST and GSH important biomarkers of aquatic pollution.

Key-words: Phenol, *Minutocellus polymorphus*, Microalgae, Oxidative stress, Biodegradation.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

APx: Ascorbato peroxidase

ATP: Adenosina trifosfato

ATSDR: Agência de Registro de Substâncias Tóxicas e Doenças

BaP: Benzopireno

BSA: Albumina bovina sérica

BSO: Butionina sulfoximina

BSTFA: Bis(trimetilsilil) trifluoracetamida

C1,2-D: Catecol 1,2-dioxigenase

C2,3-D: Catecol 2,3-dioxigenase

CDNB: 1-Cloro-2,4 dinitrobenzeno

CETESB: Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental

CG/MS: Cromatógrafo a gás acoplado a um espectrômetro de massas

CONAMA: Conselho Nacional do Meio Ambiente

2,4-DCP: 2,4-Diclorofenol

DHAR: Deidroascorbato redutase

DNP: 2,4-Dinitrofenol

ϵ = Coeficiente de extinção molar

EC: Concentração efetiva

EC₅₀ e EC₂₀: Concentração efetiva que inibe um parâmetro em 50% e 20%, respectivamente

EDTA: Ácido etilenodiamino tetracético

ERO: Espécies reativas de oxigênio

GPx: Glutathiona peroxidase

GR: Glutathiona redutase

GSH: Glutathiona reduzida

GSSG: Glutathiona oxidada

GST: Glutathiona S-transferase

HCB: hexaclorobenzeno

HPLC: Cromatografia líquida de alta eficiência

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

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

K_{ow}: Coeficiente de partição octanol/água

Log K_{ow}: Logaritmo de K_{ow}

MDA: Malondialdeído

MeOH: Metanol

MTBE: Éter metil-terciário butílico

NADPH: Nicotinamida adenina dinucleotídeo (fosfato) reduzida

OECD: Organização para cooperação econômica e desenvolvimento

OSHA: Segurança ocupacional e Administração da saúde

PAH: Hidrocarbonetos poliaromáticos

PCB: Bifenilas policloradas

pH: Potencial hidrogeniônico

PH: Fenol hidroxilase

PVDF: Fluoreto de polivinilideno

QSAR: Relação quantitativa de estrutura e atividade

QUICAR: Relação quantitativa de atividade química inter-específica

ROOH: Lipoperóxidos

SIM: Monitoramento seletivo dos íons

SOD: Superóxido dismutase

TBA: Ácido tiobarbitúrico

t-BuOOH: Terc-butil hidroperóxido

TEP: 1,1,3,3-Tetraetoxipropano

TR: Tempo de retenção

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

UV/Vis: Ultravioleta/visível

λ_{exc} : Comprimento de onda de excitação

λ_{em} : Comprimento de onda de emissão

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Exemplos de contaminantes aquáticos.....	25
Figura 2. Fórmula estrutural do fenol.....	31
Figura 3. Estruturas químicas dos derivados fenólicos.....	33
Figura 4. Fases do processo de biotransformação de poluentes nos organismos em geral. As reações da Fase II não necessariamente são precedidas pelas reações da Fase I.....	41
Figura 5. Reações envolvendo o metabolismo de compostos aromáticos em microorganismos (adaptado de Semple <i>et al.</i> , 1999).....	42
Figura 6. Reações presentes no processo de lipoperoxidação (LH: ácido graxo insaturado, L•: radical lipídico, LOO•: radical peroxil, LOOL: hidroperóxido lipídico).....	47
Figura 7. Produção de O ₂ • pelo sistema xantina/xantina oxidase.....	62
Figura 8. Reação entre CDNB e GSH catalisada pela GST.....	64
Figura 9. Reação entre TBA e MDA formando um produto fluorescente.....	67
Figura 10. Reação de derivatização de catecol com BSTFA.....	78
Figura 11. Curva de crescimento de <i>M. polymorphus</i> por contagem celular.....	81
Figura 12. Curva de crescimento de <i>M. polymorphus</i> por fluorescência da	

clorofila (λ_{exc} = 460 nm e λ_{em} = 680 nm).....	82
Figura 13. A: Espectro de varredura de excitação quando a emissão foi ajustada para λ = 680 nm. B: Espectro de varredura de emissão quando a excitação foi ajustada para λ = 460 nm.....	83
Figura 14. Sobrevivência de <i>M. polymorphus</i> exposta ao fenol por 48 h.....	84
Figura 15. Atividade de SOD em extrato celular de <i>M. polymorphus</i> exposta a 1,5 mmol. L ⁻¹ de fenol por 48 h (*significância: p<0,05, ANOVA).....	86
Figura 16. Atividade de catalase em extrato celular de <i>M. polymorphus</i> exposta a 1,5 mmol. L ⁻¹ de fenol por 48 h (*significância: p<0,05, ANOVA).....	87
Figura 17. Atividade de APx em extrato celular de <i>M. polymorphus</i> exposta a 1,5 mmol. L ⁻¹ de fenol por 48 h.....	88
Figura 18. Atividade de DHAR em extrato celular de <i>M. polymorphus</i> exposta a 1,5 mmol. L ⁻¹ de fenol por 48 h.....	88
Figura 19. Atividade de GR em extrato celular de <i>M. polymorphus</i> exposta a 1,5 mmol. L ⁻¹ de fenol por 48 h.	89
Figura 20. Atividade de GPx em extrato celular de <i>M. polymorphus</i> exposta a 1,5 mmol. L ⁻¹ de fenol por 48 h.	89
Figura 21. Atividade de PH em extrato celular de <i>M. polymorphus</i> exposta a 1,5 mmol. L ⁻¹ de fenol ao longo de 6 dias (*significância: p<0,05, ANOVA, grupo fenol comparado ao grupo controle de um mesmo dia).....	90

Figura 22. Atividade de C2,3-D em extrato celular de <i>M. polymorphus</i> exposta a 1,5 mmol. L ⁻¹ de fenol ao longo de 6 dias (*significância: p<0,05, ANOVA, grupo fenol comparado ao grupo controle de um mesmo dia)	91
Figura 23. Atividade de GST em extrato celular de <i>M. polymorphus</i> exposta a 1,5 mmol. L ⁻¹ de fenol por 48 h (*significância: p<0,05, ANOVA).....	93
Figura 24. Cromatograma obtido para o produto MDA-TBA (TR= 4,2 min) e curva de calibração realizada em triplicatas. Os diferentes picos correspondem às diferentes concentrações (0 a 5,0 µmol. L ⁻¹)	94
Figura 25. Conteúdo do complexo MDA-TBA em extrato celular de <i>M. polymorphus</i> exposta a 1,5 mmol. L ⁻¹ de fenol por 48 h.....	95
Figura 26. Estrutura química de GSH e GSSG.....	96
Figura 27. Cromatograma obtido para GSH e GSSG (TR= 4,5 min e 6,0 min, respectivamente) e curva de calibração. Os diferentes picos correspondem às diferentes concentrações (1,0 a 100,0 µmol. L ⁻¹).....	96
Figura 28. Cromatograma obtido na determinação de GSH e GSSG em extrato celular de <i>M. polymorphus</i> exposta a 1,5 mmol. L ⁻¹ de fenol por 48 h.....	97
Figura 29. Relação de GSH/GSSG presente em extrato celular de <i>M. polymorphus</i> exposta a 1,5 mmol. L ⁻¹ de fenol por 48 h (*significância: p<0,05, ANOVA).....	98
Figura 30. Cromatograma dos pigmentos presentes no extrato celular de <i>M. polymorphus</i> monitorada em 445 nm. Pico 1: Fucoxantina (TR: 12,39 min); Pico 2: Diadinoxantina (TR:25,43 min); Pico 3: Diatoxantina (TR: 38,57min); Pico 4:	

Clorofila a (TR: 56,85min); Pico 5: β -Caroteno (TR: 66,85 min).....	99
Figura 31. Curva de calibração e espectro dos padrões de pigmentos.....	100
Figura 32. Estrutura química dos pigmentos encontrados no extrato celular de <i>M. polymorphus</i>	101
Figura 33. Conteúdo de pigmentos em extrato celular de <i>M. polymorphus</i> exposta a 1,5 mmol. L ⁻¹ de fenol por 48 h (*significância: $p < 0,05$, ANOVA).....	102
Figura 34. Conteúdo de fenol em meio de cultura de <i>M. polymorphus</i> exposta a 1,5 mmol. L ⁻¹ de fenol por 48 h.....	103
Figura 35. Determinação de fenol em meio de cultura de <i>M. polymorphus</i> exposta a 110,9 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ do poluente.....	104
Figura 36. Cromatograma obtido na determinação de fenol em meio de cultura de <i>M. polymorphus</i> exposta a 110,9 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ do poluente.....	105
Figura 37. Mecanismo de fragmentação do catecol e seu deuterado após o processo de derivatização com BSTFA.....	106
Figura 38. Cromatograma do derivado trimetilsilil de catecol e catecol deuterado obtido no CG/MS. O detector do espectrômetro de massa foi operado usando fragmentação por impacto de elétrons (70 eV) com monitoramento seletivo dos íons (SIM) (Íons monitorados para CAT-2TMS: m/z 239, m/z 240, m/z 254 e para CAT-2TMS deuterado: m/z 243, m/z 258).....	107
Figura 39. Espectro de massas do derivado trimetilsilil de catecol (CAT-2TMS) e catecol deuterado obtido no CG/MS. O detector do espectrômetro de massa foi	

operado usando fragmentação por impacto de elétrons (70 eV) com monitoramento seletivo dos íons (SIM) (Íons monitorados para CAT-2TMS: m/z 239, m/z 240, m/z 254 e para CAT-2TMS deuterado: m/z 243, m/z 258).....	108
Figura 40. Conteúdo de catecol em área relativa presente em extrato celular de <i>M. polymorphus</i> (aproximadamente 100 mg de peso fresco) exposta a 1,0 mmol. L ⁻¹ de fenol ao longo de 6 dias (*significância: p<0,05, ANOVA, grupo fenol comparado ao grupo controle de um mesmo dia).....	109
Figura 41. Modelo de curva de crescimento para algas.....	111
Figura 42: Mecanismo de geração de ERO e integração das defesas antioxidantes durante a biotransformação do fenol (Asc: ascorbato, DHAsc: deidroascorbato).....	116
Figura 43: Suposto mecanismo de degradação do fenol em <i>M. polymorphus</i>	117
Figura 44: Mecanismo de biotransformação do fenol (adaptado de Müller, 1992 e Semple e Cain, 1996).....	120

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Propriedades físicas e químicas do fenol.....	32
Tabela 2. Limite máximo de fenol permitido por agências estaduais e federais.....	34
Tabela 3. Exemplos de biodegradação de compostos tóxicos por algas.....	45
Tabela 4. Programa de eluição para análise de pigmentos por HPLC.....	72
Tabela 5. Programa de eluição para análise de fenol por HPLC.....	75

SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

1. INTRODUÇÃO.....	23
1.1. Poluição aquática.....	24
1.2. Fenol.....	31
1.3. Importância das algas.....	35
1.3.1. Algas <i>versus</i> Poluentes.....	36
1.3.2. Algas <i>versus</i> Metabolização de compostos orgânicos.....	39
1.3.3. Algas <i>versus</i> Estresse Oxidativo.....	46
2. OBJETIVOS.....	54
2.1. Objetivo geral.....	55
2.2. Objetivos específicos.....	55
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	56
3.1. Cultivo da microalga.....	57
3.2. Determinação da curva de crescimento.....	57
3.2.1. Curva de crescimento por contagem celular.....	57
3.2.2. Curva de crescimento por fluorescência da clorofila.....	58

3.3. Determinação da inibição do crescimento.....	58
3.4. Montagem experimental.....	59
3.5. Ensaio enzimáticos.....	60
3.5.1. Superóxido dismutase.....	61
3.5.2. Catalase.....	62
3.5.3. Glutaciona peroxidase.....	63
3.5.4. Glutaciona redutase.....	63
3.5.5. Glutaciona S-transferase.....	64
3.5.6. Ascorbato peroxidase.....	64
3.5.7. Deidroascorbato redutase.....	65
3.5.8. Fenol hidroxilase.....	65
3.5.9. Catecol 1,2-dioxigenase.....	66
3.5.10. Catecol 2,3-dioxigenase.....	66
3.6. Quantificação de proteínas.....	67
3.7. Quantificação dos níveis de malondialdeído (MDA).....	67
3.8. Quantificação de GSH e GSSG.....	69
3.9. Determinação do conteúdo de pigmentos fotossintéticos.....	71
3.10. Experimentos de Biodegradação.....	73
3.10.1. Montagem experimental.....	73
3.10.2. Quantificação de fenol.....	75
3.10.3. Identificação e quantificação dos metabólitos do fenol por CG/MS.....	76
3.11. Análise estatística.....	79
4. RESULTADOS.....	80
4.1. Curvas de crescimento.....	81
4.2. Inibição do crescimento.....	84
4.3. Enzimas antioxidantes.....	85
4.4. Enzimas de biotransformação do fenol.....	90

4.5. Quantificação dos níveis de malondialdeído (MDA).....	93
4.6. Quantificação de GSH e GSSG.....	95
4.7. Determinação do conteúdo de pigmentos fotossintéticos.....	98
4.8. Experimentos de biodegradação.....	103
5. DISCUSSÃO.....	110
6. CONCLUSÕES.....	122
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	124
CURRICULUM VITAE.....	138

1. Introdução

1.1. Poluição aquática

A poluição aquática passou a receber a atenção devida no momento em que os efeitos da industrialização, das intensas atividades agrícolas, da exploração dos recursos naturais e do turismo começaram a provocar sérias conseqüências sobre o ecossistema e os organismos, incluindo o homem. Atualmente, a poluição aquática e, em especial de ambientes marinhos tornou-se uma preocupação mundial ganhando importância científica e política (His *et al.*, 1999; Islam e Tanaka, 2004).

Mais de 3 bilhões de pessoas no mundo vivem próximas de áreas costeiras sendo dependentes desta região para o suprimento de alimentos e matéria prima. A principal conseqüência desta situação é a produção de efluentes domésticos e industriais lançados indiscriminadamente no ambiente causando mudanças no ecossistema aquático e destruição dessa região com grande importância biológica e econômica (Moore *et al.*, 2004). Os principais contaminantes aquáticos de origem antropogênica incluem patógenos; nutrientes; plásticos; agrotóxicos, como herbicidas, inseticidas, fungicidas; outros contaminantes orgânicos, como fenóis, hidrocarbonetos poliaromáticos (PAH), derivados do petróleo; solventes orgânicos; íons inorgânicos como metais; substâncias radioativas, entre outros. (Haynes e Johnson, 2000; Derraik, 2002; Islam e Tanaka, 2004). Alguns exemplos de agrotóxicos e PAHs são apresentados na figura 1.

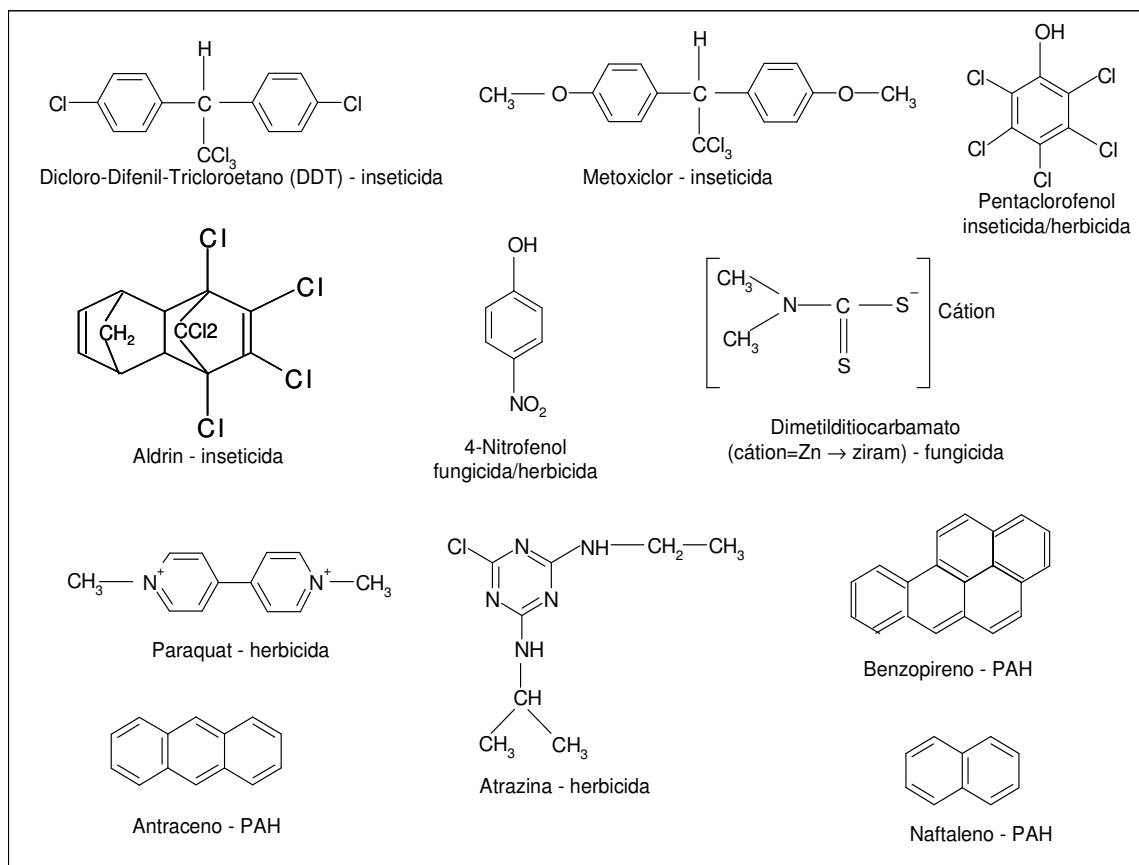


Figura 1. Exemplos de contaminantes aquáticos.

Poluentes são definidos como substâncias presentes no ambiente, dos quais a maioria é de origem antropogênica, e que podem causar efeitos deletérios sobre a vida dos organismos (Moriarty, 1990). De acordo com esta definição é necessário distinguir contaminantes, os quais são todas as substâncias de origem antropogênica introduzidas no ambiente, de poluentes os quais consistem daqueles contaminantes com efeitos biológicos negativos (His *et al.*, 1999).

A atividade antropogênica é responsável por um declínio na diversidade biológica mundial, podendo acelerar a taxa de extinção de espécies em 1.000 a 10.000 vezes maior que a taxa natural. A biodiversidade é necessária não apenas

como fonte de muitos produtos comerciais, mas também extremamente importante para o ecossistema promovendo purificação de águas, prevenção de erosão dos solos e regulação do clima (Lovejoy, 1997; Swaminathan, 2003). Na região dos Grandes Lagos da América do Norte, o acúmulo de compostos clorados provocou o desaparecimento de predadores do topo da cadeia alimentar, como por exemplo, o das águias e, além disso, causou deformidades em várias espécies de aves aquáticas (Islam e Tanaka, 2004).

A poluição marinha é amplificada pela poluição do ar e solo, sendo que todos os poluentes emitidos terminam em águas oceânicas. A atmosfera possui um importante papel no transporte dos poluentes, já que os mesmos podem ser encontrados em áreas remotas da terra confirmando uma dispersão e deposição destes compostos em locais distantes de sua origem (Islam e Tanaka, 2004; Willian, 1996).

Há um contínuo intercâmbio de poluentes entre o solo, sedimentos, interface sedimento-água, águas intersticiais, interface água-ar e organismos aquáticos que podem levar ao acúmulo e/ou à transformação destes compostos no ambiente (Willian, 1996; Pérez-Ruzafa *et al.*, 2000).

Os contaminantes orgânicos são liberados no ambiente por diversas fontes incluindo atividades agrícolas, efluentes de indústrias químicas, petroquímicas e farmacêuticas, tinturas, combustão de óleo diesel e outros, e em menor parte por fontes naturais como infiltrações de petróleo e sua deposição, queima de florestas e vulcões (Liebe e Fock, 1992; Kirso e Irha, 1998; Nishigima *et al.*, 2001; Aleksieva *et al.*, 2002).

O acúmulo de poluentes está associado a dois processos chamados: bioconcentração ou bioacumulação, em que o poluente é absorvido e acumulado pelo organismo a partir do meio onde se encontra e biomagnificação, em que o poluente é transferido de um organismo a outro por meio da cadeia alimentar (Islam e Tanaka, 2004).

A acumulação de poluentes nos organismos aquáticos pode ocorrer por diferentes vias de absorção, como respiração, ingestão de alimentos contaminados ou de partículas suspensas na água, contato direto com membrana biológicas. Além disso, o processo de bioacumulação depende de vários fatores como velocidade de absorção, tipo de via de absorção, velocidade de eliminação, processos de biotransformação e metabolismo, da quantidade de lipídeos presentes no organismo, fatores físicos e/ou químicos do ambiente que podem aumentar ou diminuir a biodisponibilidade do poluente e da hidrofobicidade da substância (Van der Oost *et al.*, 2003; Fent, 2003; Moore *et al.*, 2004).

Geralmente os poluentes orgânicos são substâncias hidrofóbicas com baixa pressão de vapor e alto coeficiente de partição octanol/água (K_{ow}). O coeficiente de partição octanol/água (K_{ow}) é definido como a razão da concentração de uma substância química presente na fase octanol (fase orgânica) pela concentração dessa mesma substância presente na água (fase aquosa). Os valores de K_{ow} encontrados para diversos compostos químicos variam entre 10^{-3} e 10^7 e normalmente são expressos em escala logarítmica ($\log k_{ow}$). São muito utilizados para prever o potencial de bioacumulação de uma substância, pois quanto maior o valor de k_{ow} , maior a hidrofobicidade dessa substância e maior a sua capacidade em

se bioacumular nos organismos. Substâncias químicas com baixo valor de *kow* são prontamente solúveis e podem ser absorvidas por meio da ingestão pelos organismos, enquanto que substâncias químicas com alto valor de *kow* são descritas como hidrofóbicas e tendem a estar associada à matéria orgânica particulada, como por exemplo, adsorvidas aos sedimentos e/ou absorvida pelas membranas dos organismos aquáticos (Lu *et al.*, 2001; Islam e Tanaka, 2004). Em ambas as situações estes poluentes orgânicos atingem a biota aquática podendo causar efeitos tóxicos.

A biomagnificação está diretamente relacionada com as diversas etapas de bioacumulação que ocorrem ao longo da cadeia alimentar, ou seja, é o processo de transferência dos poluentes bioacumulados nos diferentes níveis tróficos o que pode ocasionar a presença de altas concentrações de poluentes em organismos do topo da cadeia. Isto implica em dizer que a medida da concentração do poluente em um determinado meio não expressa claramente o nível de poluição deste ambiente, uma vez que um organismo pode apresentar concentrações muito maiores de uma substância do que normalmente são encontradas no ambiente ou nas espécies que esse organismo se alimenta. Sendo assim, a biomagnificação constitui um sério risco para a fauna, flora e saúde humana (Van der Oost *et al.*, 2003; Fent, 2003; Moore *et al.*, 2004).

Apesar dos impactos antropogênicos sobre o sistema aquático serem vistos em sua maioria a partir de perspectivas físicas e químicas os estudos dos efeitos biológicos dos poluentes tornam-se mais significativo que apenas sua mera presença. Uma integrada abordagem envolvendo a concentração do poluente e sua

disponibilidade ao organismo, assim como as características físico-químicas do meio e o efeito deste poluente no organismo é necessária para avaliar os efeitos toxicológicos na contaminação do ecossistema (His *et al.*, 1999; Fent, 2003; Iscan, 2004).

Estas abordagens incluem diversos tipos de estudos como a utilização de modelos de relação quantitativa de estrutura e atividade (QSAR), os quais são baseados nas características físicas e químicas dos compostos (Lu *et al.*, 2001; Lu *et al.*, 2008) e modelos de relação quantitativa de atividade química inter-específica (QUICAR) em que prevê o efeito tóxico de um composto em um organismo específico baseado em dados de outras espécies relacionadas (Tremolada *et al.*, 2004).

Outra maneira de acompanhar a poluição aquática é utilizar organismos bioindicadores que são definidos como espécies ou grupos de espécies que respondem à poluição ambiental alterando suas funções bioquímicas e fisiológicas. A presença ou ausência de uma determinada espécie pode fornecer informações do ecossistema onde a mesma se encontra, pois certas espécies respondem a alterações ambientais, como o surgimento de poluentes, desaparecendo ou se multiplicando (Ferrat *et al.*, 2003).

Os bioindicadores fornecem informação do impacto e da progressão da ação antrópica no meio ambiente, além de servirem como uma alerta para o risco da saúde humana. Para uma espécie ser avaliada como bioindicador é necessário que ela seja relevante ecologicamente, amplamente distribuída, extensivamente estudada e sensível a variações ambientais (Ferrat *et al.*, 2003).

Muitos organismos como moluscos, peixes, crustáceos, poliquetos, macrófitas e outros podem ser utilizados para o monitoramento ambiental (Watanabe *et al.*, 1999; Samecka-Cymerman e Kempers, 2002; Venturini e Tommasi, 2004; Nicholson e Lam, 2005; Zhou *et al.*, 2008). No entanto, atualmente existem vários estudos considerando as algas como bioindicadores, uma vez que elas fazem parte da base da cadeia alimentar podendo transferir os poluentes aos níveis tróficos superiores (Rainbow, 1995; Ferrat *et al.*, 2003; Bengtson Nash *et al.*, 2005; Kuhn *et al.*, 2006; Torres *et al.*, 2008).

Para avaliar o potencial efeito tóxico dos poluentes, além dos bioindicadores, também são utilizados marcadores que sinalizam respostas dos organismos a agressões causadas por poluentes sendo uma forma antecipada de prever os efeitos destes poluentes no ambiente aquático antes que espécies desapareçam e/ou danos maiores ocorram. Desta maneira, o termo biomarcador é definido como um conjunto de mudanças na resposta biológica (molecular, bioquímica, celular e fisiológica) que denotam níveis de exposição e/ou efeitos que um organismo sofre quando exposto a uma substância tóxica (Peakall, 1994).

A escolha de um potencial biomarcador para o monitoramento de ambientes poluídos deve considerar alguns fatores, como o organismo a ser utilizado, a correlação das respostas em função da concentração dos poluentes, a facilidade de medida, a especificidade das respostas, entre outros. Vários parâmetros podem ser utilizados como biomarcadores sendo os mais comuns: enzimas de biotransformação de poluentes, metabólitos gerados no processo de biotransformação e parâmetros que indiquem estresse oxidativo (Van der Oost *et al.*, 2003; Zhou *et al.*, 2008).

1.2. Fenol

Dentre os poluentes orgânicos, o fenol encontra-se na lista dos mais representativos poluentes ambientais devido aos seus efeitos tóxicos e a grande quantidade presente no ambiente, pois está entre os 50 compostos químicos produzidos em maior quantidade no mundo, o que facilita a exposição dos organismos a esse poluente (Bergauer *et al.*, 2005; ATSDR, 2006).

O fenol é um hidrocarboneto aromático monosubstituído (figura 2) encontrado no ambiente por atividades antropogênicas e por fontes naturais. Seu grande uso é como intermediário na síntese de resinas e polímeros, como por exemplo, na produção do nylon e outras fibras sintéticas. O fenol também é utilizado em menor escala como fungicida e bactericida em soluções desinfetantes (ATSDR, 2006).

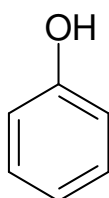


Figura 2. Fórmula estrutural do fenol.

A tabela 1 apresenta algumas propriedades físico-químicas do fenol, em que é possível notar que o fenol apresenta um baixo valor de $\log K_{ow}$ quando comparado aos hidrocarbonetos poliaromáticos ($\log k_{ow} > 5$) e é moderadamente solúvel, sendo assim, o fenol encontra-se em sua maior parte dissolvido na água podendo ser ingerido pelos organismos do meio onde se encontra (Kranoschekova *et al.*, 1992).

Tabela 1. Propriedades físicas e químicas do fenol

Propriedades	
Fórmula molecular	C ₆ H ₆ O
Massa molecular	94,12
Ponto de fusão	43°C
Ponto de ebulição	181,8°C
Densidade	1,0576
Solubilidade	87 g.L ⁻¹ a 25°C
Log Kow	1,46

Fonte: Toxicological Review for Phenol (U.S.EPA, 2000).

Aproximadamente 1,68 milhões de toneladas de fenóis foram manufaturados nos EUA apenas em 1992 e quantidades comparáveis são produzidas na Europa, Oriente e América. Efluentes do coque e da produção de carvão contêm grandes quantidades de fenol, catecol, resorcinol, o-, m-, p-cresol, xilenóis e outros fenóis substituídos (figura 3) podendo chegar a 6 g.L⁻¹ destes compostos (Semple e Cain, 1997; Bergauer *et al.*, 2005; ATSDR, 2006).

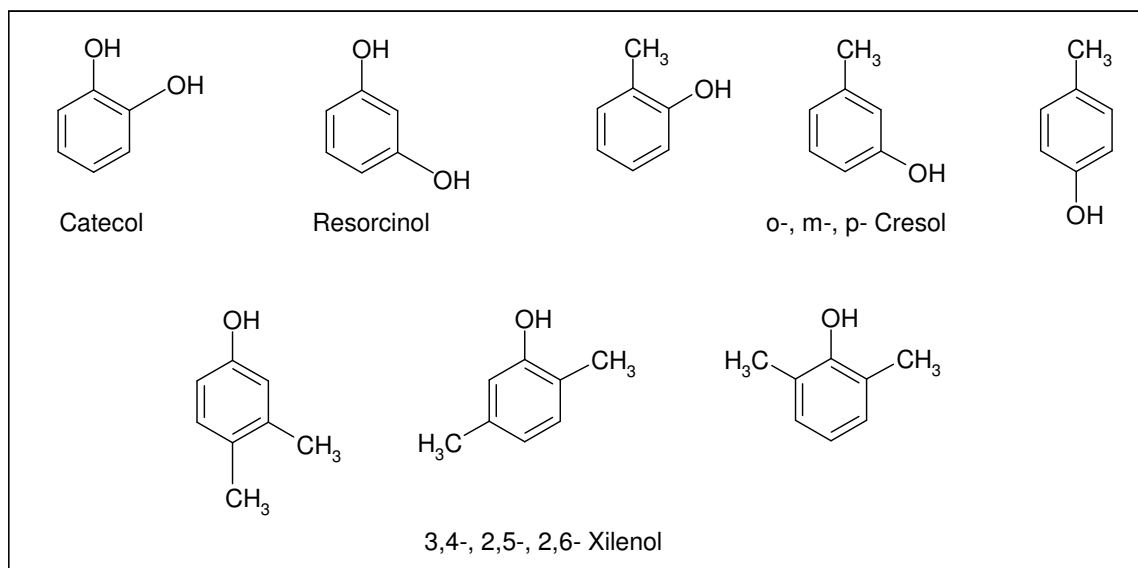


Figura 3. Estruturas químicas dos derivados fenólicos.

O homem pode sofrer exposição ao fenol por inalação, por contato com a pele e por ingestão. Os efeitos tóxicos relatados são dores de cabeça, irritação do trato respiratório, fraqueza, fadiga, dores e/ou tremores musculares, perda da coordenação, perda de peso, diarreia, arritmias cardíacas, entre outros, podendo levar a morte em caso de exposição a altas doses de fenol. O fenol não é classificado como carcinogênico para seres humanos (ATSDR, 2006). Os principais metabólitos do fenol, em seres humanos, ocorrem na forma conjugada com ácido glucurônico e com sulfato por meio da atividade das enzimas glucuronosiltransferases e sulfotransferases, respectivamente. Os principais sítios de conjugação do fenol são o fígado, o trato gastrointestinal, o pulmão e os rins. Também são encontrados em menor quantidade produtos de hidroxilação do fenol, como catecol e hidroquinona (ATSDR, 2006).

Existem várias agências estaduais e federais que regulamentam o uso do fenol como mostra a tabela 2. Os fenóis também se constituem em padrão de potabilidade de água, sendo imposto o limite máximo bastante restritivo de $0,001 \text{ mg.L}^{-1}$ (Portaria 1469 do Ministério da Saúde), pois em águas tratadas os fenóis podem reagir com o cloro livre formando os clorofenóis que produzem sabor e odor na água, além de produzir maior toxicidade aos organismos (CETESB, 2001).

Tabela 2. Limite máximo de fenol permitido por agências estaduais e federais

Agência	Limite máximo de fenol	Condições
OSHA/USA	5 ppm	exposição de trabalhadores pelo ar
EPA/USA	$3,5 \text{ mg.L}^{-1}$	ambiente aquático
Ministério do Meio Ambiente/Japão	$5,0 \text{ mg.L}^{-1}$	efluentes industriais
CETESB/São Paulo	$5,0 \text{ mg.L}^{-1}$	efluentes industriais

Fonte: ATSDR, 2005; Hirooka *et al.*, 2003.

Muitas vezes a quantidade de fenol nos efluentes são maiores que o permitido e por isso eles devem sofrer tratamento na própria unidade industrial de modo a reduzir o índice de fenóis. Para o tratamento de efluentes industriais contendo fenol existem vários métodos com diferentes capacidades de remoção e custo. Os mais utilizados são a adsorção, a oxidação química e o processo biológico. O tratamento biológico tem se mostrado viável economicamente, prático e eficaz e são realizados com bactérias, fungos, leveduras e em menor parte com algas, em modelos diversos de reatores e filtros biologicamente ativos (Mordocco *et al.*, 1999; Luke e Burton,

2001; Hidalgo *et al.*, 2002; Borde *et al.*, 2003; Bergauer *et al.*, 2005; Kusçu e Sponza, 2005; Nuhoglu e Yalcin, 2005).

1.3. Importância das algas

O termo alga engloba um diverso grupo de organismos aquáticos fotossintetizantes, pertencentes a reinos distintos, mas tendo em comum o fato de serem desprovidos de raízes, caules, folhas, flores e frutos e sem mecanismo específico de transporte de água e nutrientes. As algas são organismos de difícil classificação por apresentarem extrema diversidade de formas e cores sendo distinguidas pelo tipo e quantidade de pigmentos, composição da parede celular e outras estruturas celulares. Muitas vezes são chamadas de acordo com a coloração que exibem, por exemplo, algas verdes são aquelas que possuem como pigmento predominante a clorofila a e c; algas marrons as que possuem como pigmento predominante a fucoxantina; algas vermelhas as que possuem maior concentração de ficoeritrina. A maior parte das espécies de algas são unicelulares e chamadas de microalgas. Mas existem também as pluricelulares, chamadas de macroalgas, que podem atingir vários metros de comprimento.

As algas oferecem importantes contribuições ao meio ambiente uma vez que constituem a base da cadeia alimentar no ambiente aquático participando no processo de transferência de nutrientes para crustáceos, peixes e outros níveis tróficos marinhos e terrestres. Também são responsáveis por aproximadamente 50% da produção de oxigênio molecular, metade da atividade fotossintética global, e pela produção da maior parte de dimetil sulfeto que ao ser lançado para a atmosfera induz

a formação de nuvens (Gibson *et al.*, 1990; Stefelfs e Van Boekel, 1993; Day *et al.*, 1999). Desta forma as algas colaboram para o estabelecimento do chamado “balanço ecológico” no ambiente aquático promovendo uma maior biodiversidade ao meio onde se encontram (Rocha, 1992).

As algas também constituem em organismos promissores para a extração de substâncias com utilidade para as indústrias de fármacos, de cosméticos e de alimentos por produzirem uma ampla variedade de compostos químicos, originados de diferentes vias metabólicas, como diversos pigmentos (incluindo carotenóides, xantofilas e clorofilas), vitaminas, antioxidantes, ácidos graxos saturados e poliinsaturados, polissacarídeos (carragenana, proteoglicanos e ágar), esteróides, aminoácidos tipo micosporinas, toxinas, compostos halogenados, entre outros (Cardozo *et al.*, 2007; Rosenberg *et al.*; 2008).

No ambiente aquático as algas estão expostas a poluentes metálicos e orgânicos de forma crônica, baixas concentrações do poluente por um período longo, e de forma abrupta em que a alga recebe altas concentrações do poluente de uma única vez. Por sua pronta resposta ao estresse ambiental as algas vêm sendo utilizadas como bioindicadores de poluição aquática e também como bioremediadoras por possuírem enzimas específicas capazes de metabolizar os poluentes (Pinto *et al.*, 2003; Torres *et al.*, 2008; Zhou *et al.*, 2008).

1.3.1. Algas versus poluentes

Atualmente existem diversos estudos envolvendo algas e poluição aquática uma vez que as algas são formas abundantes de vida no meio aquático, estão

expostas aos poluentes ambientais e pertencem ao primeiro nível trófico da cadeia alimentar participando dos processos de bioacumulação e biomagnificação.

Punín Crespo e Lage Yusty (2004) utilizaram a macroalga *Himanthalia elongata* para avaliar a presença de hidrocarbonetos alifáticos na costa da Galícia na Espanha. Já a alga verde *Ulva lactuca* e a alga marrom *Padina pavonica* foram utilizadas para monitorar metais traços: Cd, Cr, Cu, Pb e Zn na área do golfo de Gaeta (mar de Tyrrhenian, Itália central) (Conti e Cecchetti, 2003).

Na costa da Bulgária, no Mar Negro, também houve a utilização de diversas espécies de algas como algas verdes: *Cladofora laetevirens*, *Ulva rigida*, *Enteromorpha intestinalis*, *Bryopsis plumosa*; algas marrons: *Cystoseira crinita*, *Cystoseira barbata*; algas vermelhas: *Ceramium rubrum*, *Corallina mediterranium*) para avaliar a contaminação por metais pesados (Jordanova *et al.*, 1999). A alga marrom *Lobophora variegata* também se mostrou eficiente para monitorar a contaminação por Ag, As, Cd, Co, Cr, Cu, Mn, Ni e Zn na Nova Caledônia (Hédouin *et al.*, 2008).

As algas possuem uma grande capacidade de absorção de metais. As microalgas *Chlorella vulgaris*, *Scenedesmus obliquus* e *Synechocystis* sp. foram capazes de absorver Cu, Ni, e Cr em concentrações acima de 250 mg.L⁻¹ (Dönmez *et al.*, 1999). Além dos metais anteriores, *Chlorella vulgaris* foi também capaz de se ligar fortemente a Mn e Zn podendo ser utilizada juntamente com processos químicos para o tratamento de efluentes contendo metais traços (López-Suárez *et al.*, 2000).

Travieso e colaboradores (2002) utilizaram a alga *Scenedesmus obliquus* na construção de um bioreator para a remoção de cobalto sendo observada uma remoção máxima de 94,5% em 10 dias quando a alga cresceu em presença de 3 mg.L⁻¹ de cobalto.

A alga *Isochrysis galbana* e o molusco *Mytilus edulis* foram utilizados para o estudo sobre a transferência e o processo de bioacumulação do poluente benzopireno. *M. edulis* foi alimentado com diversas concentrações de *I. galbana* previamente exposta também a diferentes concentrações de benzopireno. Foi observado um aumento na bioacumulação do benzopireno nos tecidos de *M. edulis* de acordo com a maior quantidade da microalga ingerida expostas a maiores quantidades do poluente. Nesta mesma situação houve um aumento na atividade da enzima benzopireno hidroxilase, envolvida no processo de detoxificação do benzopireno (Okay *et al.*, 2000).

Para avaliar o potencial tóxico de uma substância em um ambiente aquático são realizados testes de sobrevivência dos organismos frente à mesma. Nestes testes o organismo é exposto ao poluente e em seguida é determinada a concentração do mesmo que provoca a morte e/ou inibição de seu crescimento que podem ser determinados por contagem celular, fluorescência, inibição da fotossíntese. Também estão sendo desenvolvidos testes de toxicidade baseados na mobilidade e orientação de microlgas flageladas (Lewis, 1995; Kuhn *et al.*; 2006). Esses dados são utilizados por agências de proteção ambiental como o U.S. EPA, OECD (Organization for Economic Cooperation and Development) e a CETESB que

regulamentam a presença de substâncias químicas e o limite de concentração que pode ser encontrado no meio aquático (Lewis, 1995).

As microalgas *Selenastrum capricornutum*, *Chlorella vulgaris*, *Scenedesmus* sp. têm sido usadas para os testes de fitotoxicidade (Lewis, 1995). No entanto, há uma necessidade de obter informações com outras espécies de algas uma vez que espécies diferentes de microalgas respondem de maneira diferente aos compostos químicos. A espécie escolhida deve apresentar alta taxa de crescimento; repostas fisiológicas bem conhecidas quanto a fatores abióticos como radiação luminosa, temperatura, salinidade; necessidades nutricionais bem conhecidas e facilidade de cultivo em laboratório. Em áreas costeiras também podem ser utilizadas as microalgas: *Phaeodactylum tricornutum*, *Skeletonema costatum*, *Thalassiosira pseudonana*, *Dunaliella tertiolecta*, *Tetraselmis chuii*, *Isochrysis galbana*, *Chaetoceros calcitrans* e *Minutocellus polymorphus* (Aidar *et al.*, 2002).

Dentre as microalgas citadas acima, a diatomácea *Minutocellus polymorphus* mostrou-se sensível a vários poluentes como cloroanisols, pesticidas e metais pesados, sendo uma microalga que cresce rapidamente permitindo testes de toxicidade em 48 horas (Walsh *et al.*, 1988; Levy *et al.*, 2007).

1.3.2. Algas versus metabolização de compostos orgânicos

Outro papel das microalgas é o seu grande potencial no processo de biotransformação e biodegradação de contaminantes orgânicos aquáticos. A biodegradação de compostos orgânicos tem sido muito estudada em bactérias, fungos e leveduras, no entanto, há uma grande necessidade de se entender estes

processos em algas, já que elas constituem a base da cadeia alimentar e podem transferir os poluentes para outros níveis tróficos.

A biotransformação de poluentes em um determinado ambiente é feita por enzimas específicas que visam à conversão de produtos mais polares que podem não apresentar toxicidade ou serem mais tóxicos do que seu precursor. Por exemplo, na biotransformação de etil paration, um pesticida amplamente utilizado, pela alga *Pseudokirchneriella subcapitata* foi gerado metabólitos mais tóxicos ao contrário da metabolização de cumeno hidroperóxido realizado pela mesma alga (Andreozzi *et al.*, 2008).

A toxicidade de um composto também pode ser estimada pela sua velocidade da biotransformação, alguns compostos são prontamente metabolizados, já outros são resistentes a decomposição, como no caso de PCB. Poluentes que são rapidamente metabolizados gerando molécula(s) não tóxica(s) no ambiente, provavelmente não apresentam sérios riscos a um ecossistema (Hodgson e Smart, 2000).

O processo de biotransformação é descrito em três fases chamadas de Fase I, Fase II e Fase III (figura 4). Em geral, na Fase I ocorrem reações de oxidação, redução, hidroxilação, epoxidação promovidas pelas enzimas monooxigenases que possuem as subunidades citocromo P450 (hemeproteínas) ou flavina (flavoproteínas) e ainda esterases, desidrogenases e oxidases. As reações enzimáticas da Fase II envolvem glucuronidação, sulfonação, acetilação, metilação, conjugação com aminoácidos e conjugação com glutathione (GSH) pela atividade de glutathione-S-transferase (GST). A maioria das reações de Fase I e Fase II resultam em um

aumento do peso molecular e da polaridade dos poluentes que são excretados na Fase III com auxílio de proteínas transportadoras ligadas ao ATP, como por exemplo, a glicoproteína-P (Hodgson e Smart, 2000).

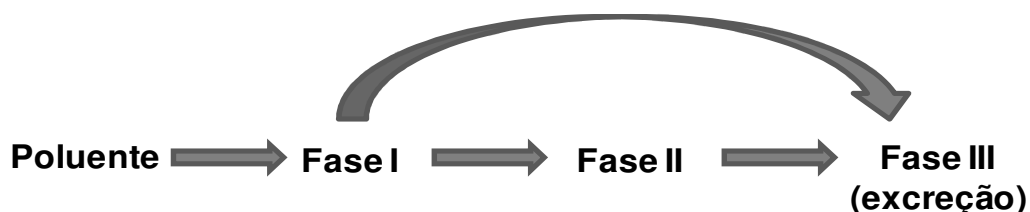


Figura 4. Fases do processo de biotransformação de poluentes nos organismos em geral. As reações da Fase II não necessariamente são precedidas pelas reações da Fase I.

Em organismos como fungos, bactérias e algas a degradação de compostos aromáticos para compostos alifáticos segue uma via de orto ou meta-clivagem e é realizada por monooxigenases contendo flavina. Os aromáticos são primeiramente convertidos para derivados de 1,2 diidroxibenzeno (catecol) por ação de uma hidroxilase. Estes catecóis sofrem uma clivagem do anel aromático adjacente ao grupo hidroxil vicinal (meta ou orto clivagem) gerando semialdeídos substituídos, 2-hidroxiuconato e derivados do ácido mucônico, desta vez por ação de uma catecol dioxigenase (figura 5) (Dagley *et al.*, 1960; Buswell, 1974; Neujahr e Kjellén, 1978; Semple *et al.*, 1999; Ahuatz-Chacón *et al.*, 2004; Alexieva *et al.*, 2004). A catecol 2,3-dioxigenase sofre inibição por 3-halocatecóis sendo um dos inibidores mais potentes o 3-clorocatecol (Klecka e Gibson, 1981; Bartels *et al.*, 1984).

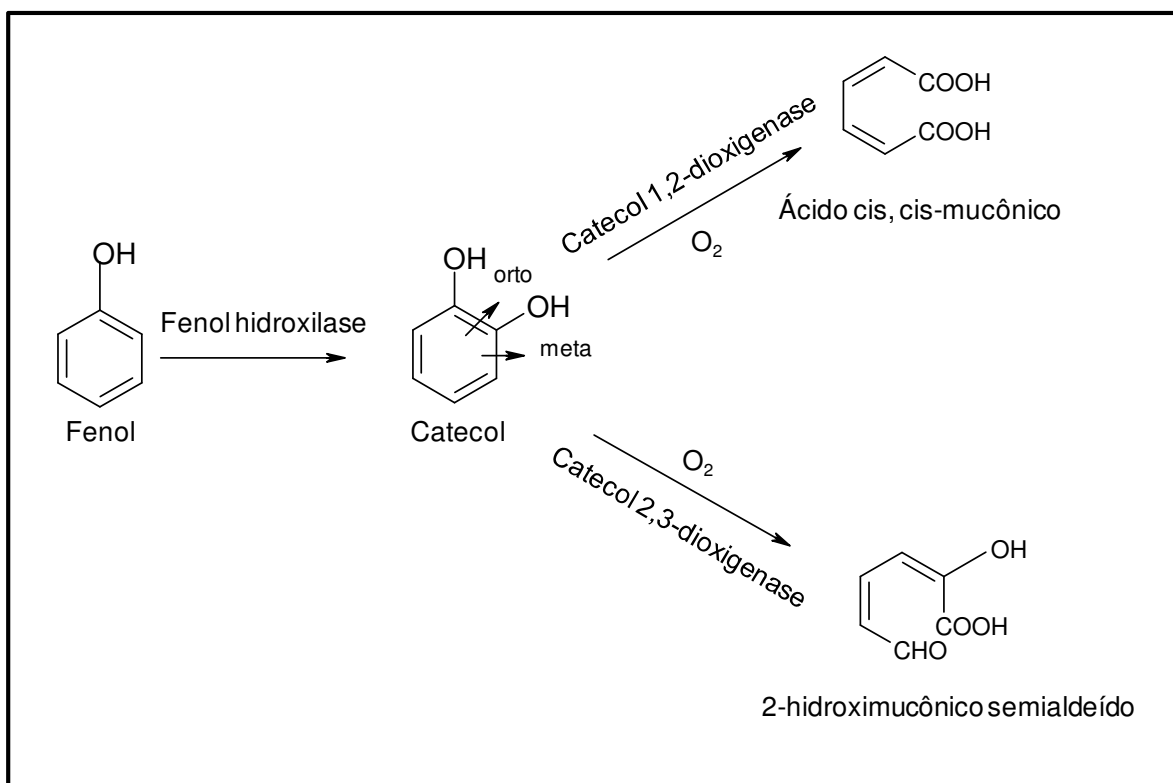


Figura 5. Reações envolvendo o metabolismo de compostos aromáticos em microorganismos (adaptado de Semple *et al.*, 1999).

Semple e Cain (1996) mostraram a biodegradação de fenóis pela alga eucariótica *Ochromonas danica*, que cresceu em presença de fenol como única fonte de carbono. Estudos confirmaram que as enzimas envolvidas no catabolismo do fenol foram induzidas e que a alga oxidou o fenol, sendo que a quantidade de oxigênio consumido por mol de substrato oxidado foi aproximadamente de 65%. O tratamento de *O. danica* ao ^{14}C -fenol mostrou metabolização completa com 65% na forma de $^{14}CO_2$, aproximadamente 15% no meio e o restante do ^{14}C incorporado na biomassa em proteínas, ácidos nucleicos e frações lipídicas. *O. danica* foi também

capaz de degradar misturas de xilenóis quando em presença de fenol (Semple e Cain, 1997).

As microalgas *Chlorella fusca* var. *vacuolata* e *Anabaena variabilis* removeram aproximadamente 90% de 40 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ de o-, m- nitrofenol; 2,4-dinitrofenol (DNP) e bisfenol-A em um período de 5 dias, mas não apresentaram remoção significativa de o-, p-clorofenol e 2,4-diclorofenol (Hirooka *et al.*, 2003). Em outro estudo, *Chlorella fusca* var. *vacuolata* foi capaz de remover bisfenol-A em concentrações que variaram de 10 a 80 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ em um cultivo de 7 dias sob luz contínua, sendo ainda identificado o monohidroxibisfenol-A como intermediário do processo de biodegradação. O bisfenol-A, utilizado para a produção de resinas e encontrado nos despejos industriais, apresenta alta toxicidade aos organismos por ser um desregulador do sistema endócrino (Hirooka *et al.* 2005).

Ainda foram encontrados também metabólitos glicosilados do Bisfenol-A. Nas microalgas *Pseudokirchneriella subcapitata*, *Scenedesmus acutus*, *Scenedesmus quadricauda* foi identificado como produto de degradação do bisfenol-A o composto bisfenol-A-mono-O- β -D-glicopiranosídeo e na microalga *Coelastrum reticulatum* o bisfenol-A-mono-O- β -D-galactopiranosídeo. Ambos os metabólitos foram excretados para o meio de cultura (Nakajima *et al.*, 2007).

O naftaleno, hidrocarboneto poliaromático possuindo dois anéis aromáticos, foi metabolizado por 18 espécies de algas entre elas cianobactérias, algas verdes, vermelhas e pardas. No tratamento destas algas com ^{14}C -naftaleno foi encontrado os metabólitos: 1-naftol, 4-hidroxi-1-tetralone, cis-naftaleno diidrodiool e trans- naftaleno diidrodiool (Cerniglia *et al.*, 1980). Espécies de diatomáceas isoladas da região do

Alaska *Navícula* sp., *Nitzschia* sp. e *Synedra* sp. também foram capazes de oxidar o naftaleno em baixas temperaturas (Cerniglia *et al.*, 1982).

Benzopireno (BaP) foi consumido por algas marrom (*Fucus vesiculosos* e *Chorda filum*), alga vermelha (*Furcellaria lumbricalis*) e alga verde (*Cladophora glomerata*), sendo que 89-99% do BaP foi encontrado na biomassa de *Fucus vesiculosos*. Para as algas verdes a proporção de transformação de BaP foi de 42-49%. Os sistemas enzimáticos mais importantes para a detoxificação de BaP foram: o-difenol oxidase, citocromo p450 e peroxidases (Kirso e Irha, 1998).

As macroalgas *Lessonia nigrescens* Bory e *Macrocystis integrifolia* Bory foram capazes de adsorver o fenol em cerca de 10% e 35%, respectivamente, em meio de cultura com pH 10. As macroalgas possuem diversos polissacarídeos, como os alginatos, que podem se ligar ao fenol sendo esta adsorção dependente do pH do meio. Navarro e colaboradores (2008) sugerem o uso destas macroalgas para a remoção de fenol e seus derivados em despejos industriais (Navarro *et al.*, 2008).

Na tabela 3 estão apresentados mais alguns exemplos de biodegradação por algas. Estes diversos estudos mostraram uma alta capacidade das algas em transformar poluentes, como uma forma de defesa e eliminação e até mesmo como fonte de carbono e nitrogênio.

Tabela 3. Exemplos de biodegradação de compostos tóxicos por algas.

Alga	Composto	Degradação	Referência
<i>Prototheca zopfii</i>	Óleo combustível e petróleo bruto	10% a 40%	Walker <i>et al.</i> , 1975
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	Partículas de óleo diesel	4,3 a 95,2%	Liebe e Fock, 1992
<i>Chlorella vulgaris</i> , <i>Chlorella pyrenoidosa</i>	Corantes azo (Eriochrome blueSE and blackT), Anilina	Não especificado	Jinqi e Hountian, 1992
<i>Selenastrum capricornutum</i> , <i>Scenedesmus acutus</i> , <i>Ankistrodesmus braunii</i>	Benzopireno	Não especificado	Warshawsky <i>et al.</i> , 1995
<i>Anabaena</i> sp.	2,4,6-Trinitrotolueno	97%	Pavlostathis e Jackson, 2002
<i>Skeletonema costatum</i>	2,4-Diclorofenol (2,4-DCP)	19,2%	Yang <i>et al.</i> , 2002
<i>Stichococcus bacillaris</i>	Ácido sinápico	8-26%	DellaGreca <i>et al.</i> , 2003
<i>Ankistrodesmus braunii</i>	Ácido sinápico	5-75%	DellaGreca <i>et al.</i> , 2003
<i>Chlorella vulgaris</i> <i>Chlorella</i> VT-1	Fenol	~100%	Scragg, 2006
<i>Tetraselmis marina</i>	p-Clorofenol	65%	Petroutsos <i>et al.</i> , 2007
<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i> <i>Chlorococcum</i> sp.	Fenamifos e derivados	Não especificado	Cáceres <i>et al.</i> , 2008

O processo de bioacumulação e biotransformação de poluentes por algas também pode ser afetado por fatores abióticos ambientais tais como luz, pH do meio, temperatura, quantidade de CO₂ dissolvida, pois estes fatores podem alterar a fisiologia e o crescimento da alga, assim como as propriedades físicas do poluente tal como a solubilidade (Newsted, 2004; Tukaj e Aksmann, 2007; Wang *et al.*, 2008). A influência do pH, luz e temperatura na bioacumulação de fenol foi verificada na microalga *Selenastrum capricornutum* sendo o fator de bioconcentração do fenol maior em pH entre 6 a 8, em temperatura de 12 °C a 16°C e na ausência de luz (Newsted, 2004).

1.3.3. Algas *versus* estresse oxidativo

É sabido que a exposição de animais, plantas e microorganismos aos poluentes provocam um aumento na concentração celular de espécies radicalares. O equilíbrio entre a formação e a remoção de espécies radicalares no organismo dever ser finamente regulado de modo que as reações e processos metabólicos dependentes das mesmas possam ocorrer em um nível adequado para a manutenção da fisiologia celular. O desequilíbrio entre a formação e a remoção dos radicais livres no organismo, decorrente seja da diminuição dos antioxidantes endógenos, devido à menor formação ou maior consumo, ou do aumento da geração de espécies antioxidantes, gera um estado pró-oxidante que favorece a ocorrência de lesões oxidativas em macromoléculas e estruturas celulares, podendo resultar inclusive na morte celular (Van der Oost *et al.*, 2003; Moore *et al.*, 2004; Halliwell e Gutteridge, 2007).

Radical livre é qualquer espécie química capaz de existir independentemente, que contenha um ou mais elétrons não pareados. Em geral, estas espécies são instáveis, têm meia vida muito curta (podendo variar desde nanossegundos a alguns minutos), e reagem rapidamente com diversos compostos e alvos celulares como lipídeos de membranas, carboidratos, proteínas e ácidos nucleicos (Rice-Evans *et al.*, 1991; Halliwell e Gutteridge, 2007).

As reações radicalares ocorrem em três etapas denominadas de iniciação, propagação e término, como no caso do processo de lipoperoxidação em que uma molécula de ácido graxo é oxidada por uma espécie iniciadora ($\cdot\text{OH}$, por exemplo) gerando um radical livre que pode novamente reagir com oxigênio e/ou com outras moléculas de ácidos graxos propagando a formação destes radicais livres (figura 6) O término ocorre quando duas espécies radicalares reagem entre si ou quando são interceptadas por substâncias protetoras (Rice-Evans *et al.*, 1991; Halliwell e Gutteridge, 2007).

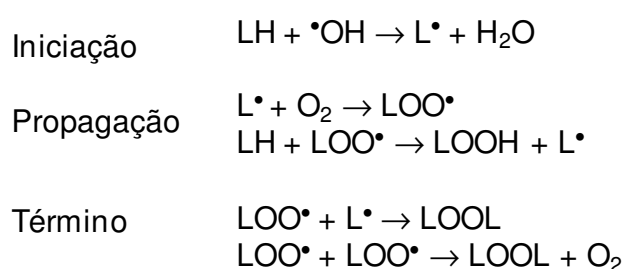
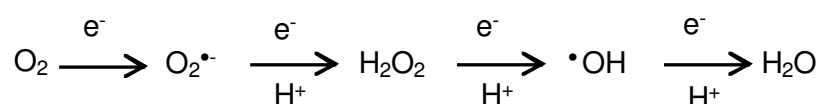
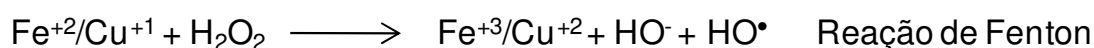
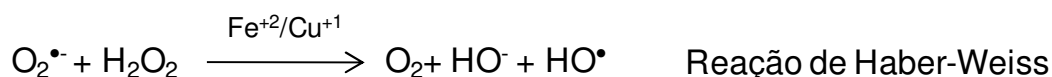


Figura 6. Reações presentes no processo de lipoperoxidação (LH: ácido graxo insaturado, $\text{L}\cdot$: radical lipídico, $\text{LOO}\cdot$: radical peroxil, LOOL: hidroperóxido lipídico).

O oxigênio molecular (O_2) pode gerar diversas espécies reativas, chamadas espécies reativas de oxigênio (ERO) seja por absorção de energia ou por transferência de elétrons. No processo de redução do oxigênio a água podem ser formados ERO devido a transferência unieletrônica de 4 elétrons promovendo o aparecimento do radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$), do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e do radical hidroxila ($\bullet OH$), conforme o esquema abaixo (Halliwell e Gutteridge, 2007):



O radical hidroxila ($\bullet OH$) é altamente reativo e com alto potencial deletério podendo ser gerado em presença de metais de transição (Fe^{+2} , Cu^{+1} , Mn^{+2}) pela redução de $O_2^{\bullet-}$ e/ou na decomposição de H_2O_2 (reação de Haber-Weiss e reação de Fenton) Halliwell e Gutteridge, 2007):



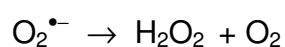
A toxicidade do oxigênio decorre da formação destas espécies reativas que podem interagir com diversas biomoléculas e lesar diferentes estruturas celulares. Em condições normais, a concentração destas espécies dentro das células é baixa pelo fato de existir uma manutenção do equilíbrio entre produção e remoção de ERO

nos organismos, que desenvolveram respostas adaptativas como forma de defesa antioxidante (Rice-Evans *et al.*, 1991; Halliwell e Gutteridge, 2007).

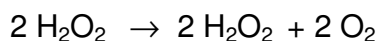
Os antioxidantes são compostos que protegem os sistemas biológicos contra os efeitos potencialmente danosos de processos ou reações que promovem a oxidação de macromoléculas ou estruturas celulares. Eles podem agir impedindo a formação de espécies reativas ou seqüestrando-as de forma a impedir sua interação com alvos celulares, bloqueando a etapa de iniciação da cadeia radicalar, ou ainda com mecanismos de reparo aos danos causados pelas ERO (Rice-Evans *et al.*, 1991; Halliwell e Gutteridge, 2007).

O sistema de defesa antioxidante compreende uma gama variada de substâncias que atuam em diferentes níveis. Entre as substâncias que fazem parte do sistema não-enzimático de defesa antioxidante encontram-se as vitaminas C e E, glutathiona, carotenóides, flavonóides, bilirrubina, ácido úrico, tióis e proteínas plasmáticas. Já os mecanismos enzimáticos de defesa antioxidante referem-se às enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase e peroxidases, responsáveis pela manutenção do equilíbrio entre a produção e remoção de ERO, essencial à sobrevivência dos seres aeróbios.

A SOD é encontrada nas membranas tilacoidais e citoplasma (CuZnSOD), na mitocôndria (MnSOD) e nos cloroplastos (FeSOD) (Fridovich, 1978; Fridovich, 1986). Faz parte da primeira linha de defesa enzimática frente às ERO, sendo responsável pela dismutação do $O_2^{\bullet-}$, participando da seguinte reação (Pryor, 1966):



A enzima catalase é uma hemoproteína presente nos peroxissomos com alta especificidade na detoxificação do H₂O₂ e não atuando sobre peróxidos orgânicos, conforme reação a seguir (Aebi, 1984):



Ao processo de redução do H₂O₂ à água também atuam a enzima ascorbato peroxidase (APx), presente nos cloroplastos e a glutatona peroxidase (GPx) encontrada no citossol. A GPx pode também agir sobre os peróxidos orgânicos como lipoperóxidos (ROOH) e seus álcoois correspondentes (ROH) (Nakano e Asada, 1981; Asada, 1984; Flohé e Gunzler, 1984).

Como uma importante defesa antioxidante não enzimática presente nas células contra as ERO, tem-se o tripeptídeo δ-glutamil-cistenil-glicina chamado de glutatona (GSH) com alto poder redutor participando na detoxificação de peróxidos juntamente com a glutatona peroxidase ou reciclando o ascorbato para a atividade de APx. A GSH também possui um importante papel na biotransformação de poluentes sendo conjugada aos poluentes e/ou seus metabólitos pela ação da glutatona S-transferase (GST) (Reed, 1990).

Outra classe de defesa não enzimática frente aos radicais livres são os carotenóides, biossintetizados por plantas e algas, que constituem uma ampla classe de tetraterpenos insaturados (Britton, 1995; Pinto *et al.*, 2000). As propriedades estruturais conferem aos carotenóides relevantes funções biológicas na natureza, sendo a atividade antioxidante uma das mais importantes delas. Os carotenóides são efetivos sequestrantes da maioria dos radicais livres em razão da sua cadeia de polienos (Pinto *et al.*, 2000).

A exposição crônica da microalga de *Lingulodinium polyedrum* a metais como Hg^{+2} , Cd^{+2} , Pb^{+2} e Cu^{+2} induziu a atividade de SOD e APx, aumentou a concentração de glutathiona e diminuiu a concentração do pigmento peridina presente nesta alga. Já na exposição de forma aguda a esses mesmos metais houve uma diminuição do conteúdo de GSH e pequeno aumento na atividade destas enzimas oxidantes sugerindo que num estresse agudo grande quantidade de ERO é formada excedendo a capacidade antioxidante da célula (Okamoto *et al.*, 2001a).

Outros trabalhos com algas expostas a poluentes orgânicos e metálicos mostram a indução de atividade da SOD, como no caso das microalgas *Tetraselmis gracilis* e *L. polyedrum* expostas a metais (Okamoto *et al.*, 1996; Okamoto and Colepicolo, 1998) e a bifenilas policloradas (PCB) (Leitão *et al.*, 2003). Uma indução da SOD juntamente com indução de APx também foi demonstrada na alga *Kappaphycus alvarezii* tratada com clofibrato (Barros *et al.*, 2003).

Diversos estudos sobre a atividade da SOD são relatados em algas em 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 *Lingulodinium polyedrum* (Colepicolo *et al.*, 1992), assim como variações ao longo da fase exponencial e estacionária de crescimento das microalgas *Tetraselmis gracilis*, *Minutocellus polymorphus* e *L. polyedrum* (Sigaud-Kutner *et al.*, 2002; Sigaud-Kutner *et al.*, 2005). Os mecanismos regulatórios de expressão da SOD em diferentes dinoflagelados também já foram descritos (Okamoto *et al.*, 2001b).

Durante a metabolização de 2,4-diclorofenol (2,4-DCP) pela diatomácea *Skeletonema costatum* foi evidenciado um aumento da atividade de glutathione S-transferase, ascorbato peroxidase (APx) e superóxido dismutase (SOD) a uma exposição de 96 horas ao 2,4-DCP. Neste mesmo estudo, a adição de glutathione no meio de cultura promoveu um maior crescimento de *S. costatum* e aumentou a degradação de 2,4-DCP e com a inibição da síntese de glutathione, utilizando butionina sulfoximina (BSO), foi observado uma maior toxicidade do 2,4-DCP sugerindo que o processo de conjugação com a glutathione foi um dos principais mecanismos envolvidos na degradação do 2,4-DCP (Yang *et al.*, 2002).

Na costa noroeste de Portugal foram coletadas em diferentes locais diversas espécies de *Fucus* que apresentaram maior atividade de glutathione S-transferase em áreas contaminadas. O estudo sugere a utilização de *Fucus* spp. como bioindicador e de glutathione S-transferase como biomarcador na contaminação ambiental de zonas costeiras (Cairrão *et al.*; 2004).

O estresse oxidativo também foi avaliado no processo de transferência e bioacumulação do hexaclorobenzeno (HCB) no caranguejo *Chasmagnathus granulatus* alimentado com a microalga *Chlorella Kessleri* previamente exposta ao poluente. O HCB foi encontrado no hepatopancreas de *C. granulatus* após 3 dias de exposição, sendo a microalga a única fonte do poluente indicando que ocorre a transferência direta do HCB de *C. Kessleri* para o *C. granulatus*. Na primeira semana de tratamento de *C. Kessleri* com HCB ocorreu um aumento da lipoperoxidação, detectada através dos níveis de malondialdeído; uma redução dos níveis de glutathione e um aumento da atividade de SOD. Os níveis de glutathione voltaram ao

normal na segunda semana de tratamento indicando que *C. Kessleri* utilizou glutathione no processo de detoxificação de HCB e também para proteger os componentes celulares do estresse oxidativo causado. Com a exposição crônica o organismo foi capaz de se reestabelecer diminuindo os níveis de MDA e também da atividade de SOD (Chaufan *et al.*, 2006).

A toxicidade dos poluentes pode também ser aumentada por fatores abióticos ambientais. A radiação ultravioleta foi capaz de aumentar a toxicidade dos hidrocarbontes poliaromáticos fenantreno, antraceno, fluorantreno e pireno na diatomácea marinha *Phaeodactylum tricornutum* diminuindo o valor de EC₅₀ em 72 horas e aumentando a concentração de MDA (Wang *et al.*, 2008). Na microalga *Scenedesmus armatus* crescendo em altas concentrações de CO₂ e expostas aos poluentes antraquinona e fenatrenoquinona foi observado uma inibição do crescimento deste organismo e um aumento da atividade de SOD (Tukaj e Aksmann, 2007).

O estresse oxidativo representa a potencial toxicidade do poluente aos organismos aquáticos e seus parâmetros, como o sistema de defesa antioxidante, podem ser utilizados como biomarcador da contaminação ambiental.

2. Objetivos

2.1. Objetivo geral

O objetivo deste trabalho foi verificar a metabolização do fenol na microalga *Minutocellus polymorphus* e avaliar o estresse oxidativo causado por este poluente.

2.2. Objetivos específicos

- ❖ Cultivo e manutenção da microalga *Minutocellus polymorphus*.
- ❖ Determinar o valor de inibição de crescimento (IC_{50} e IC_{20}) em *M. polymorphus* frente ao poluente fenol.
- ❖ Determinar o efeito do fenol sobre o sistema antioxidante por meio das enzimas: SOD, catalase, APx, deidroascorbato redutase (DHAR), GPx e glutathiona redutase (GR).
- ❖ Avaliar o efeito do fenol sobre o estresse oxidativo através da quantificação dos níveis de glutathiona reduzida e glutathiona oxidada (GSH/GSSG), pigmentos e também malondialdeído (MDA), indicativo de lipoperoxidação, por cromatografia líquida de alta eficiência com detector eletroquímico, *photodiode array* e fluorescência, respectivamente.
- ❖ Determinar a atividade de enzimas envolvidas no processo de detoxificação e biotransformação do poluente fenol como a GST, fenol hidroxilase e catecol dioxigenase.
- ❖ Acompanhar a metabolização do fenol.

3. Materiais e Métodos

3.1. Cultivo da microalga

A linhagem da microalga *M. polymorphus* proveniente da região de Cabo Frio (RJ) foi obtida do Banco de Algas do Instituto Oceanográfico da USP e é mantida em cultura em nosso laboratório. A manutenção da cultura da alga foi feita em meio Guillard f/2 (Guillard e Rhyther, 1962; Guillard, 1975) que consiste de água do mar filtrada e autoclavada, enriquecida com nitrato, fosfato, silicato, metais-traço e vitaminas. Os frascos de cultura foram mantidos em incubadoras (Precision Scientific, modelo 818) com ciclos de 12 horas claro (luz branca fluorescente, $120 \mu\text{mol}\cdot\text{quanta}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) e 12 horas escuro a uma temperatura de $20 \pm 1^\circ\text{C}$. A intensidade luminosa foi medida por meio de um quantameter - sensor plano, modelo PMA 2200 – Photometer/Radiometer). As culturas foram mantidas em bom estado fisiológico nestas condições, sendo agitadas diariamente e repicadas semanalmente partindo-se de culturas parentais não axênicas (unialgais) por várias gerações antes dos experimentos.

3.2. Determinação da curva de crescimento

Para a determinação da curva de crescimento foram feitas culturas em triplicatas com densidade inicial de 5×10^4 células/mL sendo o desenvolvimento algal monitorado ao longo dos dias.

3.2.1. Curva de crescimento por contagem celular

Alíquotas de cerca de 1 mL de cada frasco experimental foram coletadas nos dias 0 (inóculo), 3, 7, 10, 14, 17, 21 e 24, sendo fixadas com lugol para posterior

contagem em hemocitômetros do tipo Fuchs Rosenthal Ultra Plane (Hausser Scientific Partnership Horsham), sob microscópio óptico (Nikon Type 120, Eclipse E600). A curva de crescimento foi construída a partir dos valores médios de densidade celular em função do tempo.

3.2.2. Curva de crescimento por fluorescência da clorofila

Alíquotas de cerca de 1 mL de cada frasco experimental foram coletadas diariamente entre 4 e 7 horas após o início de exposição à luz para medir a fluorescência *in vivo* da clorofila. Para isto, foi utilizado um espectrofluorímetro (modelo Hitachi® Spectrofluorimeter F-4500) ajustado para comprimento de onda de excitação (λ_{exc}) em 460 nm verificando-se a emissão em um comprimento de onda (λ_{em}) de 680 nm. Para a construção da curva foram utilizados os valores de áreas de fluorescência emitida em 680 nm em função do tempo. O espectrofluorímetro também foi ajustado com a tensão fotomultiplicadora em 900 V, com 5 mm de abertura de fenda e com velocidade de varredura de 5 nm.s^{-1} .

3.3. Determinação da inibição do crescimento

O teste de inibição de crescimento (IC) foi realizado segundo normas de agências de controle ambiental como o U.S. EPA (1971), a OECD (1984) e o IBAMA (Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis) (1988). Utilizou-se uma cultura de densidade inicial de 1×10^6 células/ml submetida a diferentes concentrações do poluente fenol (0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5; 3,0; 3,5 mmol.L^{-1}) e também uma cultura de mesma densidade usada como controle, sem adição de

fenol. Foram retiradas alíquotas no tempo 0h, momento do inóculo das células e substância teste e 48 h depois. As células foram contadas em hemocitômetros do tipo Fuchs Rosenthal, sob microscópio óptico. Os valores do IC₅₀ e IC₂₀, concentração que inibe 50% e 20% do crescimento celular, respectivamente, foram determinados de acordo com os programas estatísticos ICP (Inhibition Concentration Percentage) e Sperman-karber.

3.4. Montagem experimental

Os experimentos foram realizados em seis frascos erlenmeyeres de 2800 mL contendo 2400 mL de cultura de *M. polymorphus* com densidade inicial de 1×10^6 células/mL, dos quais três serviram como controle e três receberam tratamento com fenol, sendo que a concentração de fenol utilizada foi de $1,5 \text{ mmol.L}^{-1}$ determinada no item 3.3 como IC₂₀ em 48h. As culturas foram mantidas em incubadoras nas condições estabelecidas no item 3.1 por um período de 48 h, após o término deste período de exposição procedeu-se a coleta das células.

As culturas sofreram uma primeira centrifugação (centrífuga Du Pont Sorvall[®] RC-5B Refrigerated Superspeed; rotor Sorval GSA[®]) a 10.000 rpm durante 20 min sob 4°C, em frascos plásticos contendo 200 mL de cultura cada um. Após a centrifugação retirou-se o excesso de meio de cultura com auxílio de uma trompa d'água e o precipitado de células foi então ressuspendido com o restante de meio de cultura ($\pm 0,5 \text{ mL}$), grupo controle e grupo tratado com fenol, ainda presente no frasco plástico que foi mantido sobre o gelo. O volume de cada dois frascos plásticos (total de $\pm 1 \text{ mL}$) foi colocado em um microtubo eppendorf[®] previamente identificado,

resfriado e pesado o qual sofreu uma segunda centrifugação (centrífuga Jouan[®], modelo A14) a 10.000 rpm durante 5 min a 4 °C. O sobrenadante foi retirado e cada microtubo eppendorf[®] com o precipitado de células foi novamente pesado com o objetivo de obter a massa fresca (aproximadamente 100 mg de peso fresco). Em seguida os microtubos foram então congelados em nitrogênio líquido por 1 min e estocados em freezer -80°C (-86°C ULT Freezer, Thermo Forma 8525 Scientific[®]) para posteriores análises.

Para acompanhar a atividade das enzimas fenol hidroxilase, catecol 1,2-dioxigenase e catecol 2,3-dioxigenase cultivou-se a microalga *M. polymorphus* nas mesmas condições anteriores (densidade inicial de 1×10^6 células/mL exposta a $1,5 \text{ mmol.L}^{-1}$ de fenol) por 6 dias, sendo as amostras coletadas no dia 0 (inóculo), 2, 4, e 6.

3.5. Ensaio enzimáticos

Para verificar a atividade enzimática o precipitado de células foi ressuspendido em 1 mL de tampão fosfato de sódio 100 mmol.L^{-1} pH 7,0 e em seguida rompido em um sonicador (Branson Sonifier 250TM) com amplitude de 15%. As células foram submetidas a pulsos de ultrassom por 6 períodos de 20 s, separados entre si por um tempo de 10 s. Durante este processo as células foram mantidas em banho de gelo, evitando assim um aumento de temperatura.

Após o rompimento celular as amostras foram centrifugadas (centrífuga Jouan[®], modelo A14) a 10.000 rpm durante 5 min a 4 °C. O sobrenadante considerado como extrato bruto celular foi utilizado nos ensaios enzimáticos, sendo

preparado no dia da análise. O monitoramento das reações foi feito em cubetas de quartzo utilizando-se um espectrofotômetro UV-Visível da Shimadzu[®], modelo UV-1650.

3.5.1. Superóxido dismutase

Para a determinação da atividade específica total da SOD utilizou-se o método descrito por McCord e Fridovich, 1968 e Flohé e Ötting, 1984. A atividade enzimática da SOD pode ser monitorada por sua habilidade em inibir a reação de redução do citocromo c pelo $O_2^{\bullet-}$, este último sendo gerado pelo sistema xantina/xantina oxidase, sob condições aeróbias (figura 7). Assim o Fe^{+3} , pertencente à molécula de citocromo c é reduzido a Fe^{+2} . Esta redução pode ser visualizada espectrofotometricamente a 550 nm, comprimento de onda de máxima absorbância do cit.c- Fe^{+2} . O meio de reação foi composto por $50 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de xantina (Sigma[®]), $20 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de citocromo c (Sigma[®]), volumes variados de extrato celular e tampão fosfato $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$, pH 7,8. A reação foi iniciada pela adição de $0,2 \text{ U/mL}$ de xantina oxidase (Sigma[®]). O aumento de absorbância foi monitorado por 1 min a 550 nm em uma temperatura de 25°C . Para verificar uma possível redução do citocromo c pela amostra foi realizado o mesmo procedimento anterior sem a adição de xantina oxidase.

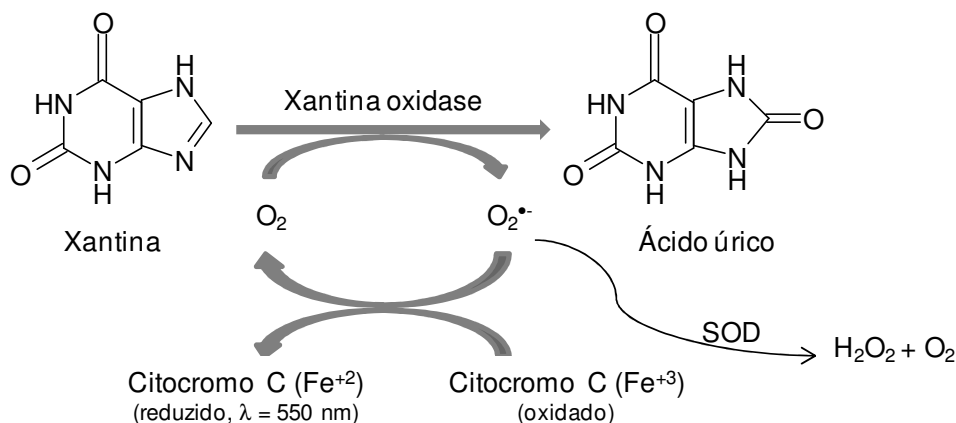


Figura 7. Produção de $O_2^{\bullet-}$ pelo sistema xantina/xantina oxidase.

Neste ensaio, uma unidade de atividade de SOD é definida como a aquela capaz de inibir em 50% a redução do citocromo c, por minuto, a 25°C e em pH 7,8. A atividade específica de SOD foi expressa em U/mg de proteína.

3.5.2. Catalase

A atividade da catalase foi monitorada diretamente por meio da decomposição do H_2O_2 em 240 nm durante 100 segundos a 25°C (Aebi, 1984). A composição do meio reacional na cubeta foi: 100 μL de amostra; 10 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ de H_2O_2 (Merck[®]); completando-se para 500 μL com tampão fosfato de sódio 50 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ pH 7,0.

A atividade específica de catalase pode ser definida em termos da quantidade de H_2O_2 consumida por minuto a 20°C em pH 7,0 por unidade de proteína. Essa atividade pode ser calculada a partir do coeficiente de extinção molar do H_2O_2 a 240 nm, assumindo $\epsilon_{240} = 0,0394 \text{ mmol}^{-1}\cdot\text{L}\cdot\text{cm}^{-1}$.

3.5.3. Glutathione peroxidase

A atividade da GPx foi realizada segundo Flohé e Gunzler (1984). O método consiste em monitorar a oxidação do NADPH a 340 nm por 5 min associado à redução de GSSG. Essa redução é catalisada pela GR adicionada ao meio de reação. A GSSG, por sua vez, foi gerada a partir de GSH em presença de terc-butil hidroperóxido (t-BuOOH) numa reação catalisada pela GPx. O meio de reação na cubeta foi composto por NADPH 200 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ (Sigma[®]); GSH 1 mmol.L^{-1} (Sigma[®]); GR 0,24 U/mL (Sigma[®]), tampão fosfato de sódio 0,1 mol.L^{-1} pH 7,0 contendo 1 mmol.L^{-1} de EDTA e a amostra. A reação foi iniciada pela adição de 1 mmol.L^{-1} de t-BuOOH (Sigma[®]).

Uma unidade de GPx foi definida como a quantidade de enzima que catalisa a oxidação de 1 μmol de NADPH ($\epsilon_{340} = 6.220 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{cm}^{-1}$) por minuto a 25°C em pH 7,0.

3.5.4. Glutathione reductase

A determinação da atividade da GR foi realizada monitorando a oxidação de 200 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ NADPH a 340 nm por 2 min utilizando 1 mmol.L^{-1} de GSSG (Sigma[®]). Uma unidade de GR foi definida como a quantidade de enzima que catalisa a oxidação de 1 μmol de NADPH ($\epsilon_{340} = 6.220 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{cm}^{-1}$) por minuto a 30°C em tampão fosfato de sódio 0,1 mol.L^{-1} pH 7,0 contendo 1 mmol.L^{-1} de EDTA (Calberg e Mannervik, 1975).

3.5.5. Glutathiona S-transferase

A reação entre 1-cloro-2,4 dinitrobenzeno (CDNB) e GSH catalisada pela GST (figura 8) é monitorada pela formação do complexo CDNB-GSH em 340 nm por 5 min. O meio de reação foi composto por 1 mmol.L⁻¹ de CDNB, 1 mmol.L⁻¹ de GSH, tampão fosfato de sódio 0,1 mol.L⁻¹ pH 6,5 e amostra. Uma unidade de GST representa a quantidade de enzima que catalisa a formação de 1 μmol do complexo CDNB-GSH ($\epsilon_{340} = 9,6 \text{ mmol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{cm}^{-1}$) por minuto a 25°C em pH 6,5 (Habig *et al.*, 1974).

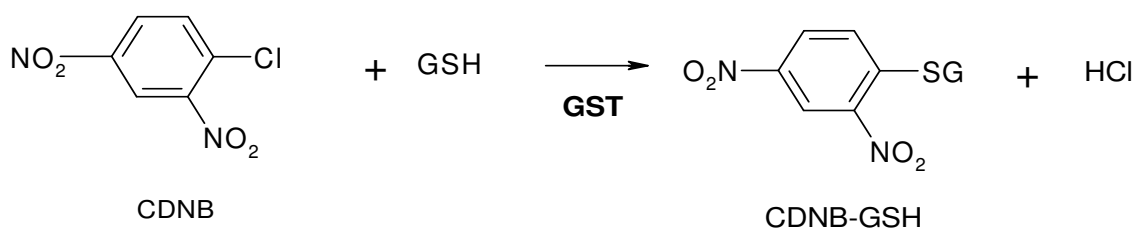


Figura 8. Reação entre CDNB e GSH catalisada pela GST.

3.5.6. Ascorbato peroxidase

A determinação da atividade da APx foi feita monitorando a oxidação do ascorbato a deidroascorbato na presença de H₂O₂. O meio de reação foi composto por tampão fosfato de sódio 50 mmol.L⁻¹ pH 7,0; 0,5 mmol.L⁻¹ de ácido ascórbico (Sigma[®]) e amostra. A reação foi iniciada pela adição de 100 μmol.L⁻¹ de H₂O₂ seguindo o decaimento de absorvância em 290 nm por 3 min. Controles na oxidação do ascorbato por algum componente da amostra e sua oxidação não enzimática pelo H₂O₂ foram também considerados. Uma unidade de atividade de APx representa a

quantidade de enzima necessária para oxidar 1 μmol de ascorbato ($\epsilon_{290} = 2,8 \text{ mmol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{cm}^{-1}$) por minuto a 25°C em pH 7,0 (Nakano e Asada, 1981; Asada, 1984).

3.5.7. Deidroascorbato redutase

A reação de redução do deidroascorbato a ascorbato na presença de GSH catalisada pela DHAR é determinada seguindo o aumento de absorbância em 265 nm devido à formação do ascorbato ($\epsilon_{265} = 14 \text{ mmol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{cm}^{-1}$). O meio de reação foi composto por tampão fosfato de sódio 50 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ pH 6,5 contendo 0,1 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ de EDTA; 0,5 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ de deidroascorbato (Sigma®); GSH 5 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$. Inicialmente, um aumento de absorbância foi monitorado por 1 min como resultado da redução não enzimática de deidroascorbato a ascorbato por GSH. Em seguida foi adicionada a amostra e acompanhada a reação por mais 2 min. Uma unidade de atividade de DHAR representa a quantidade de enzima necessária para reduzir 1 μmol de deidroascorbato por minuto a 25°C em pH 6,5 (Nakano e Asada, 1981; Asada, 1984).

3.5.8. Fenol hidroxilase

A atividade de fenol hidroxilase (PH) foi determinada medindo o consumo do cosubstrato NADPH em um meio contendo tampão fosfato 50 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ pH 7,5, 200 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NADPH e 50 μL de extrato celular. A reação foi iniciada pela adição de 200 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ de fenol e monitorada a 340 nm por 5 min a 30°C (adaptações de Neujahr e Varga, 1970). Uma unidade da enzima foi definida como a quantidade de enzima necessária para oxidar 1 μmol de NADPH por minuto a 30°C em pH 7,5 em presença de fenol.

3.5.9. Catecol 1,2-dioxigenase

A atividade de catecol 1,2-dioxigenase (C1,2-D) presente nos extratos celulares foi monitorada espectrofotometricamente segundo o procedimento de Varga e Neujahr (1970). O ensaio consiste em monitorar a formação de ácido cis, cis-mucônico a 360 nm por 5 min a 24°C. A mistura da reação continha tampão Tris-Cl 50 mmol.L⁻¹ pH 8,3 e 50 µL do extrato celular, equivalente a aproximadamente 5 mg de proteína total. A reação foi iniciada pela adição de 100 µmol.L⁻¹ de catecol utilizado como substrato. Uma unidade da enzima foi definida como a quantidade de enzima necessária para formar 1 µmol de ácido cis, cis-mucônico por minuto a 24°C em pH 8,3.

3.5.10. Catecol 2,3-dioxigenase

A atividade de catecol 2,3-dioxigenase (C2,3-D) presente nos extratos celulares foi monitorada espectrofotometricamente segundo o procedimento de Nozaki *et al.* (1963). O ensaio consiste em monitorar a formação de 2-hidroximucônico semialdeído a 375 nm ($\epsilon = 33.400 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{cm}^{-1}$) por 5 min a 20°C. A mistura da reação continha tampão fosfato 50 mmol.L⁻¹ pH 7,5 e 50 µL do extrato celular, equivalente a aproximadamente 5mg de proteína total. A reação foi iniciada pela adição de 100 µmol.L⁻¹ de catecol utilizado como substrato. Uma unidade da enzima foi definida como a quantidade de enzima necessária para formar 1 µmol de 2-hidroximucônico semialdeído por minuto a 20°C em pH 7,5.

3.6. Quantificação de proteínas

Para quantificar proteína total no extrato bruto foi utilizado o método de Bradford (Bradford, 1976) monitorando a absorvidade máxima das proteínas em 595 nm quando em presença do reagente Comassie[®] (cromóforo Brilliant Blue G 250). Albumina bovina sérica (BSA) foi utilizada como padrão.

3.7. Quantificação dos níveis de malondialdeído (MDA)

Os níveis de MDA foram medidos por meio da detecção do aduto formado entre o MDA e o ácido tiobarbitúrico (TBA) (figura 9) em um sistema de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC - Shimadzu[®] SCL 10A-VP) associada a um detector de fluorescência (Shimadzu[®] RF 10A-XL).

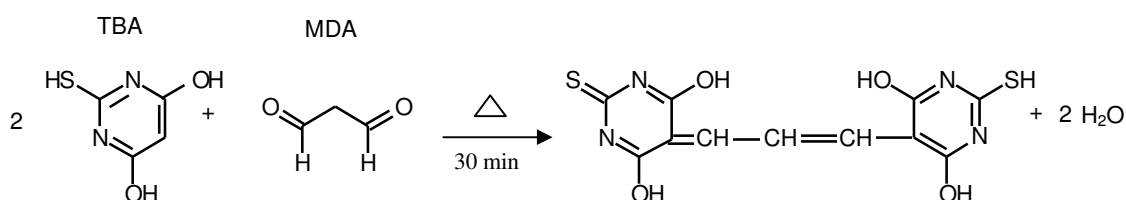


Figura 9. Reação entre TBA e MDA formando um produto fluorescente.

⇒ Condições cromatográficas

O detector de fluorescência foi ajustado para uma melhor resposta em um comprimento de onda de excitação de 532 nm verificando-se a emissão em 553 nm. A separação, após injeção automática (Shimadzu[®] SIL 10AD-VP), foi realizada por meio de uma coluna de fase reversa LUNA RP-18 (Phenomenex[®] 250 x 4,6 mm, 5 µm) sendo a fase móvel metanol : tampão fosfato de sódio 25 mmol.L⁻¹ pH 6,5 (1:1)

sob um fluxo isocrático de $1,0 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ (Shimadzu[®] LC 10AD-VP) com tempo de corrida de 7 min. Todos os solventes utilizados na fase móvel foram de grau HPLC, sendo previamente filtrados (membrana PVDF $0,45 \mu\text{m}$ - Millipore[®]) antes do uso (Fukunaga *et al.*, 1995, Brown e Kelly, 1996; Yang *et al.*, 1997).

⇒ *Preparação dos padrões*

Os padrões foram preparados a partir de 1,1,3,3-tetraetoxipropano (TEP - Sigma[®]), que nas condições experimentais descritas a seguir gera quantidades equimolares de MDA. Os pontos da curva de calibração (0; 0,1; 0,25; 0,5; 1,0; 2,5 e $5,0 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) foram preparados em metanol 30% (Merck[®] grau HPLC). Para o processo de derivatização, foram adicionados $600 \mu\text{L}$ do agente derivatizante TBA (Sigma[®]) 0,4% em HCl $0,2 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ (Merck[®]) e $100 \mu\text{L}$ do antioxidante butilhidroxitolueno (BHT) (Sigma[®]) 0,5% em metanol em $300 \mu\text{L}$ das soluções padrões preparadas, sendo o controle de metanol 30%. Este meio reacional foi então mantido sob agitação a 95°C em Thermomix digital (Eppendorf[®]) durante 30 min. Após este período, os padrões derivatizados foram filtrados em membrana de polietileno $0,45 \mu\text{m}$ (Millipore[®]) e em seguida transferidos aos vials para a injeção de $20 \mu\text{L}$ no HPLC (Fukunaga *et al.*, 1995, Brown e Kelly, 1996; Yang *et al.*, 1997).

⇒ *Preparação das amostras*

As amostras mantidas a -80°C foram liofilizadas em um Speed-Vac[®] (RT 100/SC110, Savant Inst.) com o objetivo de expressar os níveis de MDA em μmol de MDA-TBA. mg^{-1} de peso seco. Para cada 5 mg de células liofilizadas foi adicionado 1

mL de metanol 30% e após homogeneização, submeteu-se estas amostras ao ultra som (Ultra Sonic[®]) em banho a 0°C durante 15 min para a ruptura das células. Ao término deste período, as amostras foram centrifugadas (centrífuga Jouan[®], modelo A14) a 10.000 rpm durante 5 min a 4 °C. O sobrenadante (300 µL) foi submetido ao processo de derivatização e filtração como descrito no item 3.7.1. A aquisição dos dados e posterior integração das áreas de fluorescência foram feitas mediante um software Shimadzu[®] Class VP - 6.12 - SP2.

3.8. Quantificação de GSH e GSSG

Para a identificação, separação e quantificação de GSH e GSSG foram utilizadas o sistema de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC - Shimadzu[®] SCL 10A-VP) acoplada a um detector eletroquímico Coulochem III[®] modelo 5100A (ESA Analytical, USA) com cela guarda modelo 5020 e cela analítica modelo 5010 contendo dois eletrodos em série.

⇒ Condições cromatográficas

A separação, após injeção automática (Shimadzu[®] SIL 10AD-VP), foi realizada por meio de uma coluna de fase reversa LUNA RP-18 (Phenomenex[®] 250 x 4,6 mm, 5 µm) sob temperatura de 44°C, sendo a fase móvel acetonitrila : solução fosfato de sódio 50 mmol.L-1 pH 2,7 contendo ácido octano sulfônico 0,05 mmol.L-1 (Sigma[®]) (2 : 98 v/v) em um fluxo isocrático de 1,0 mL.min-1 (Shimadzu[®] LC 10AT-VP) com tempo de corrida de 8 min. Todos os solventes utilizados na fase móvel

foram de grau HPLC, sendo previamente filtrados (membrana PVDF 0,45 μm - Millipore[®]) antes do uso.

O potencial aplicado na cela guarda para oxidar substâncias interferentes da fase móvel foi de 900 mV. Já para a detecção de GSH e GSSG foi aplicado no detector 1 (E1) e detector 2 (E2) um potencial de 650 mV e 850 mV, respectivamente (Harvey *et al.*, 1989; Krien *et al.*, 1992; Rodríguez-Ariza *et al.*, 1994; Smith *et al.*, 1995; Lakritz *et al.*, 1997; Melnyk *et al.*, 1999).

⇒ Construção do voltamograma

Para a escolha dos potenciais aplicados nos detectores foi construído um voltamograma hidrodinâmico, curva corrente versus voltagem, para cada analito. Para isto foram feitas várias injeções de solução padrão de GSH e GSSG (100 $\mu\text{mol.L}^{-1}$) no sistema HPLC fixando-se o potencial E1 em 200 mV e partindo-se de um potencial do E2 de 300 mV sendo aumentado em 50 mV a cada injeção. Com as áreas obtidas para uma mesma concentração do analito, oxidado por diferentes potenciais, obteve-se a curva corrente versus voltagem. (Rodríguez-Ariza *et al.*, 1994; Lakritz *et al.*, 1997).

⇒ Preparação das amostras

O precipitado de células mantido a -80°C foi ressuspendido em 1 mL de solução fosfato de sódio 50 mmol.L^{-1} pH 2,7 e em seguida rompido em um sonicador como descrito no item 3.5, também sofrendo o mesmo processo de centrifugação. O

sobrenadante foi filtrado em membrana de polietileno 0,45 μm (Millipore[®]) e em seguida injetado 20 μL no HPLC. A concentração de GSH e GSSG presente nas amostras foi calculada a partir das áreas dos picos obtidos comparando-as com uma curva de calibração (1,0; 2,5; 5,0; 10,0; 25,0; 50,0; 75,0; 100,0 $\mu\text{mol.L}^{-1}$) realizada nas mesmas condições descritas anteriormente com soluções padrões de GSH e GSSG preparadas em solução fosfato de sódio 50 mmol.L^{-1} pH 2,7. A aquisição dos dados e posterior integração das áreas foram feitas mediante um software Shimadzu[®] Class VP - 6.12 - SP2.

3.9. Determinação do conteúdo de pigmentos fotossintéticos

A identificação e quantificação dos pigmentos fucoxantina, diadinoxantina, diatoxantina, clorofila a e β -caroteno foi realizada segundo o método descrito por Guaratini *et al.* (2007) em um sistema de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC - Shimadzu[®] SCL 10A-VP) acoplada a um detector ultravioleta/ visível (UV/Vis SPD-M10 AVP).

⇒ Condições cromatográficas

A separação, após injeção automática (Shimadzu[®] SIL 10AD-VP), foi realizada por meio de uma coluna ultracarb C30 (Phenomenex[®] 250 x 4,6 mm, 5 μm) com sistema binário cuja fase móvel na bomba A foi metanol : água: tampão acetato de amônio 1 mol.L^{-1} pH 4,6 (90: 8: 2) e na bomba B foi metanol (MeOH): metil-terc-butil éter (MTBE) : tampão acetato de amônio 1 mol.L^{-1} pH 4,6 (30: 68: 2) utilizando-se o gradiente descrito na tabela 4, com fluxo de 1,0 mL.min^{-1} (Shimadzu[®] LC 10AT-

VP) em temperatura ambiente sendo que o comprimento de onda de detecção foi de 445 nm. Todos os solventes utilizados na fase móvel foram de grau HPLC, sendo previamente filtrados (membrana PVDF 0,45 μm - Millipore®) antes do uso.

Tabela 4. Programa de eluição para análise de pigmentos por HPLC.

Tempo (min)	MeOH: H ₂ O: Acetato de	MeOH: MTBE: Acetato de
	Amônio 1 mol.L ⁻¹ pH 4,6 (%)	Amônio 1 mol.L ⁻¹ pH 4,6 (%)
0,01	95	5
15	90	10
25	90	10
35	85	15
40	60	40
42	55	45
62	55	45
63	0	100
67	0	100
70	95	5
80	95	5

⇒ *Preparação das amostras*

As amostras mantidas a -80°C foram liofilizadas em um Speed-Vac® (RT 100/SC110, Savant Inst.) com o objetivo de expressar os níveis de pigmentos em $\mu\text{g} \cdot \text{mg}^{-1}$ de peso seco. Para cada 3 mg de células liofilizadas foi adicionado 1 mL de metanol e após homogeneização, submeteu-se estas amostras ao ultra som (Ultra

Sonic[®]) em banho a 0°C durante 15 min para a ruptura das células. Ao término deste período, as amostras foram centrifugadas (centrífuga Jouan[®], modelo A14) a 10.000 rpm durante 5 min a 4 °C. O sobrenadante foi filtrado em membrana de polietileno 0,45 µm (Millipore[®]) e em seguida injetado 50 µL no HPLC. A concentração dos pigmentos foi calculada a partir das áreas dos picos obtidos comparando-as com uma curva de calibração de padrões comerciais, realizada nas mesmas condições descritas anteriormente. A aquisição dos dados e posterior integração das áreas dos picos obtidos foram feitas mediante um software Shimadzu[®] Class VP - 6.12 - SP2.

3.10. Experimentos de biodegradação

3.10.1. Montagem experimental

Com o objetivo de verificar uma possível biodegradação do fenol pela microalga *M. polymorphus* duas abordagens experimentais foram realizadas.

⇒ Experimento 1

A microalga *M. polymorphus* com densidade inicial de 1×10^6 células/mL foi exposta a 1 mmol.L^{-1} de fenol e cultivada em triplicata por 6 dias. Dois tipos de controle foram realizados nas mesmas condições de cultivo, um foi feito com uma cultura de microalga com densidade de 1×10^6 células/mL sem a presença de fenol e outro tipo de controle foi feito em frascos contendo meio de cultura Guillard f/2 com 1 mmol.L^{-1} de fenol sem a presença da microalga, com o objetivo de verificar um possível desaparecimento do fenol por degradação a luz ou por evaporação.

A coleta de aproximadamente 250 mL de cultura das células e dos controles foi realizada nos dias 0 (inóculo), 2, 4 e 6 por centrifugação (centrífuga Du Pont Sorvall® RC-5B) a 10.000 rpm durante 20 min a 4°C. O sobrenadante que neste caso é apenas o meio de cultura, e o precipitado de células foram armazenados separadamente em microtubos eppendorf®, congelados em nitrogênio líquido por 1 min e estocados em freezer -80°C para posterior análise.

⇒ *Experimento 2*

Outra abordagem experimental foi verificar o desaparecimento do fenol em células previamente expostas ao poluente. Para isto, a microalga *M. polymorphus* com densidade inicial de 1×10^6 células/mL exposta a 1 mmol.L^{-1} de fenol foi cultivada por 6 dias e ao final deste período realizou-se a coleta destas células por centrifugação (centrífuga Du Pont Sorvall® RC-5B) a 10.000 rpm durante 20 min a 4°C. O precipitado de células sofreu lavagem 3 x com água do mar para retirar o excesso de fenol, sendo centrifugado a 10.000 rpm durante 5 min a 4°C a cada lavagem. Em seguida as células foram ressuspensas em 250 mL de meio de cultura com adição de $250 \text{ } \mu\text{mol.L}^{-1}$ de fenol. Para verificar o crescimento dessas células como um controle de viabilidade celular 1 mL desta cultura foi transferida para um novo frasco contendo meio Guillard f/2 antes da adição do fenol. Amostras foram coletadas no tempo 0, 15, 30, 60 e 120 min por centrifugação a 10000 rpm durante 5 min a 4°C sendo o sobrenadante, meio de cultura, armazenado em freezer -80°C para posterior análise.

3.10.2. Quantificação de fenol

A identificação e quantificação do fenol foram realizadas em um sistema de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC - Shimadzu[®] SCL 10A-VP) associada a um detector ultravioleta/ visível (UV/Vis SPD-M10 AVP).

⇒ Condições cromatográficas

A separação, após injeção automática (Shimadzu[®] SIL 10AD-VP), foi realizada por meio de uma coluna de fase reversa LUNA RP-18 (Phenomenex[®] 250 x 4,6 mm, 5 µm) sendo a fase móvel acetonitrila : ácido acético 0,1% utilizando-se o gradiente descrito na tabela 5, com fluxo de 1,0 mL.min⁻¹ (Shimadzu[®] LC 10AT-VP) em temperatura ambiente sendo que o comprimento de onda de detecção foi de 270 nm. Todos os solventes utilizados na fase móvel foram de grau HPLC, sendo previamente filtrados (membrana PVDF 0,45 µm - Millipore[®]) antes do uso.

Tabela 5. Programa de eluição para análise de fenol por HPLC.

Tempo (min)	Ácido acético (%)	Acetonitrila (%)
0,01	90	10
1,00	90	10
3,00	15	85
7,00	15	85
8,00	90	10
11,00	90	10

⇒ *Curva de calibração*

A curva de calibração foi realizada em triplicatas nas mesmas condições descritas anteriormente com as seguintes concentrações de fenol: 0,1; 0,2; 0,3; 0,4 e 0,5 mmol.L⁻¹.

⇒ *Preparação das amostras*

As amostras utilizadas para a identificação e quantificação do fenol foram as de meio de cultura do *Experimento 1 e 2* (3.10.1). O meio de cultura foi filtrado em membrana de polietileno 0,45 µm (Millipore®) e em seguida injetado (20 µL) no HPLC. A concentração de fenol presente nestas amostras foi calculada a partir das áreas dos picos obtidos comparando-as com uma curva de calibração.

3.10.3. Identificação e quantificação dos metabólitos do fenol por CG/MS

A identificação e quantificação dos metabólitos do fenol foram realizadas em um cromatógrafo a gás modelo 6890 acoplado a um espectrômetro de massas modelo 5972 (CG/MS) (Agilent Technologies Inc. Palo Alto, CA, USA).

⇒ *Condições cromatográficas*

A separação cromatográfica foi realizada em uma coluna capilar de sílica fundida HP5-MS (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm, Hewlett Packward®) usando hélio (Air Liquide®) como gás de arraste sob um fluxo constante de 0,6 mL.min⁻¹. A temperatura do forno foi mantida inicialmente a 50°C por 2 min e programada para uma rampa de 13°C.min⁻¹ até 250°C sendo mantida esta temperatura por mais 5

minutos. A temperatura do injetor e da interface foi de 250°C, sendo que o injetor foi operado no modo *splitless*. O tempo de duração da corrida cromatográfica foi de 20 min. O detector do espectrômetro de massa foi operado usando fragmentação por impacto de elétrons (70 eV) com monitoramento seletivo dos íons (SIM). Os seguintes íons foram escolhidos para análise por SIM (os íons em destaque apresentaram maior abundância e por isso foram escolhidos para a quantificação): Fenol: **151**, 152, 166; Fenol d5 (Fenol com 5 átomos de deutério): **156**, 171; Catecol: 239, 240, **254**; Catecol d6 (Catecol com 6 átomos de deutério): 243, **258**; Ácido cis, cis - mucônico: **169**, 196, 271, 286; Ácido trans, trans - mucônico: 169, 196, **271**, 286 (Lourenço *et al.*, 2006). O conteúdo desses compostos nas amostras foi calculado em área relativa considerando a área dos íons escolhidos e seus respectivos deuterados.

⇒ *Preparação das amostras*

O meio de cultura e as células do *Experimento 1* (3.10.1) foram analisados no CG/MS para identificação do fenol e seus metabólitos. Primeiramente, o precipitado de células foi lavado 3x com água do mar com o objetivo de retirar o fenol aderido as células, e em seguida as mesmas foram ressuspendidas em 1 mL de solução fosfato de sódio 50 mmol.L⁻¹ pH 2,7 sofrendo rompimento no sonicador e centrifugação como descrito no item 3.5. O sobrenadante resultante desta centrifugação e o meio de cultura foram submetidos a um processo de extração líquido - líquido.

Para 1 mL de amostra foi acrescentado 50 µL de ácido clorídrico concentrado (Merck®), 2 mL de acetato de etila (Vetec®) e 65 ng de fenol d5 e catecol d6

(Cambridge Isotope Laboratories, Inc), que funcionaram como padrão interno. Esta solução ficou sob agitação por 15 min a 10.000 rpm sendo, em seguida centrifugada a 2.000 rpm por 10 min. O sobrenadante (fase orgânica) foi transferido a um béquer contendo sulfato de sódio anidro (Merck[®]) e novamente transferido a um frasco de derivatização silanizado de 3 mL (Pier, USA). Esta fase orgânica foi seca sob N₂ em temperatura ambiente. Após completa secagem da amostra foi acrescentado ao frasco 50 µL do agente derivatizante N, O-bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide (BSTFA, Sigma[®]) sendo em seguida fechado e aquecido a 90°C por 20 min. Após este período, foi injetado no CG/MS 2 µL da amostra derivatizada.

A figura 10 apresenta um exemplo de reação de derivatização com BSTFA, esse processo também é chamado de sililação por acrescentar um grupo trimetilsilil ao composto em análise e geralmente é utilizado para alcoóis, fenóis, ácidos carboxílicos, aminas, amidas. A sililação torna o composto em análise menos polar, mais volátil e mais termicamente estável, facilitando a utilização do CG/MS (Knapp, 1979).

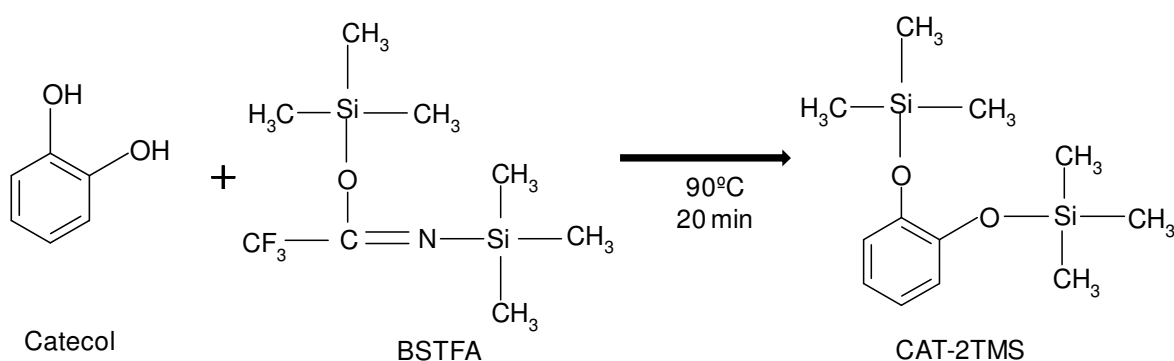


Figura 10. Reação de derivatização de catecol com BSTFA.

3.11. 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

4.1. Curvas de crescimento

Para a construção das curvas de crescimento por contagem celular e fluorescência da clorofila o desenvolvimento da *M. polymorphus* foi acompanhado durante 24 e 30 dias, respectivamente. Com os valores de densidade celular em células/mL e de área de fluorescência em função do tempo foram construídas as curvas de crescimento apresentadas nas figuras 11 e 12 .

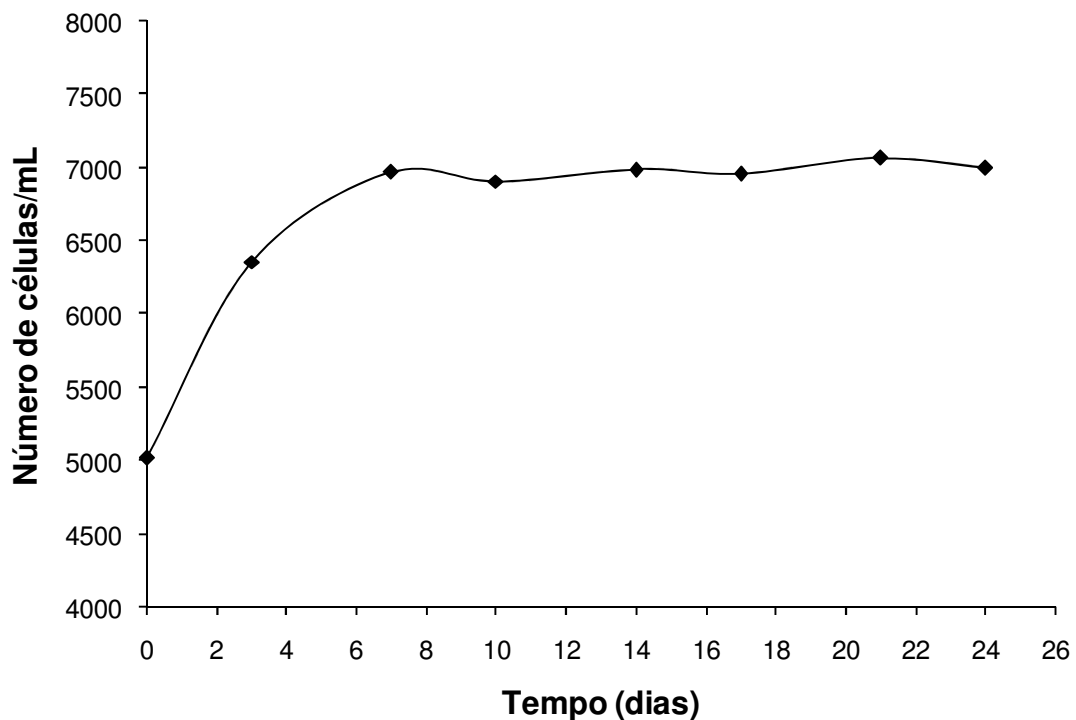


Figura 11. Curva de crescimento de *M. polymorphus* por contagem celular.

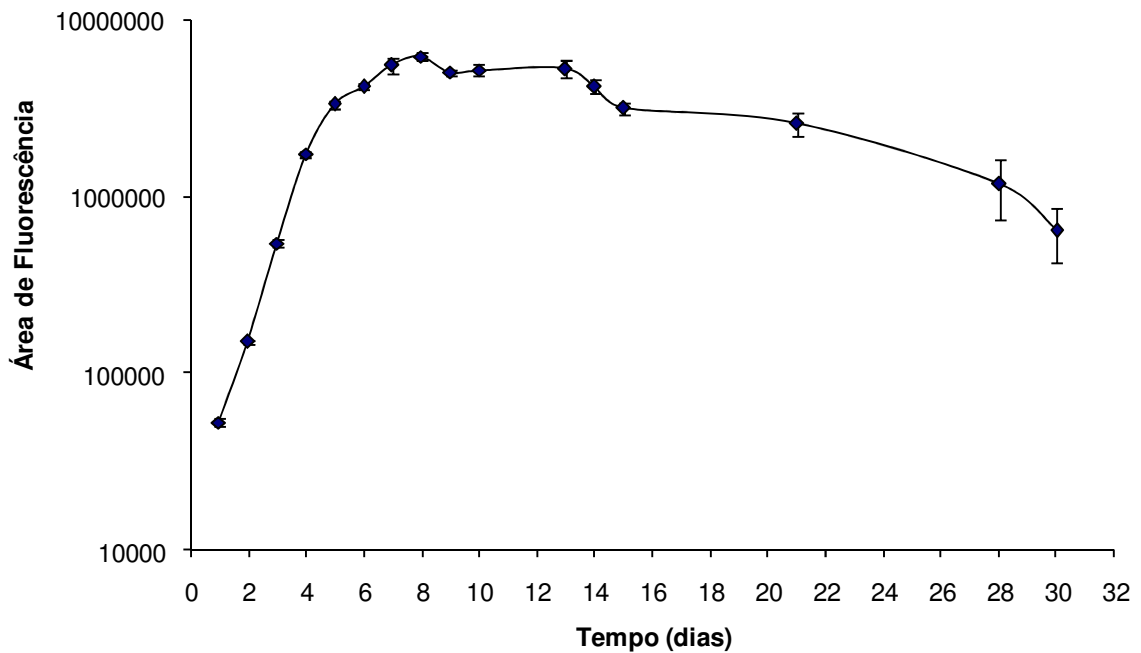


Figura 12. Curva de crescimento de *M. polymorphus* por fluorescência da clorofila ($\lambda_{exc}= 460$ nm e $\lambda_{em}= 680$ nm).

De acordo com a figura 11 e 12 pode-se notar que a *M. polymorphus* apresenta uma fase exponencial de crescimento por 7 dias em que as condições para o crescimento são ótimas considerando os nutrientes, luz, e baixa concentração de metabólitos tóxicos. À medida que a população algácea aumenta os nutrientes tornam-se escassos, as células não recebem a quantidade de luz adequada devido ao sombreamento causado pelas outras células e a quantidade de substâncias excretadas aumenta fazendo com que a *M. polymorphus* entre em uma fase estacionária de crescimento a partir do 7º dia.

Antes da construção da curva de crescimento por fluorescência da clorofila *in vivo* foi necessário verificar o comprimento de onda mais adequado para a excitação deste composto e para a emissão de sua fluorescência. Os resultados do espectro de excitação na cultura de *M. polymorphus* apresentaram uma banda característica da clorofila em 460 nm (figura 13A), cujo espectro de emissão em 680 nm foi bem definido, podendo desta forma, ser monitorado (figura 13B). O fenol não apresentou emissão de fluorescência em 680 nm quando excitado a 460 nm.

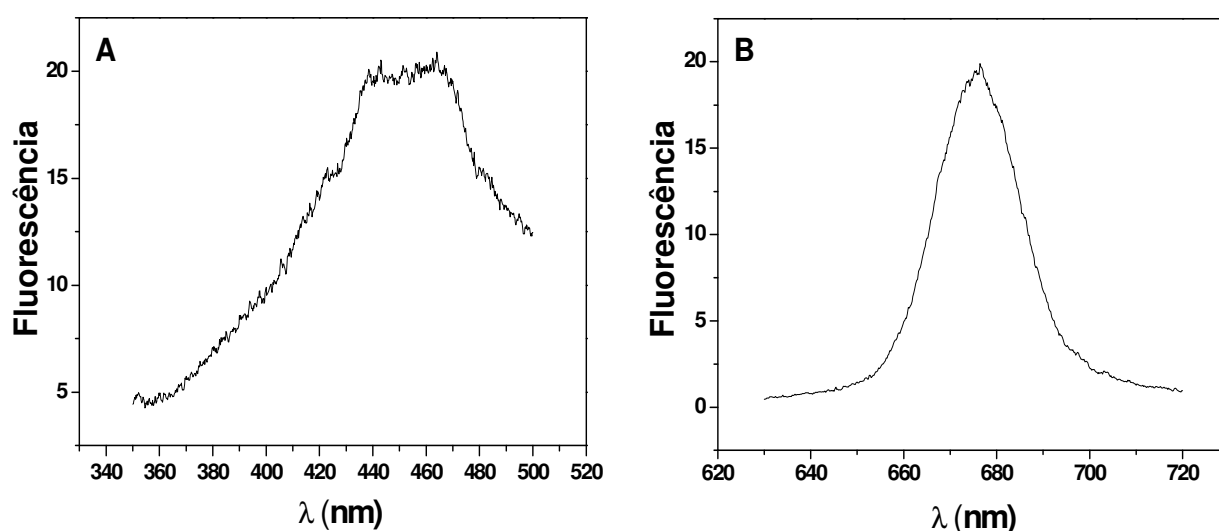


Figura 13. A: Espectro de varredura de excitação quando a emissão foi ajustada para $\lambda = 680$ nm. **B:** Espectro de varredura de emissão quando a excitação foi ajustada para $\lambda = 460$ nm.

4.2. Inibição do crescimento

Para se conhecer a toxicidade do fenol na microalga *M. polymorphus* foi realizado o teste de inibição de crescimento por meio de contagem celular. Para esse teste foi utilizado uma cultura de *M. polymorphus* com densidade celular inicial de 1×10^6 células/mL com o intuito de obter maior massa para as medidas enzimáticas.

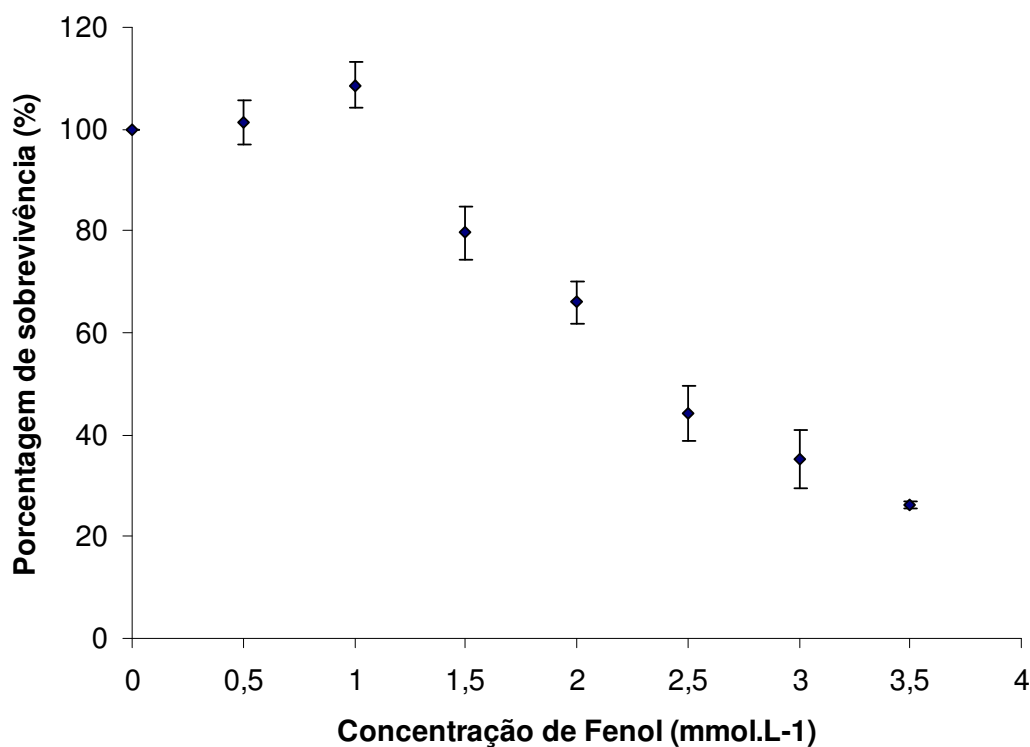


Figura 14. Sobrevivência de *M. polymorphus* exposta ao fenol por 48 h.

A concentração que inibe 50% do crescimento de *M. polymorphus* encontrada foi de $2,3 \text{ mmol.L}^{-1}$ e a concentração que inibe 20% foi de $1,5 \text{ mmol.L}^{-1}$. Estes dados

podem ser obtidos através do gráfico (figura 14) ou utilizando o programa ICPIN.EXE (Inhibition Concentration Percentage Estimate).

O teste de inibição de crescimento também foi realizado por meio da fluorescência da clorofila, no entanto, não apresentou resultados compatíveis com a da contagem celular, houve muitas variações das leituras de fluorescência entre a mesma réplica e réplicas diferentes. Para verificar uma possível interferência do fenol na fluorescência da clorofila foi feito um controle com soluções de fenol (mesmas concentrações de fenol utilizadas no teste de inibição por contagem celular) o qual não apresentou fluorescência nas condições padronizadas para a clorofila.

4.3. Enzimas antioxidantes

Para avaliar o estresse oxidativo e as defesas antioxidantes induzidos na microalga *M. polymorphus* pela presença do poluente fenol, o valor de IC₂₀ foi utilizado e ao final de 48h as células foram coletadas. Todas as atividades enzimáticas encontradas estão relacionadas ao conteúdo protéico medido como descrito no item 3.6.

O grupo tratado com fenol apresentou uma atividade de SOD aproximadamente 5 vezes maior ($143,5 \pm 46,9$ U mg⁻¹) que o grupo controle ($27,1 \pm 12,7$ U mg⁻¹) (figura 15). Sabidamente o anion superóxido é a primeira espécie reativa de oxigênio a ser gerada no desbalanço redox. Consequentemente, como resposta, as células induzem a expressão de SOD.

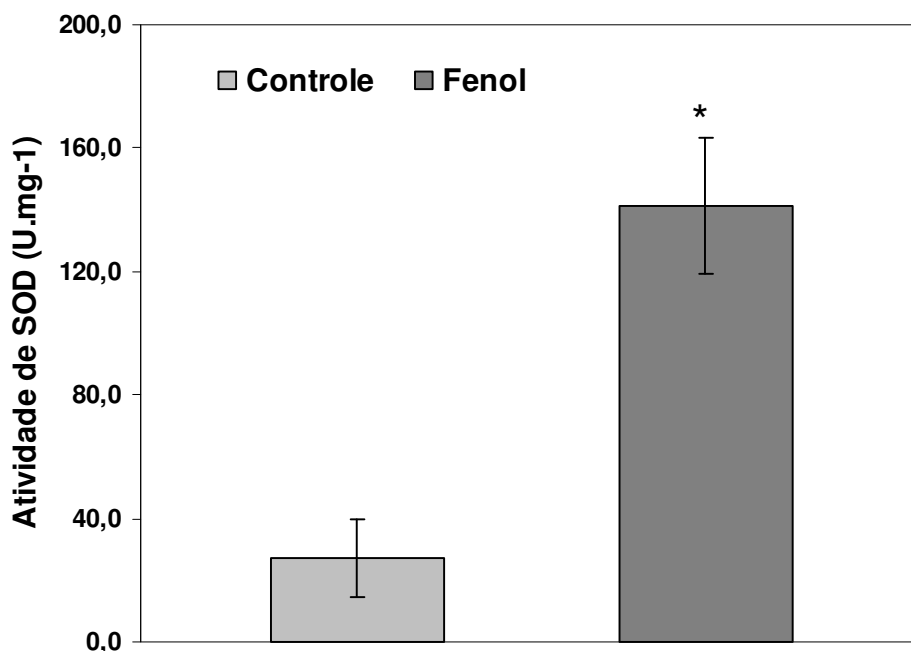


Figura 15. Atividade de SOD em extrato celular de *M. polymorphus* exposta a 1,5 mmol. L⁻¹ de fenol por 48 h (*significância: p<0,05, ANOVA).

Com o aumento na produção do radical superóxido e consequente aumento na atividade de SOD outras enzimas são também induzidas com a finalidade de degradar o H₂O₂ gerado. Desta forma foi investigado a atividade das enzimas catalase, APx e GPx que são capazes de degradar o H₂O₂.

A catalase apresentou um aumento de atividade de 40% na alga exposta ao fenol ($7,00 \pm 1,03 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ no grupo controle e $9,79 \pm 1,32 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ no grupo fenol) (figura 16).

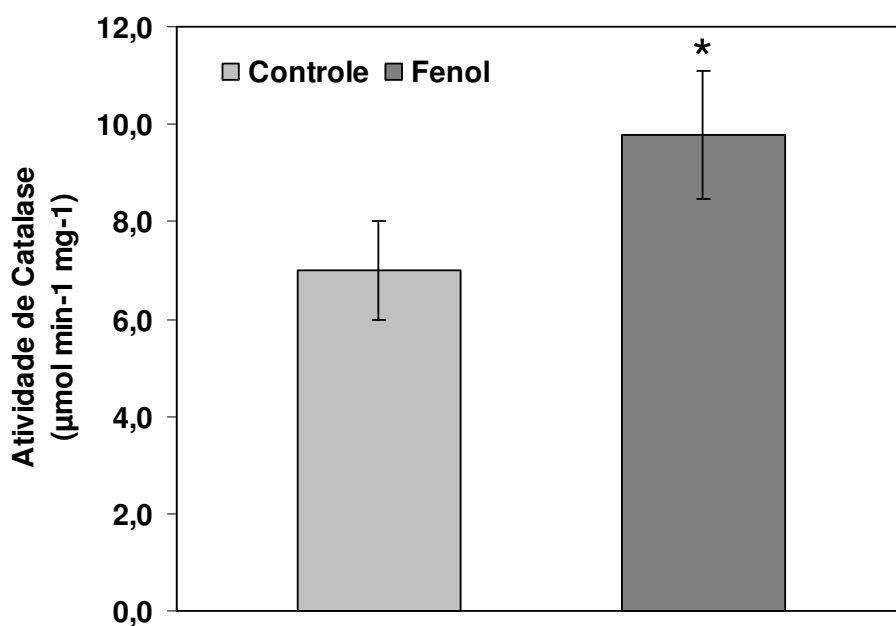


Figura 16. Atividade de catalase em extrato celular de *M. polymorphus* exposta a 1,5 mmol. L⁻¹ de fenol por 48 h (*significância: $p < 0,05$, ANOVA).

Embora as enzimas SOD e catalase tenham sido induzidas por fenol, as enzimas APx, DHAR, GR e GPx não apresentaram diferença significativa de suas atividades entre o grupo tratado com fenol e o grupo controle (figuras 17, 18, 19 e 20, respectivamente).

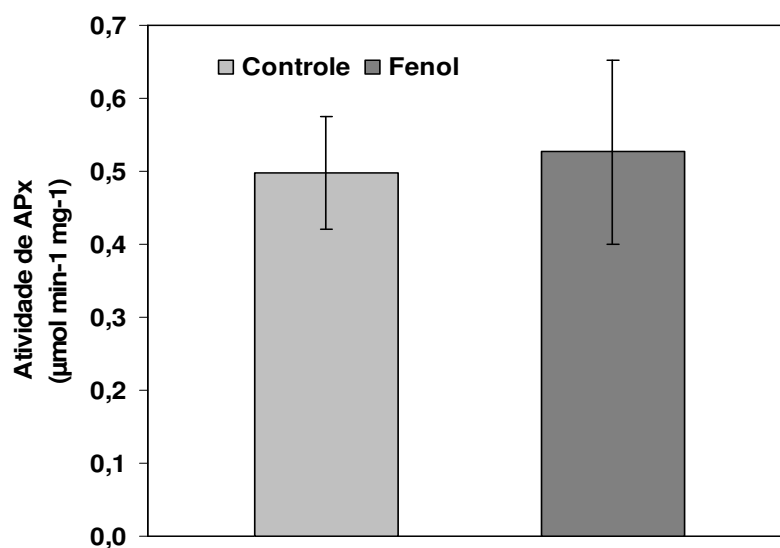


Figura 17. Atividade de APx em extrato celular de *M. polymorphus* exposta a 1,5 mmol. L⁻¹ de fenol por 48 h.

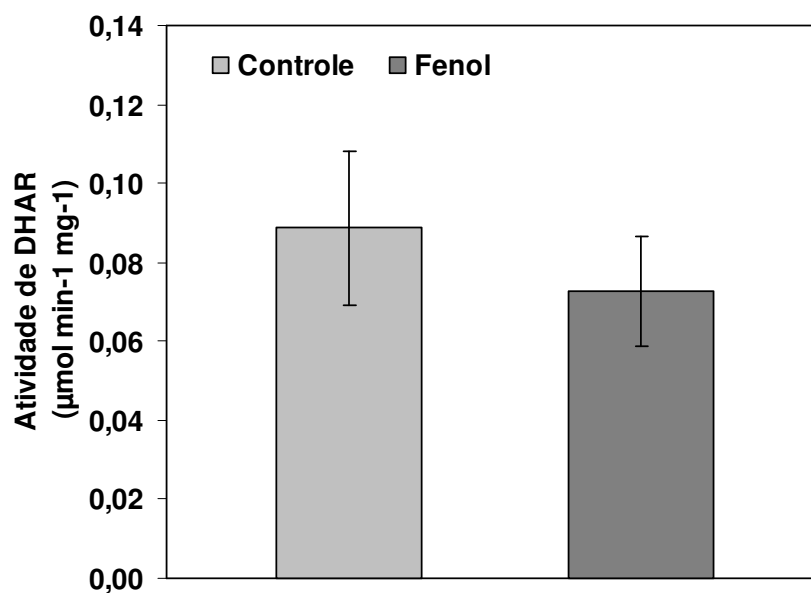


Figura 18. Atividade de DHAR em extrato celular de *M. polymorphus* exposta a 1,5 mmol. L⁻¹ de fenol por 48 h.

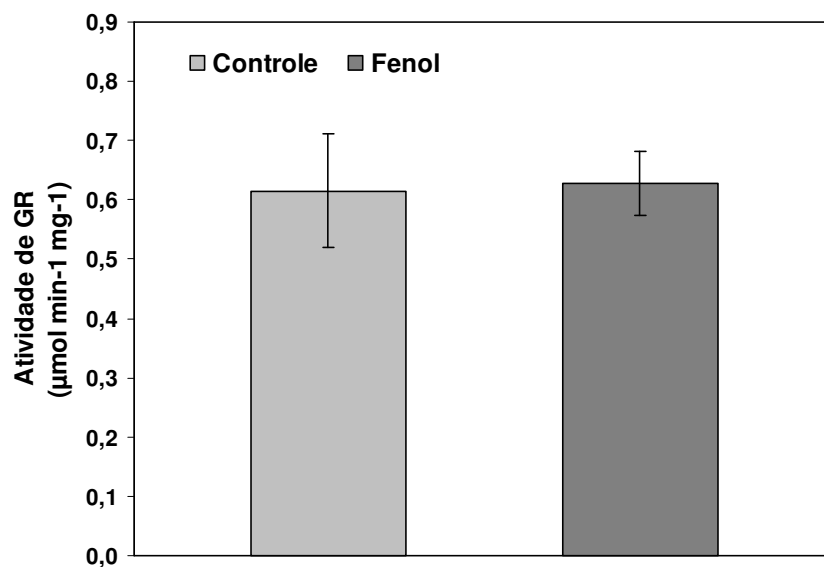


Figura 19. Atividade de GR em extrato celular de *M. polymorphus* exposta a 1,5 mmol. L⁻¹ de fenol por 48 h.

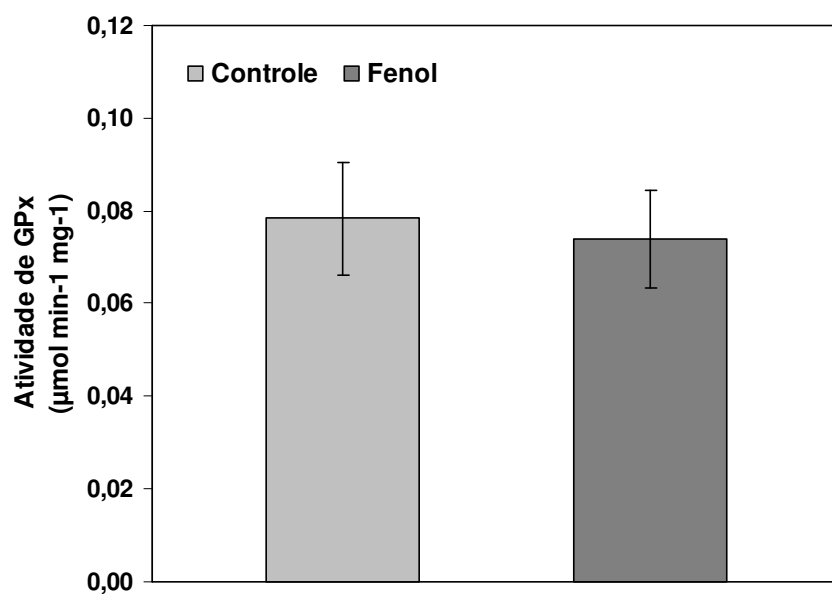


Figura 20. Atividade de GPx em extrato celular de *M. polymorphus* exposta a 1,5 mmol. L⁻¹ de fenol por 48 h.

4.4. Enzimas de biotransformação do fenol

Para acompanhar a atividade das enzimas fenol hidroxilase (PH), catecol 1,2-dioxigenase (C1,2-D) e catecol 2,3-dioxigenase (C2,3-D) a microalga *M. polymorphus* foi cultivada com uma densidade inicial de 1.10^6 células/mL exposta a $1,5 \text{ mmol.L}^{-1}$ de fenol por 6 dias, sendo as amostras coletadas no dia 0 (inóculo), 2, 4, e 6.

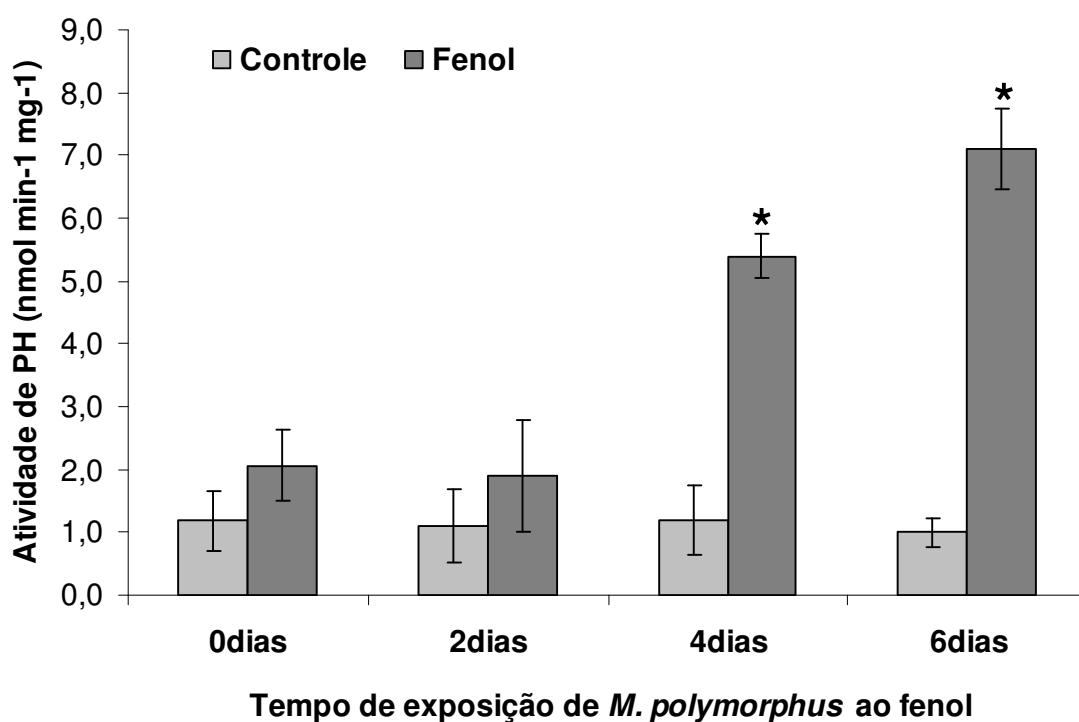


Figura 21. Atividade de PH em extrato celular de *M. polymorphus* exposta a $1,5 \text{ mmol.L}^{-1}$ de fenol ao longo de 6 dias (*significância: $p < 0,05$, ANOVA, grupo fenol comparado ao grupo controle de um mesmo dia).

Na figura 21 pode-se notar que a PH apresentou um aumento de atividade no grupo tratado com fenol ao longo do tempo. Nos 2 primeiros dias a PH praticamente não alterou sua atividade. Já no dia 4 a atividade de PH foi aproximadamente 4 vezes maior que o grupo controle. No dia 6 o aumento de atividade de PH foi mais pronunciado ($1,0 \pm 0,2 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ para o grupo controle e $7,1 \pm 0,6 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ para o grupo fenol) o que demonstra uma indução da atividade de PH na presença do fenol.

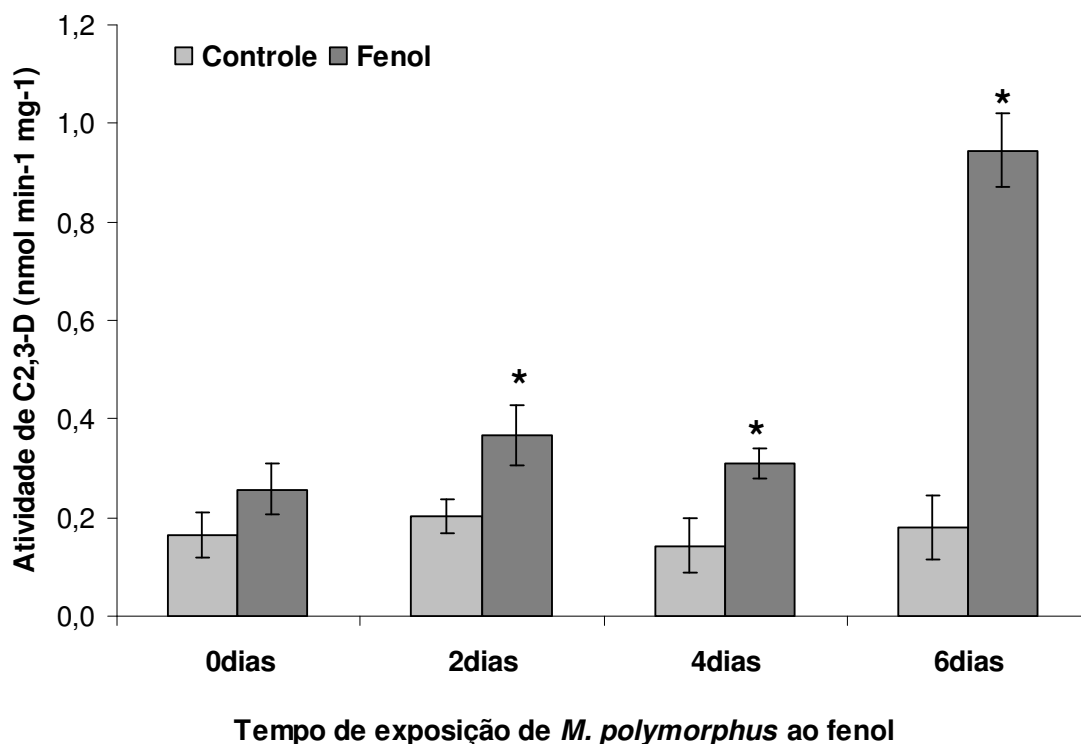


Figura 22. Atividade de C2,3-D em extrato celular de *M. polymorphus* exposta a $1,5 \text{ mmol. L}^{-1}$ de fenol ao longo de 6 dias (*significância: $p < 0,05$, ANOVA, grupo fenol comparado ao grupo controle de um mesmo dia).

A C2,3-D apresentou uma indução de atividade a partir do 2º dia de exposição ao fenol (figura 22). No dia 2 e 4 o grupo tratado com fenol apresentou um aumento da atividade de C2,3-D de aproximadamente 2 vezes maior quando comparado ao grupo controle. Enquanto que no dia 6 esse aumento foi de aproximadamente 5 vezes ($0,18 \pm 0,064 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ e $0,94 \pm 0,075 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ para o grupo controle e fenol, respectivamente).

Na microalga *M. polymorphus* exposta ao fenol não foi detectada a atividade de C1,2-D. Testes de inibição da atividade de C2,3-D com H_2O_2 também foram realizados com o intuito de verificar uma possível atividade de C1,2-D, a qual não foi encontrada. Esses dados sugerem que a degradação do fenol segue uma via de meta clivagem sendo formado o 2-hidroxiacético semialdéido pela ação de C2,3-D.

A glutathione S-transferase (GST), importante enzima no processo de detoxificação de poluentes, também foi medida na microalga *M. polymorphus* exposta ao fenol por 48 h. Foi observado um aumento da atividade de GST de aproximadamente 2 vezes maior no grupo tratado quando comparado ao controle ($7,4 \pm 1,5 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ e $14,6 \pm 1,3 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ no grupo controle e fenol, respectivamente) (figura 23). Este resultado indica que GST participa no processo de detoxificação do fenol, realizando a conjugação de uma molécula de glutathione ao composto tóxico e desta forma, aumentando a sua polaridade e tornando-o mais facilmente excretado.

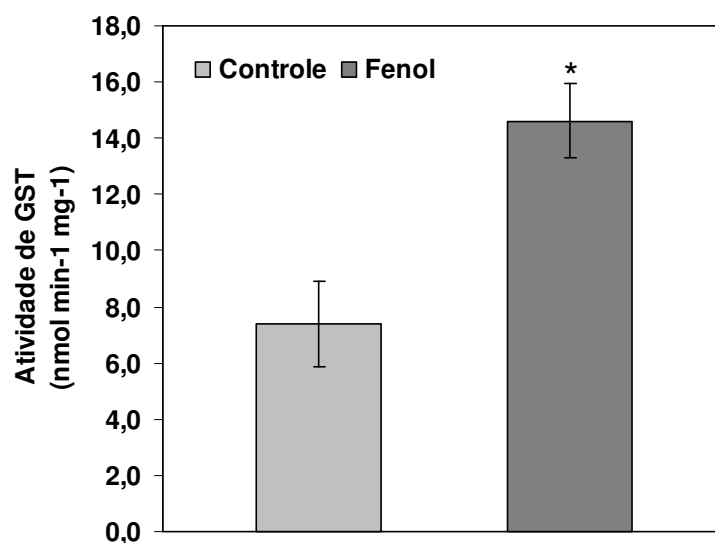


Figura 23. Atividade de GST em extrato celular de *M. polymorphus* exposta a 1,5 mmol. L⁻¹ de fenol por 48 h (*significância: $p < 0,05$, ANOVA).

4.5. Quantificação dos níveis de malondialdeído (MDA)

A figura 24 mostra o perfil cromatográfico obtido para o produto formado MDA-TBA nas diferentes concentrações (0 a 5,0 $\mu\text{mol. L}^{-1}$) bem como a curva de calibração obtida ($y = 38216x + 146,55$, $R^2 = 0,9985$) a partir dos valores de área integrados. A separação e a detecção do aduto MDA-TBA utilizando HPLC acoplado a um detector de fluorescência ($\lambda_{\text{exc}} = 532 \text{ nm}$ e $\lambda_{\text{em}} = 553 \text{ nm}$) mostrou-se um método eficaz com boa correlação linear.

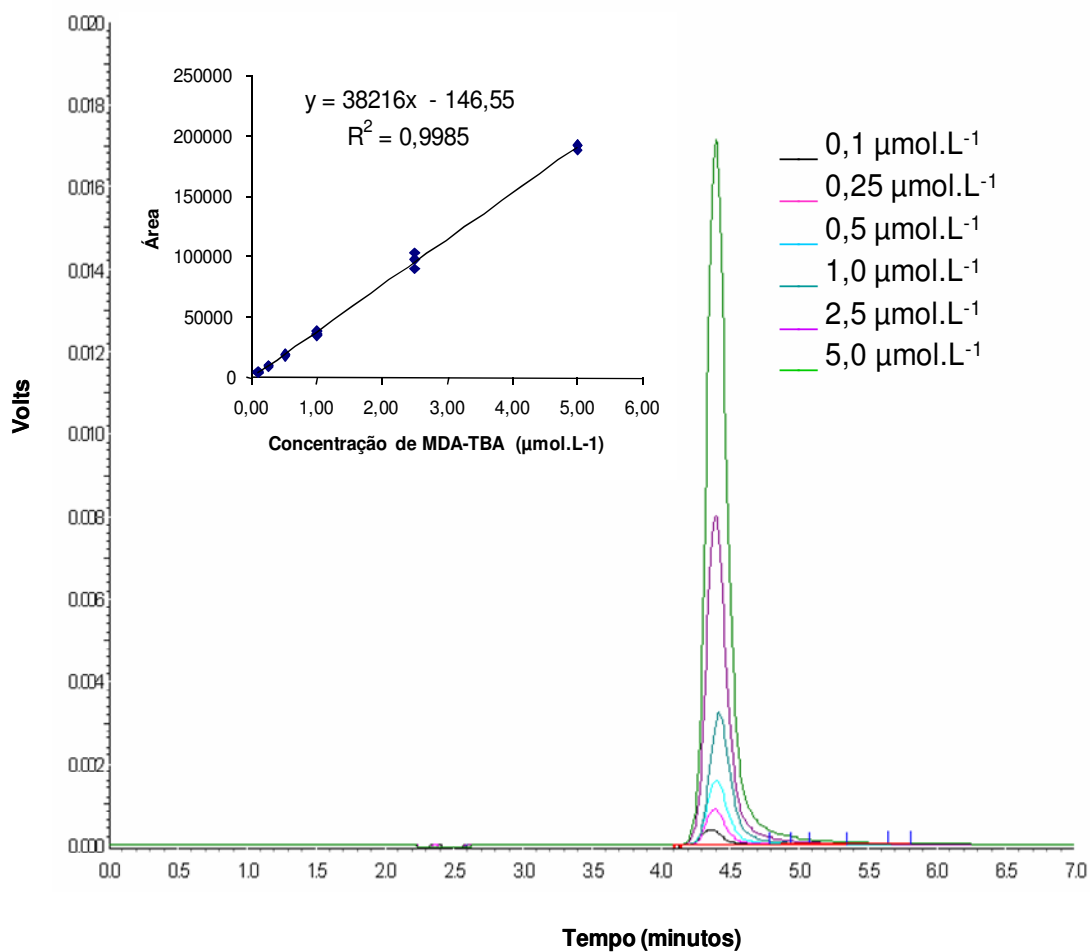


Figura 24. Cromatograma obtido para o produto MDA-TBA ($T_R = 4,2$ min) e curva de calibração realizada em triplicatas. Os diferentes picos correspondem às diferentes concentrações (0 a $5,0 \mu\text{mol. L}^{-1}$).

O grupo controle e tratado com fenol não apresentaram diferenças significativas no conteúdo de MDA como apresentado na figura 25, indicando que o tratamento com $1,5 \text{ mmol. L}^{-1}$ de fenol por 48 h não induziu o processo de lipoperoxidação em *M. polymorphus*.

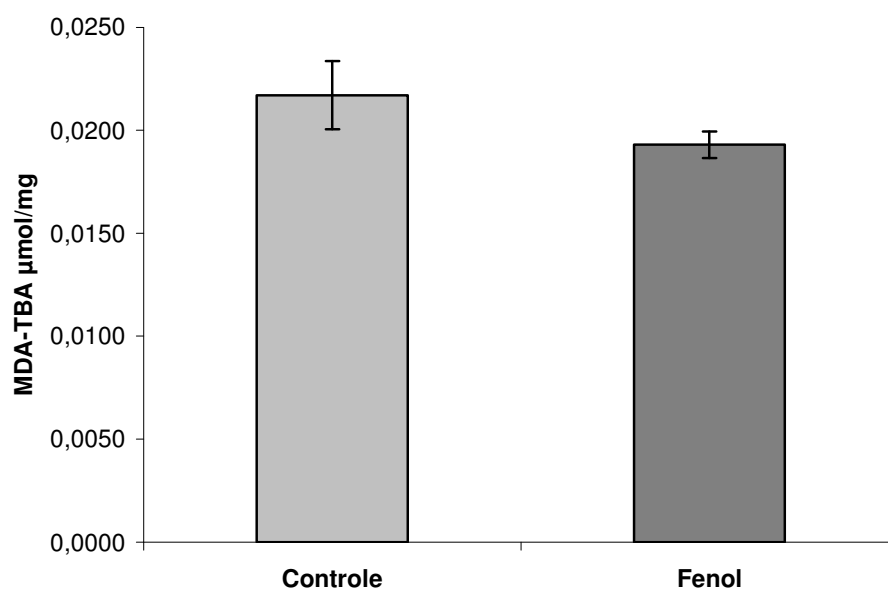


Figura 25. Conteúdo do complexo MDA-TBA em extrato celular de *M. polymorphus* exposta a $1,5 \text{ mmol. L}^{-1}$ de fenol por 48 h.

4.6. Quantificação de GSH e GSSG

A figura 26 mostra a estrutura química de GSH e GSSG, sendo analisados seus perfis cromatográficos para soluções padrões em diferentes concentrações ($1,0$ a $100,0 \text{ µmol. L}^{-1}$) bem como a curva de calibração obtida ($y = 21558,16x - 4359,73$, $R^2 = 0,9955$ para GSH e $y = 18602,00x - 8679,84$, $R^2 = 0,9969$ para GSSG) a partir dos valores de área integrados (figura 27).

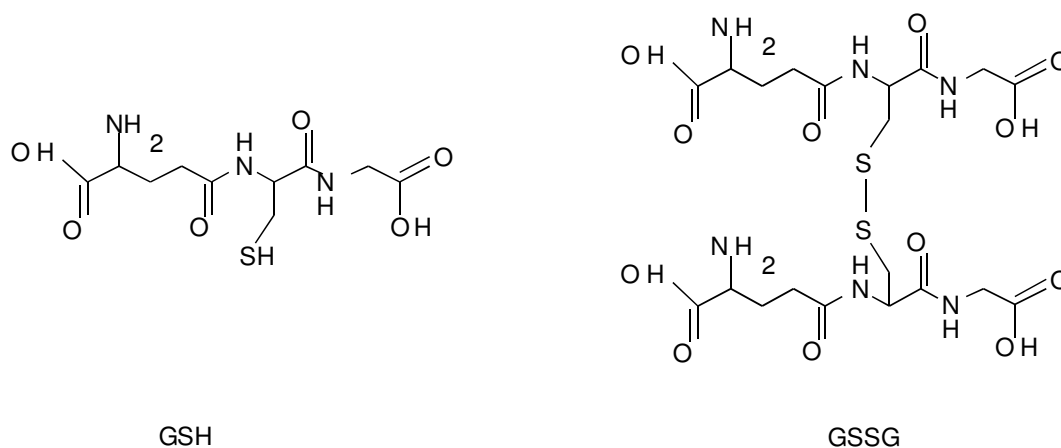


Figura 26. Estrutura química de GSH e GSSG.

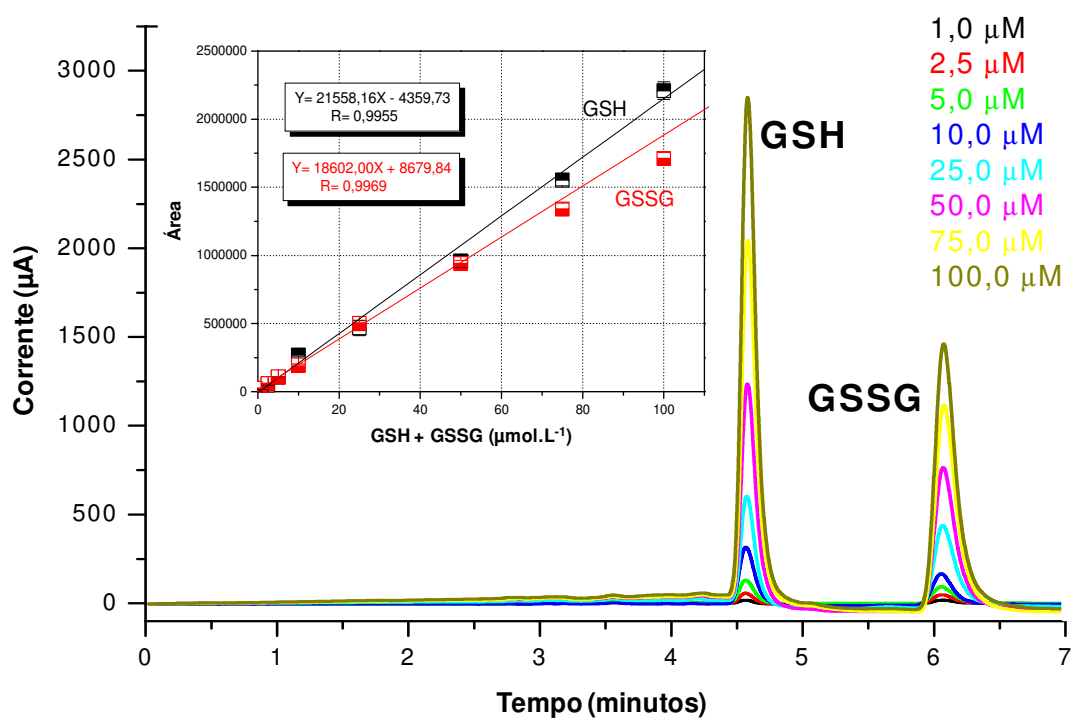


Figura 27. Cromatograma obtido para GSH e GSSG (TR= 4,5 min e 6,0 min, respectivamente) e curva de calibração. Os diferentes picos correspondem às diferentes concentrações (1,0 a 100,0 µmol. L⁻¹).

A figura 28 mostra o cromatograma obtido na determinação de GSH e GSSG em amostras de *M. polymorphus* controle e tratada com fenol. Para a confirmação dos picos destas substâncias foi realizado a adição de soluções padrões.

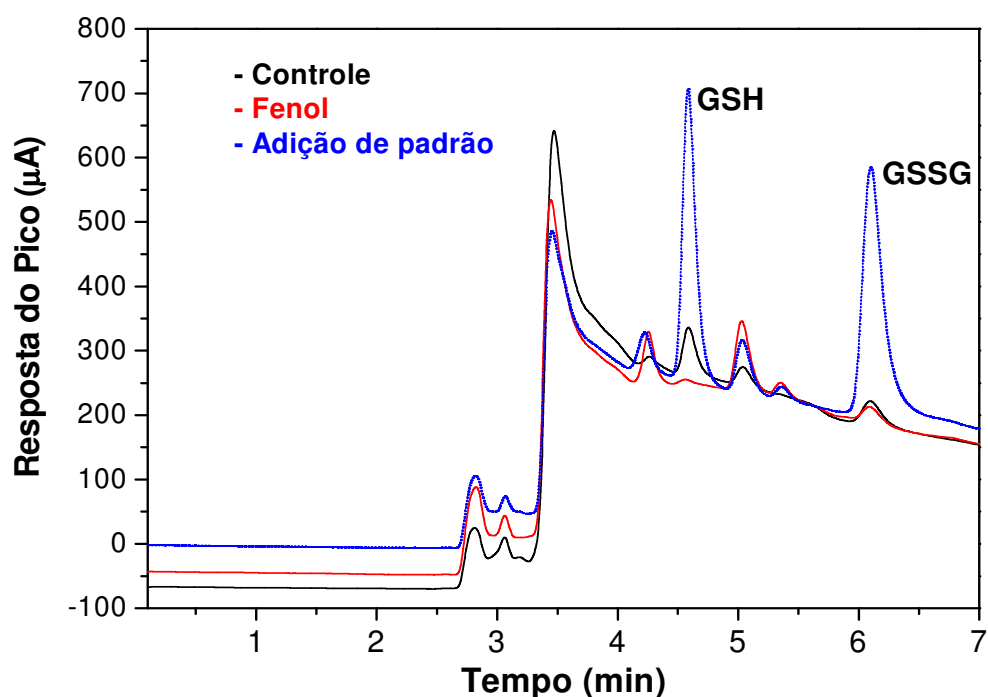


Figura 28. Cromatograma obtido na determinação de GSH e GSSG em extrato celular de *M. polymorphus* exposta a $1,5 \text{ mmol. L}^{-1}$ de fenol por 48 h.

Os níveis de GSH foram menores no grupo tratado com fenol, entretanto os níveis de GSSG permaneceram constantes (figura 28). Consequentemente, o fenol provocou um decréscimo da razão de GSH/GSSG de aproximadamente 80% (figura 29). Esta depressão de GSH pode estar relacionada com o seu uso em processos como glutationação de proteínas e detoxificação do fenol pela atividade de GST.

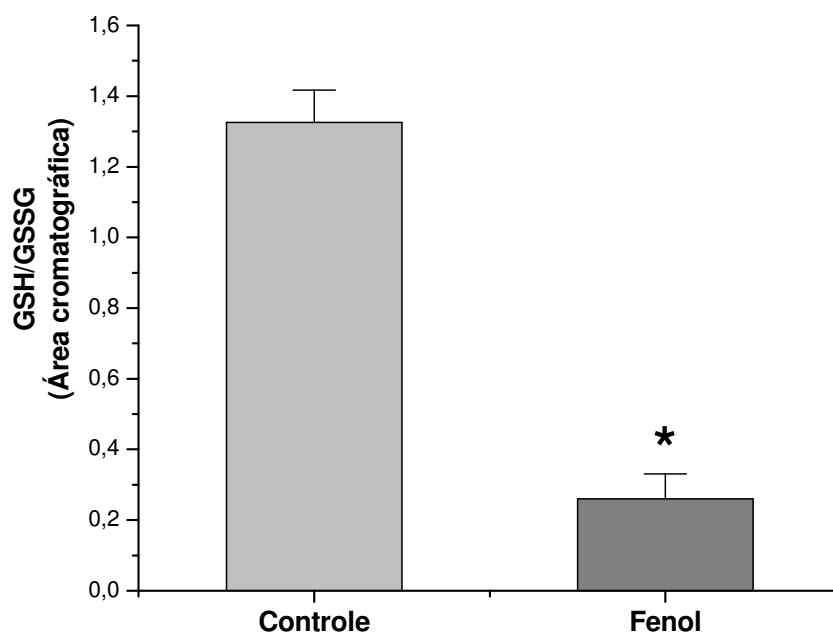


Figura 29. Relação de GSH/GSSG presente em extrato celular de *M. polymorphus* exposta a 1,5 mmol. L⁻¹ de fenol por 48 h (*significância: $p < 0,05$, ANOVA).

4.7. Determinação do conteúdo de pigmentos fotossintéticos

Os cromatogramas obtidos nas condições de extração padronizadas (item 3.9) indicaram a presença de alguns pigmentos majoritários, e outros em menor quantidade na alga *M. polymorphus*, como mostra a figura 30. Ao se comparar os cromatogramas e os espectros no visível (figura 31) com dados da literatura (Stón and Kosakowska, 2002) e com os padrões dessas substâncias, pode ser sugerida a identidade desses pigmentos.

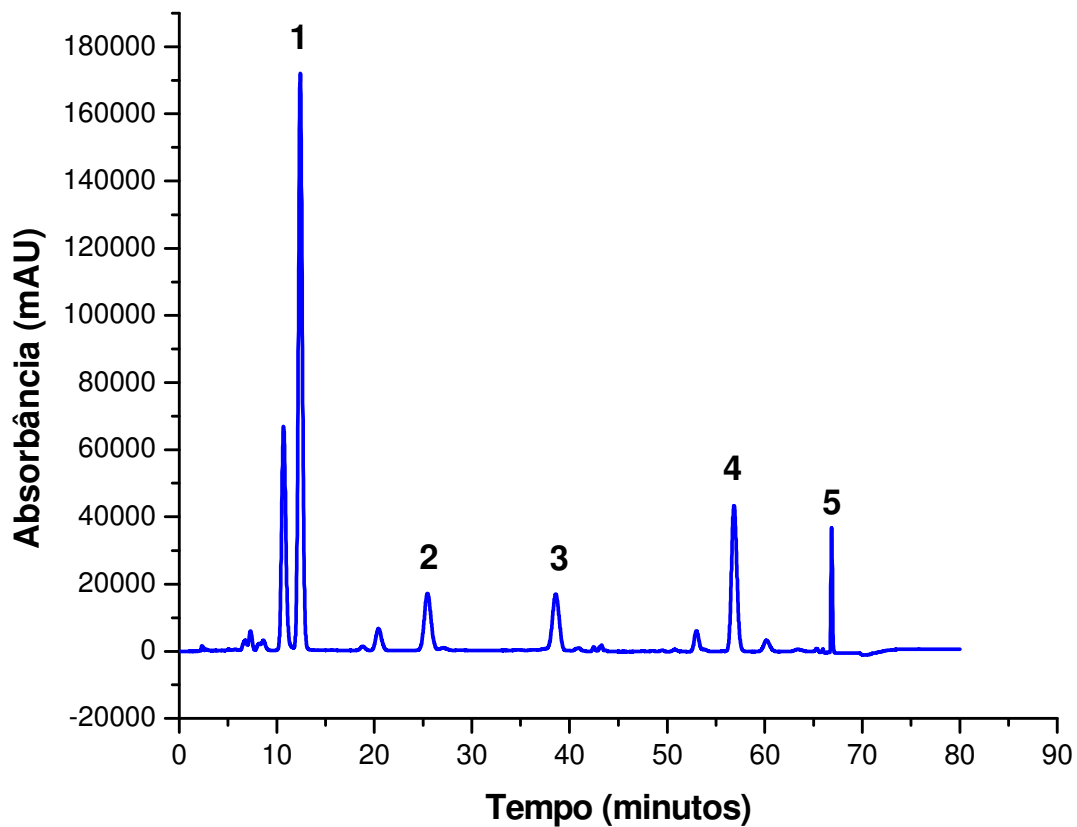


Figura 30. Cromatograma dos pigmentos presentes no extrato celular de *M. polymorphus* monitorada em 445 nm. **Pico 1:** Fucoxantina (TR: 12,39 min); **Pico 2:** Diadinoxantina (TR:25,43 min); **Pico 3:** Diatoxantina (TR: 38,57min); **Pico 4:** Clorofila a (TR: 56,85min); **Pico 5:** β -Caroteno (TR: 66,85 min).

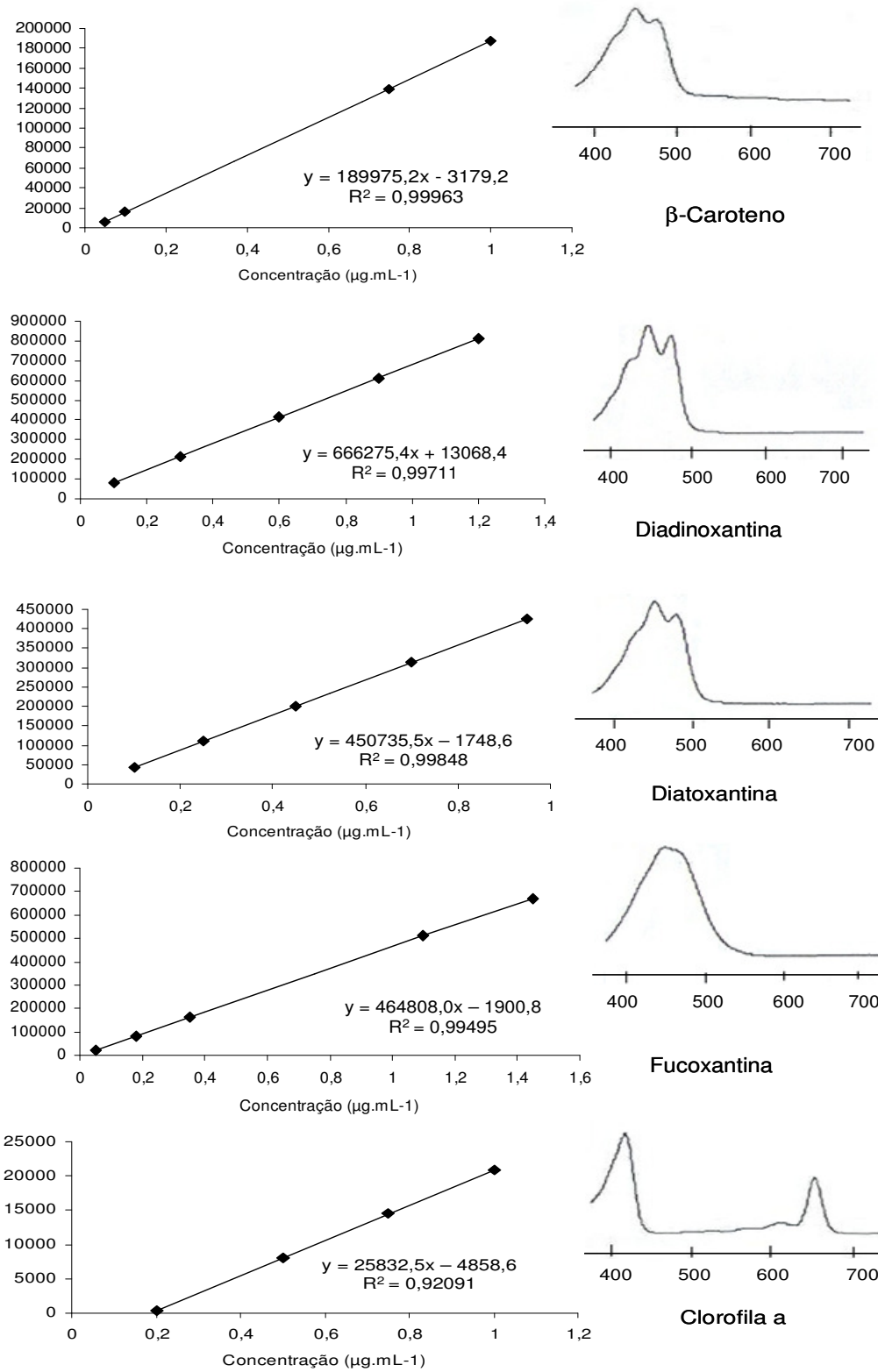


Figura 31. Curva de calibração e espectro dos padrões de pigmentos.

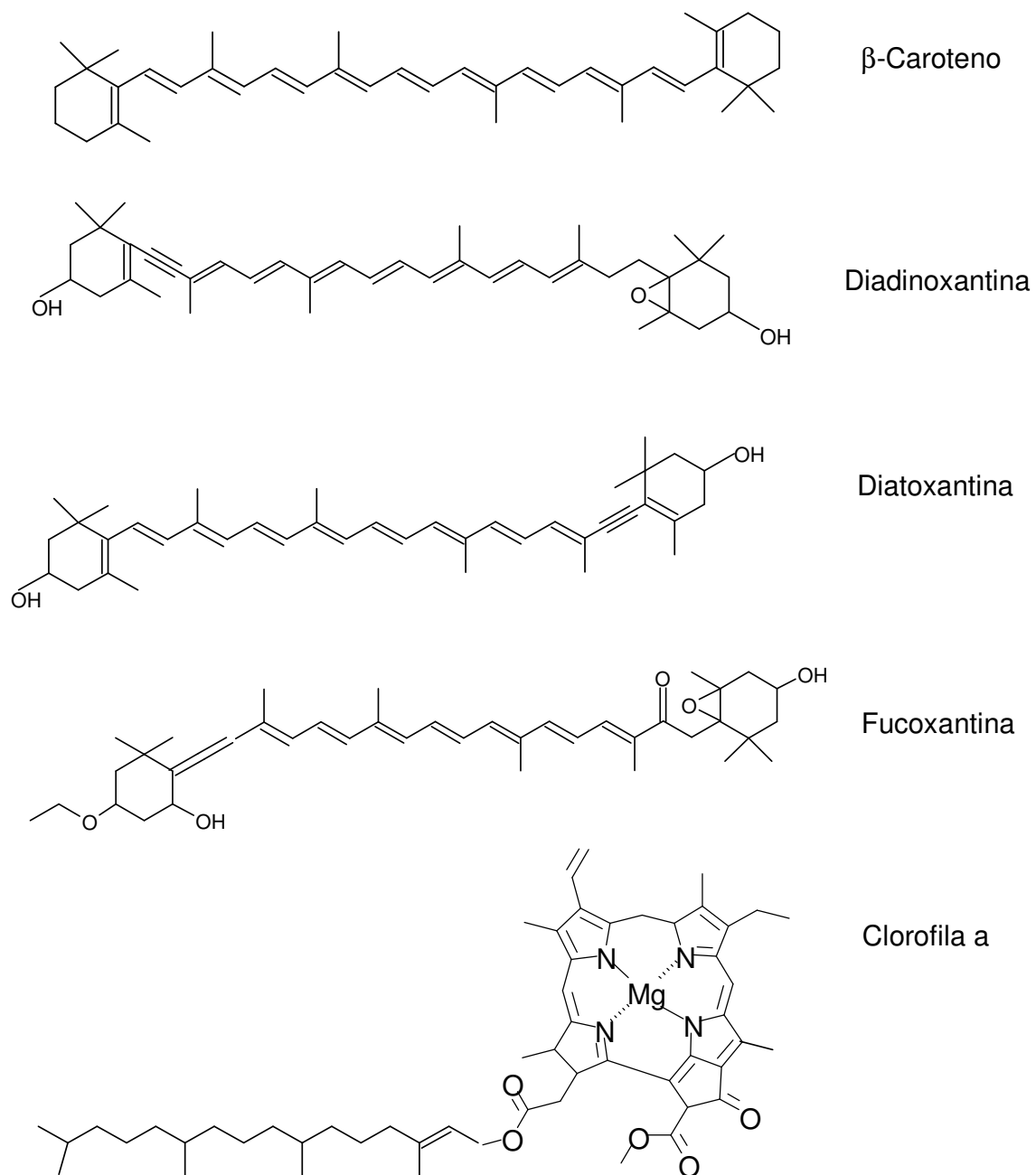


Figura 32. Estrutura química dos pigmentos encontrados no extrato celular de *M. polymorphus*.

A figura 32 mostra a estrutura química dos pigmentos encontrados em *M. polymorphus*, o qual não apresentou diferença significativa entre o grupo controle e tratado com fenol para o conteúdo de fucoxantina, diatoxantina, diadinoxantina e β -caroteno. No entanto, o fenol provocou uma diminuição nos níveis de clorofila-a (figura 33).

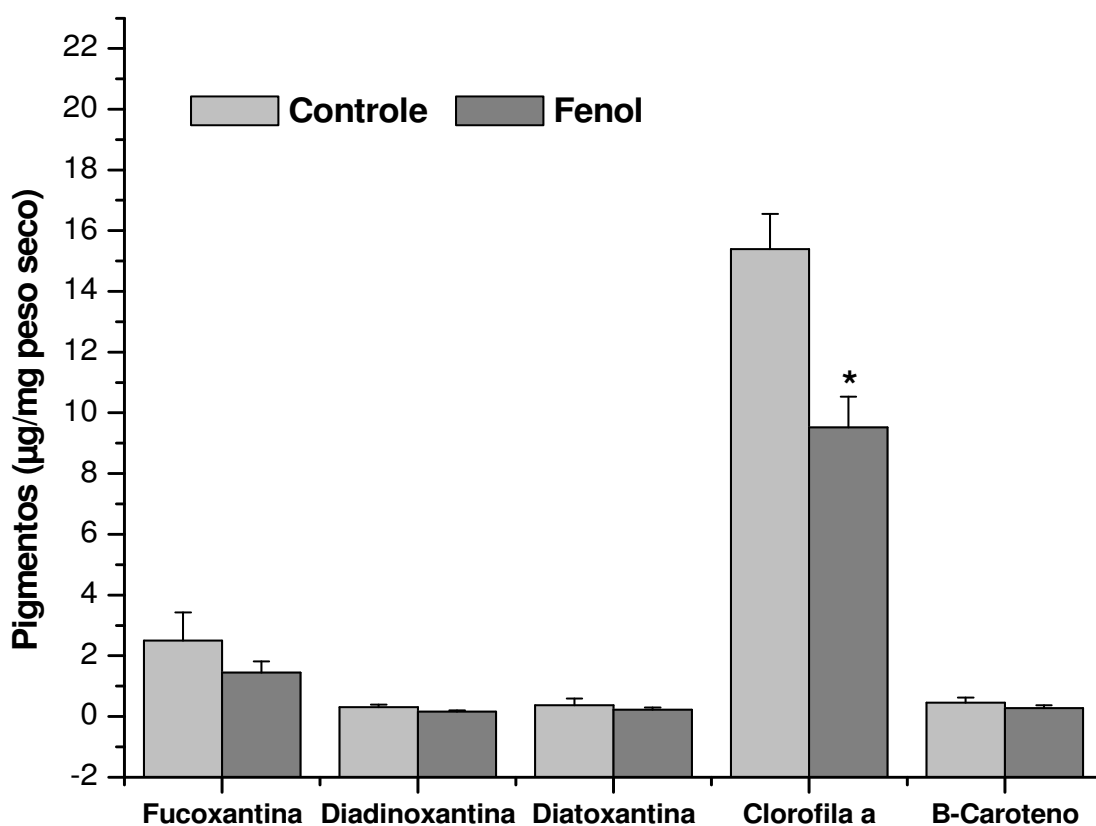


Figura 33. Conteúdo de pigmentos em extrato celular de *M. polymorphus* exposta a 1,5 mmol. L⁻¹ de fenol por 48 h (*significância: p<0,05, ANOVA).

4.8. Experimentos de biodegradação

Para verificar uma possível biodegradação do fenol pela microalga *M. polymorphus* duas abordagens experimentais foram realizadas como descrito no item 3.10.1.

A figura 34 mostra a concentração de fenol presente no meio de cultura onde a alga cresceu sob exposição a $1,0 \text{ mmol.L}^{-1}$ de fenol ao longo de 6 dias. É possível observar nesta figura um decréscimo na concentração de fenol de aproximadamente $250 \text{ }\mu\text{mol.L}^{-1}$ no 6º dia, o que não ocorre com o branco. O branco refere-se ao meio de cultura com a mesma concentração de fenol sem a presença da microalga. Este branco foi realizado para verificar um possível desaparecimento do fenol por degradação a luz ou por evaporação.

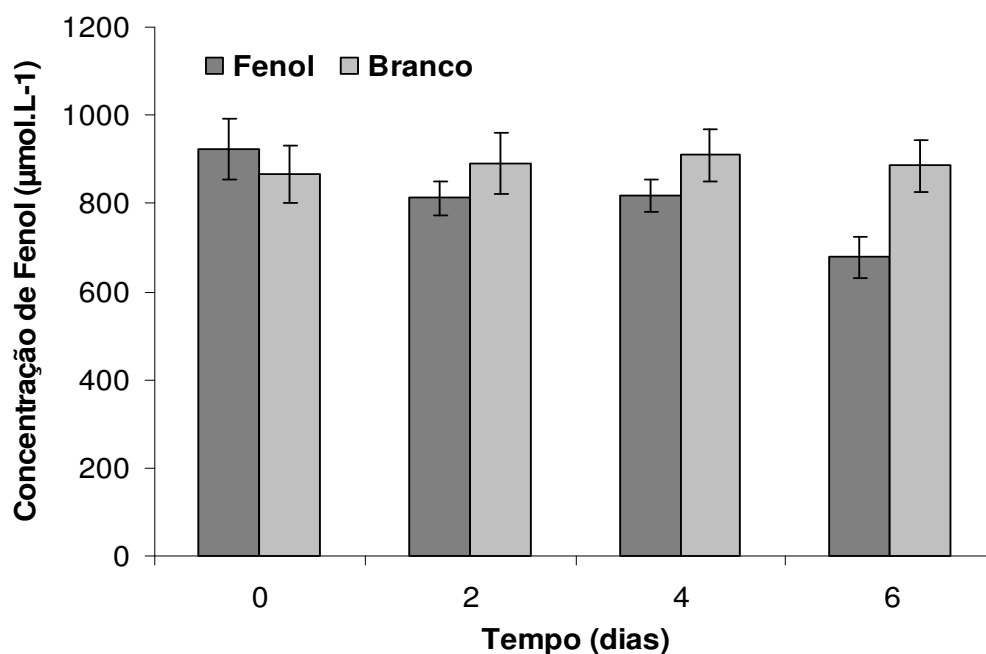


Figura 34. Conteúdo de fenol em meio de cultura de *M. polymorphus* exposta a $1,5 \text{ mmol.L}^{-1}$ de fenol por 48 h.

Como os resultados anteriores mostraram uma indução das enzimas de biodegradação do fenol, PH e C2,3-D, em células expostas a $1,0 \text{ mmol.L}^{-1}$ desse poluente por um período de 6 dias uma outra abordagem experimental foi estudada. Utilizamos essas células previamente expostas ao poluente, após serem lavadas como descrito no item 3.10.1 (experimento 2), para verificar o desaparecimento do fenol no meio de cultura.

No momento do inóculo a concentração de fenol no meio de cultura foi de $110,9 \text{ } \mu\text{mol.L}^{-1}$ e após 2 horas de exposição a este poluente a concentração foi de $0,9 \text{ } \mu\text{mol.L}^{-1}$ como apresentado na figura 35.

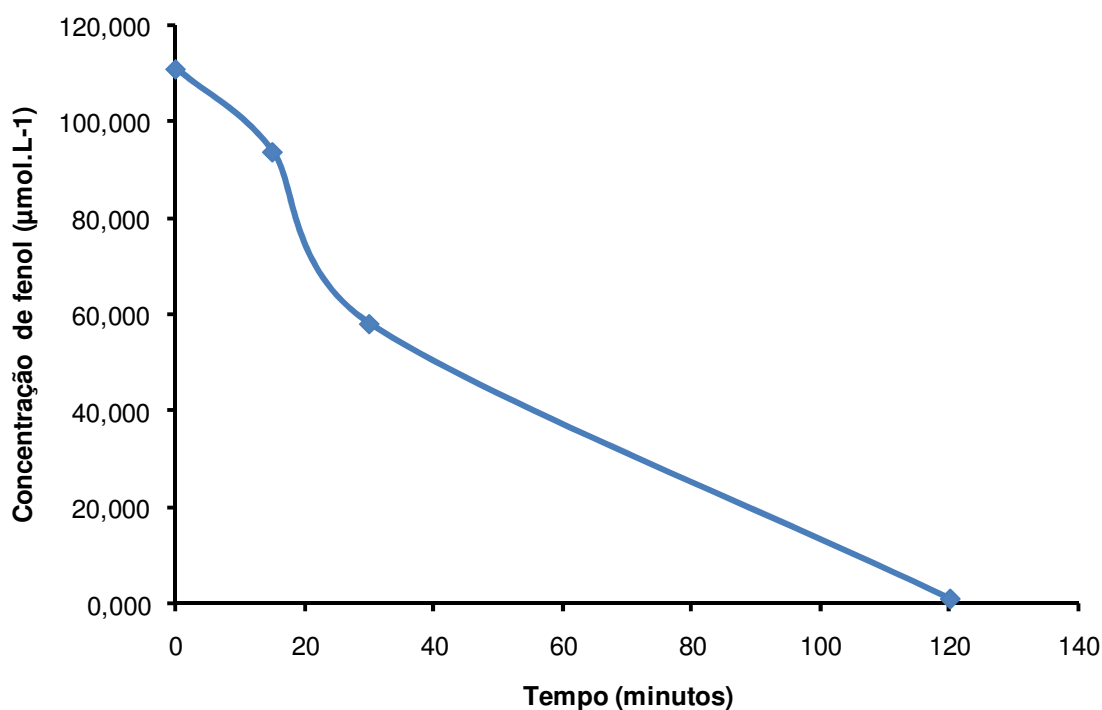


Figura 35. Determinação de fenol em meio de cultura de *M. polymorphus* exposta a $110,9 \text{ } \mu\text{mol.L}^{-1}$ do poluente.

Estes resultados demonstram que com o sistema enzimático de biodegradação já ativado *M. polymorphus* apresentou uma alta capacidade na remoção de fenol, aproximadamente 99%, podendo este ser biotransformado e utilizado como fonte de carbono pela microalga. A figura 36 apresenta o cromatograma obtido para estas amostras.

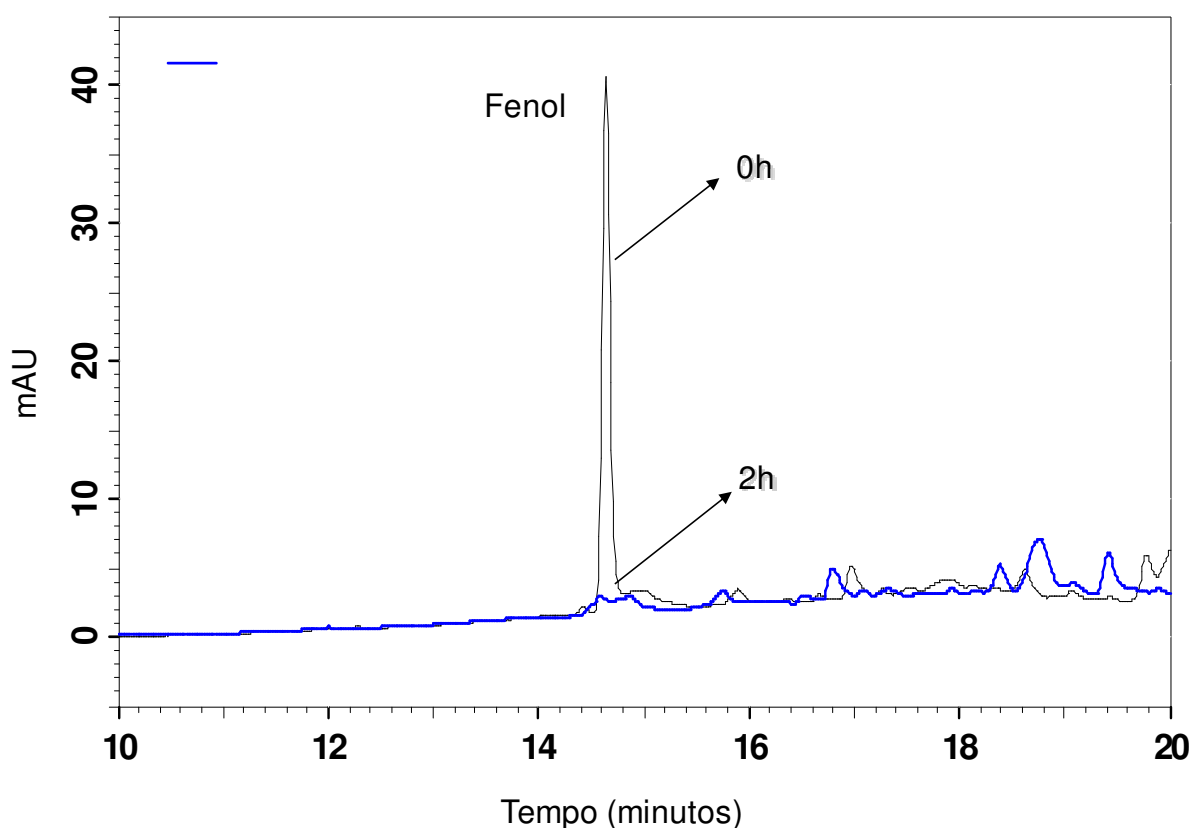


Figura 36. Cromatograma obtido na determinação de fenol m meio de cultura de *M. polymorphus* exposta a $110,9 \mu\text{mol.L}^{-1}$ do poluente.

Para a identificação e quantificação dos possíveis metabólitos do fenol por CG/MS presentes na alga *M. polymorphus* foram analisadas amostras de células e

também de meio de cultura onde essas células cresceram. Foram utilizados padrões de fenol, fenol d5, catecol, catecol d6, ácido cis, cis-mucônico e ácido trans, trans-mucônico. A análise de 2-hidroximucônico semialdeído não foi possível, uma vez que não tem disponível o padrão comercial.

No meio de cultura não foi possível observar a presença de catecol, ácido cis, cis-mucônico e ácido trans, trans-mucônico indicando que esses metabólitos não foram excretados pela microalga. Uma hipótese é que *M. polymorphus* tenha utilizado o fenol como fonte de carbono para síntese de proteínas, lipídeos e carboidratos.

A figura 37 apresenta os íons (m/z) gerados e monitorados no CG/MS a partir do catecol e do catecol deuterado, após o processo de derivatização com BSTFA (item 3.10.3).

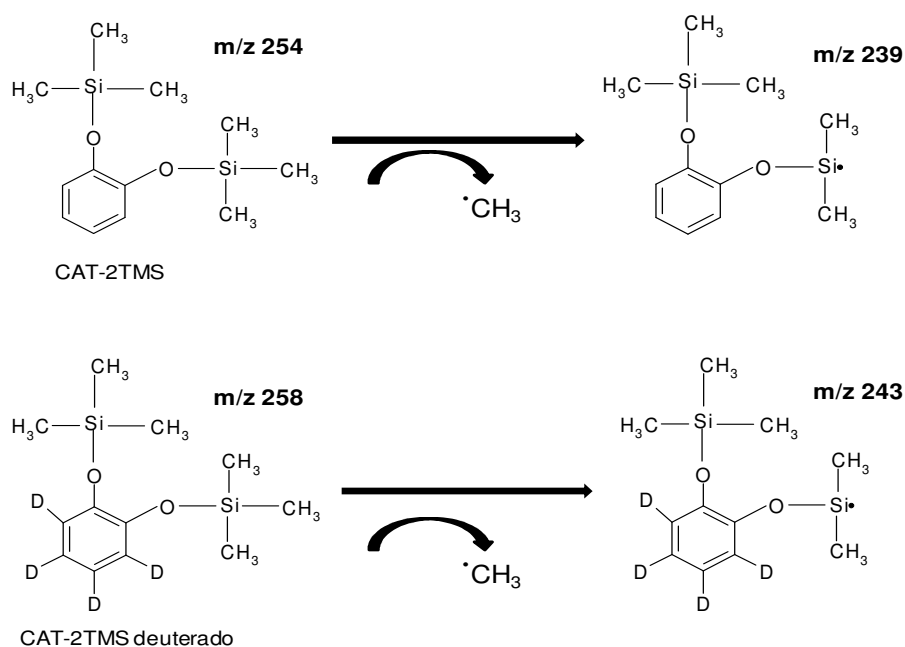


Figura 37. Mecanismo de fragmentação do catecol e seu deuterado após o processo de derivatização com BSTFA.

Nas figuras 38 e 39 são apresentados o cromatograma e o espectro de massas do derivado trimetilsilil de catecol e catecol deuterado obtido no CG/MS.

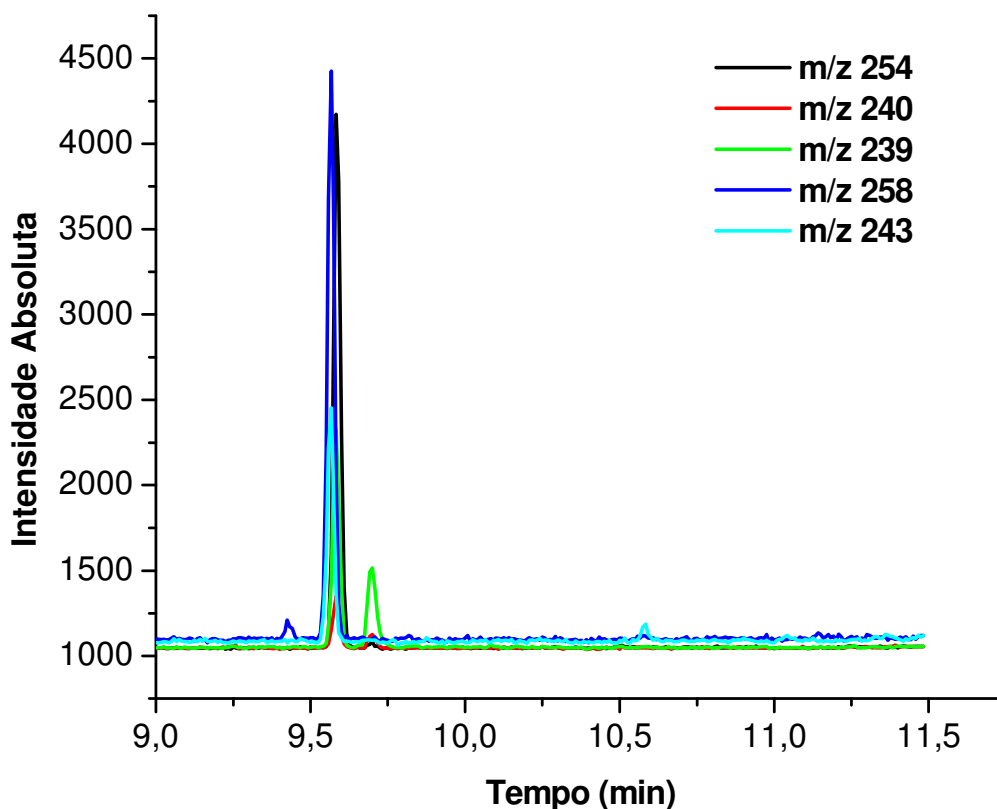


Figura 38. Cromatograma do derivado trimetilsilil de catecol e catecol deuterado obtido no CG/MS. O detector do espectrômetro de massa foi operado usando fragmentação por impacto de elétrons (70 eV) com monitoramento seletivo dos íons (SIM) (Íons monitorados para CAT-2TMS: m/z 239, m/z 240, m/z 254 e para CAT-2TMS deuterado: m/z 243, m/z 258).

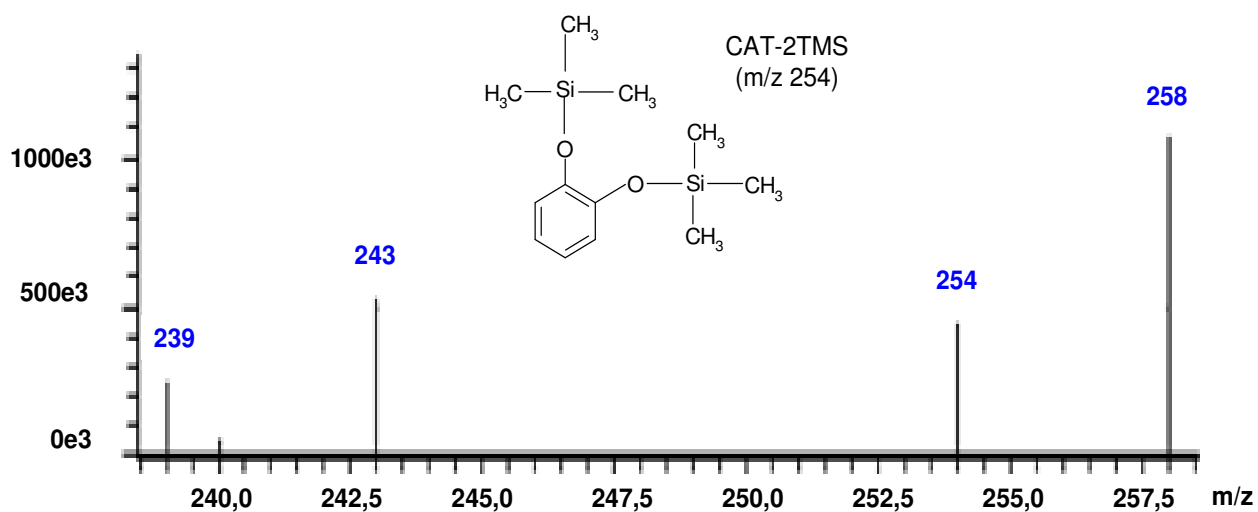


Figura 39. Espectro de massas do derivado trimetilsilil de catecol (CAT-2TMS) e catecol deuterado obtido no CG/MS. O detector do espectrômetro de massa foi operado usando fragmentação por impacto de elétrons (70 eV) com monitoramento seletivo dos íons (SIM) (Íons monitorados para CAT-2TMS: m/z 239, m/z 240, m/z 254 e para CAT-2TMS deuterado: m/z 243, m/z 258).

A análise no extrato celular de *M. polymorphus* mostrou um aumento do conteúdo de catecol ao longo do tempo (figura 40), sendo esse calculado em área relativa (Área do pico 254/ Área do pico 258). Com a técnica utilizada (item 3.10.3) não foram encontrados na célula o ácido cis, cis-mucônico e ácido trans, trans-mucônico. Estes resultados estão de acordo com os dados enzimáticos obtidos, uma vez que não foi encontrada a atividade de C1,2-D.

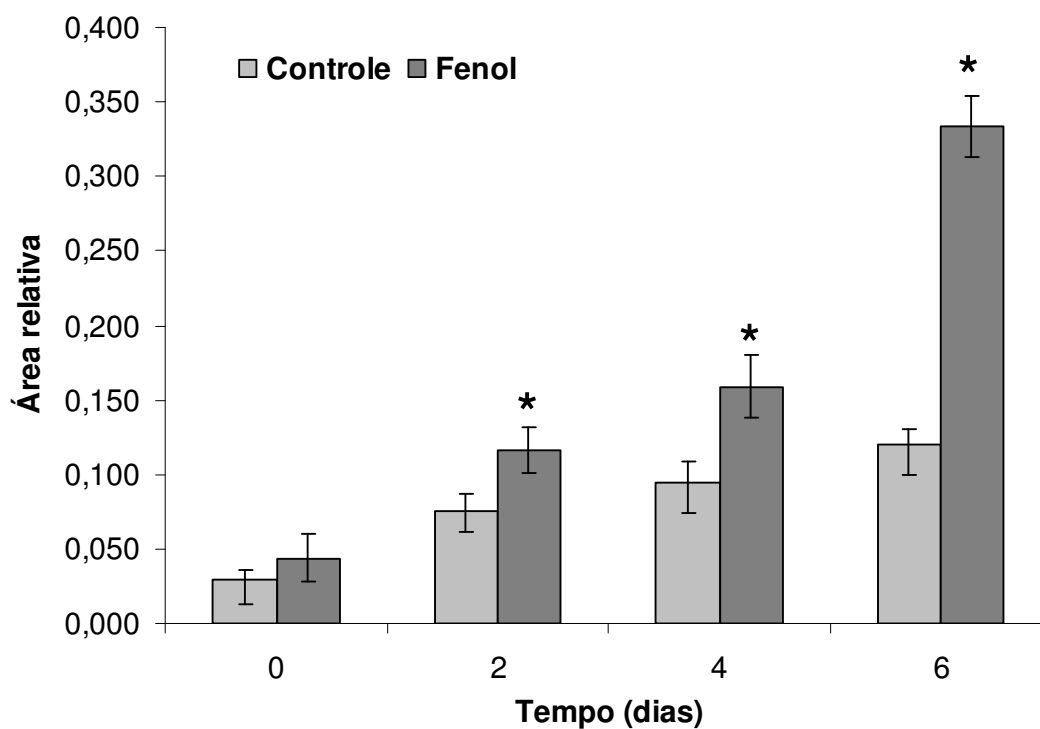


Figura 40. Conteúdo de catecol em área relativa presente em extrato celular de *M. polymorphus* (aproximadamente 100 mg de peso fresco) exposta a 1,0 mmol. L⁻¹ de fenol ao longo de 6 dias (*significância: $p < 0,05$, ANOVA, grupo fenol comparado ao grupo controle de um mesmo dia).

5. Discussão

Para a utilização de algas em ensaios toxicológicos primeiramente é necessário conhecer o comportamento fisiológico da cultura a fim de utilizar organismos em boas condições de crescimento que possam responder a exposição aos poluentes. A curva de crescimento de algas sob condições padronizadas de nutrientes, luz, temperatura, salinidade e pH segue fases distintas como apresentadas na figura 41: lag, exponencial, estacionária e de declínio (Walsh *et al.*, 1988; Moreno-Garrido *et al.*, 2000).



Figura 41. Modelo de curva de crescimento para algas.

A *M. polymorphus* apresentou uma fase exponencial de crescimento por 7 dias com uma cultura de densidade inicial de células de 5×10^4 células/mL. Nesse período as condições para o crescimento são ótimas considerando nutrientes, luz, e baixa concentração de metabólitos tóxicos. À medida que a população algal aumenta os nutrientes tornam-se escassos, as células não recebem a quantidade de luz adequada devido ao sombreamento causado por outras células e a quantidade de substâncias excretadas aumenta fazendo com que a *M. polymorphus* entre em uma

fase estacionária de crescimento a partir do 7º dia (*vide* item 4.1). A fase lag não foi identificada nesse experimento indicando que a cultura de *M. polymorphus* já se encontrava adaptada as condições de cultivo. Também não foi identificada a fase de declínio que provavelmente deve ocorrer após os 24 dias amostrados.

A curva de crescimento obtida neste experimento foi similar a curva obtida por Sigaud-Kutner e colaboradores (2002) para esta mesma microalga. Sigaud- Kutner e colaboradores (2002) constataram também um aumento da concentração de clorofila-a ao longo da fase exponencial de *M. polymorphus* com um pico máximo no 7º dia e com seguinte diminuição até o 24º dia, indicando uma alta taxa de fotossíntese na fase exponencial de crescimento. No entanto, *M. polymorphus* mostrou-se mais sensível a deficiência de nutrientes quando comparada as microlgas *Tetraselmis gracilis* e *Lingulodinium polyedrum* (Sigaud-Kutner *et al.*, 2002).

As curvas de crescimento realizadas por contagem celular e por fluorescência da clorofila foram muito similares. A contagem celular no microscópio óptico mostrou-se um método eficaz que permite visualizar a forma da célula, assim como suas variações provocadas por algum fator externo, no entanto é um procedimento que depende maior tempo. A fluorescência da clorofila, método feito *in vivo*, foi um procedimento também eficaz e mais rápido quando comparado a contagem celular podendo ser mais vantajoso para a determinação da curva de crescimento, porém, não permite a visualização da célula.

Os resultados de inibição do crescimento variam de acordo com o tempo de exposição e com a densidade inicial de células, sendo que maior a quantidade de

células expostas ao poluente maior o valor de IC₅₀ (Moreno-Garrido *et al.*, 2000). Para esse estudo foi utilizado uma densidade maior de células (1×10^6 células/mL) com o intuito de obter maior massa para as análises enzimáticas.

Muitos trabalhos recomendam o uso das microalgas *Selenastrum capricornutum*, *Chlorella vulgaris*, *Scenedesmus* sp., *Phaeodactylum tricornutum*, *Skeletonema costatum*, *Thalassiosira pseudonana*, *Dunaliella tertiolecta*, *Tetraselmis chuii*, *Isochrysis galbana*, *Chaetoceros calcitrans* para os testes de fitotoxicidade (Lewis, 1995; Aidar *et al.*, 2002). No entanto, optamos pela diatomácea *Minutocellus polymorphus* por ter-se já mostrado sensível a diversos poluentes crescendo rapidamente e permitindo testes de toxicidade em 48 horas, além de ser uma microalga cosmopolita, amplamente distribuída pela costa brasileira e pouco estudada (Walsh *et al.*, 1988; Levy *et al.*, 2007).

M. polymorphus apresentou uma inibição de crescimento de 50% com 2,3 mmol. L⁻¹ (216,5 mg. L⁻¹) de fenol e de 20% com 1,5 mmol.L⁻¹ (141,2 mg. L⁻¹) do poluente para um tempo de 48 h. Valores similares de fenol (1,0 mmol. L⁻¹ de fenol) foram utilizados por Semple e Cain (1997) para a indução das enzimas de metabolização do fenol na microalga *Ochromonas danica*. O valor de EC₂₀, que causa 20% de inibição do crescimento algal, foi utilizado em nossos estudos a fim de verificar danos oxidativos, indução de enzimas antioxidantes e indução de enzimas de biotransformação do fenol. O valor de EC₅₀ não foi utilizado para estudos de indução enzimática uma vez que 50% das células podem já estarem mortas.

A diatomácea *M. polymorphus* apresentou-se mais sensível ao fenol quando comparada a microalga *Scenedesmus quadriculata* que possui EC₅₀ de 403 mg. L⁻¹

de fenol e a microalga *Chlorella* VT-1 que possui EC_{50} de 400 mg. L⁻¹ (Tisler e Zagorc-Koncan, 1997; Scragg, 2006). Testes de toxicidade com outras substâncias como cloroanísóis, pesticidas e metais pesados também foram realizados em *M. polymorphus* (Walsh *et al.*, 1988). Esta microalga apresenta boa sensibilidade a diversos poluentes, sendo uma espécie com potencial a ser utilizada em programas de biomonitoramento, uma vez que também apresenta bom crescimento e fácil cultivo em laboratório.

O teste de inibição de crescimento de *M. polymorphus* frente ao fenol também foi realizado em nossos estudos por meio da fluorescência da clorofila, no entanto, não apresentou resultados compatíveis com a da contagem celular, houve muitas variações das leituras de fluorescência entre a mesma réplica e réplicas diferentes. Isso pode ser explicado pela diminuição no conteúdo de clorofila que o fenol provocou na microalga (*vide* item 4.7).

Sabe-se que a exposição dos organismos aos poluentes estimula a produção de espécies reativas de oxigênio e leva a uma condição de estresse oxidativo podendo ser o mecanismo de toxicidade de alguns compostos em organismos frente à poluição seja pela produção direta de ERO, ou seja, pela depleção de antioxidantes endógenos como a GSH (Livingstone, 2001; Winterbourn, 2008).

Durante a metabolização do fenol são induzidas enzimas monooxigenases, como a fenol hidroxilase e catecol dioxigenase, que quando ativadas reduzem o oxigênio ao ânion superóxido. Neujahr e Kjellén (1978) demonstraram que a fenol hidroxilase pode atuar como NADPH-oxidase havendo um desacoplamento da redução do oxigênio a partir da hidroxilação do fenol com conseqüente formação de

H₂O₂. Em quantidades proporcionais de NADPH e fenol o desacoplamento ocorre em torno de 14% (Neujahr e Kjellén, 1978).

A exposição de *M. polymorphus* ao fenol induziu a atividade das enzimas antioxidantes SOD (aproximadamente 5 vezes maior que o grupo controle) e catalase (40% maior na alga exposta ao fenol). Nossos dados estão de acordo com diversos estudos que mostram a indução de enzimas antioxidantes em organismos expostos a poluentes. Em *Skletonema costatum* foi observado um aumento de 157% na atividade de SOD, de 172% na atividade de APx e 253% na atividade de GST durante a exposição a 6 mg. L⁻¹ de 2,4-DCP em 96 h (Yang *et al.*, 2002). Um aumento da atividade de SOD também foi encontrado em *Scenedesmus armatus* crescendo em altas concentrações de CO₂ e expostas aos poluentes antraquinona e fenantrenoquinona (Tukaj e Aksmann, 2007). No entanto, em *M. polymorphus* as enzimas APx, DHAR, GR e GPx não apresentaram diferença significativa de suas atividades entre o grupo tratado com fenol e o grupo controle.

O aumento de atividade da SOD e catalase na microalga exposta ao fenol pode ser devido ao processo de metabolização do fenol pela indução da atividade de monooxigenases, PH e C2,3-D, que podem levar a produção de O₂^{•-} (Ishida *et al.*, 2004).

A figura 42 apresenta o possível mecanismo de geração de ERO durante a biotransformação do fenol. Uma vez formado o ânion superóxido são induzidas as enzimas antioxidantes, sendo a SOD considerada como a 1^a linha de defesa antioxidante e atuando na dismutação do ânion superóxido gerando H₂O₂, que por sua vez é degradado pelas enzimas catalase, GPx, Apx. O radical [•]OH também pode

ser formado quando metais de transição (Fe^{+2} , Cu^{+1} , Mn^{+2}) catalisam a decomposição de H_2O_2 .

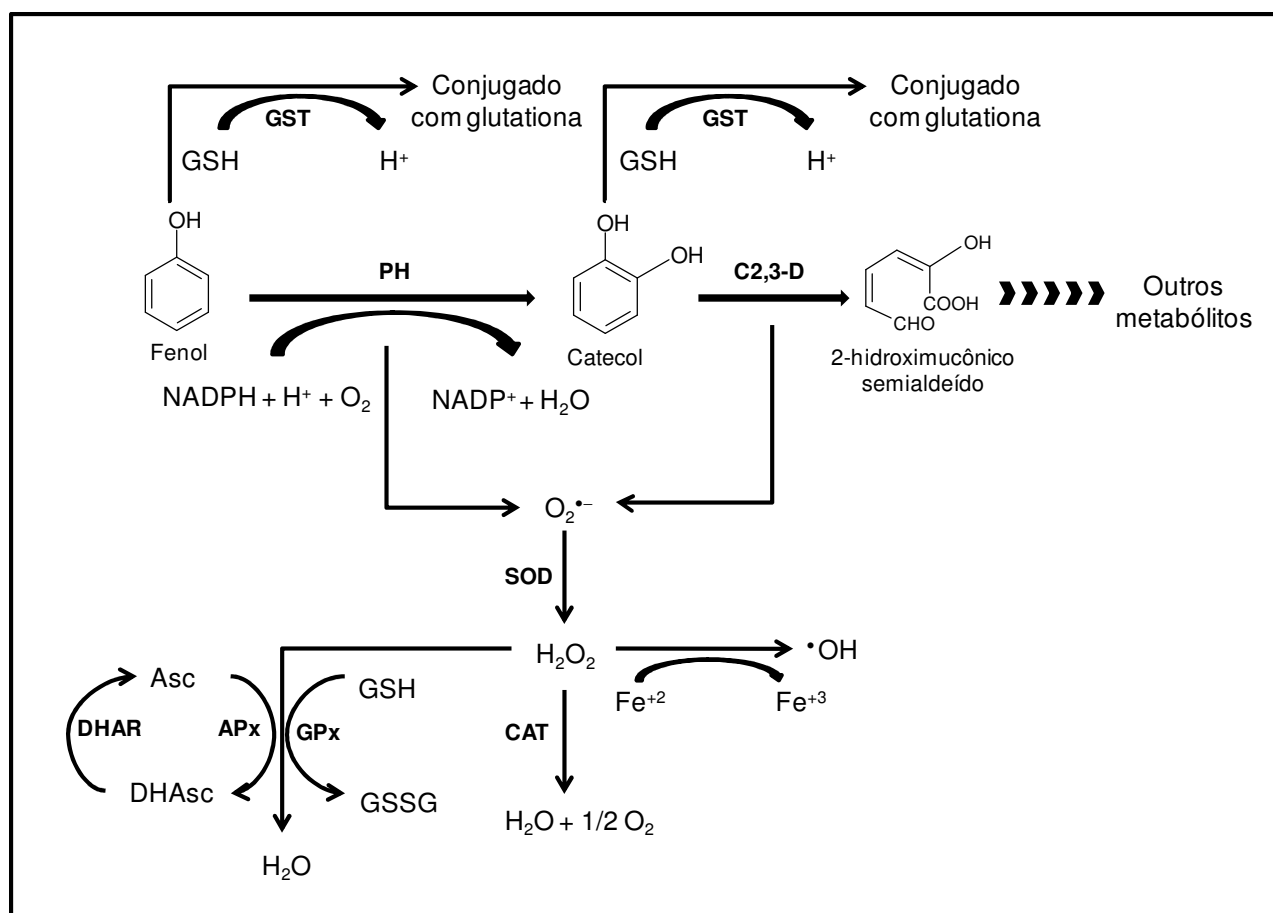


Figura 42: Mecanismo de geração de ERO e integração das defesas antioxidantes durante a biotransformação do fenol (Asc: ascorbato, DHAsc: deidroascorbato).

Durante a exposição de *M. polymorphus* a $1,5 \text{ mmol.L}^{-1}$ de fenol as enzimas PH e a C2,3-D apresentaram um aumento de atividade no grupo tratado com fenol ao longo de 6 dias. Semple e Cain (1997) também mostram uma indução de atividade de PH e C2,3-D para a alga *Ochromonas danica* crescendo em presença

de fenol. A atividade de PH em *M. polymorphus* no 6º dia ($7,1 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$) foi similar a atividade de PH presente em *O. danica* ($16,7 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$). No entanto, para C2,3-D, apesar de ser também induzida ao longo do tempo, a atividade foi bem menor quando comparada a *O. danica* ($0,94 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ para *M. polymorphus* e $219 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ para *O. danica*) (Semple e Cain, 1997). A baixa atividade de C2,3-D pode ter provocado o acúmulo de catecol em *M. polymorphus* ao longo do tempo (vide figura 31).

Na microalga *M. polymorphus* exposta ao fenol não foi detectada a atividade de C1,2-D sugerindo que a degradação do fenol segue uma via de meta clivagem sendo formado o 2-hidroximucônico semialdeído pela ação de C2,3-D (figura 43).

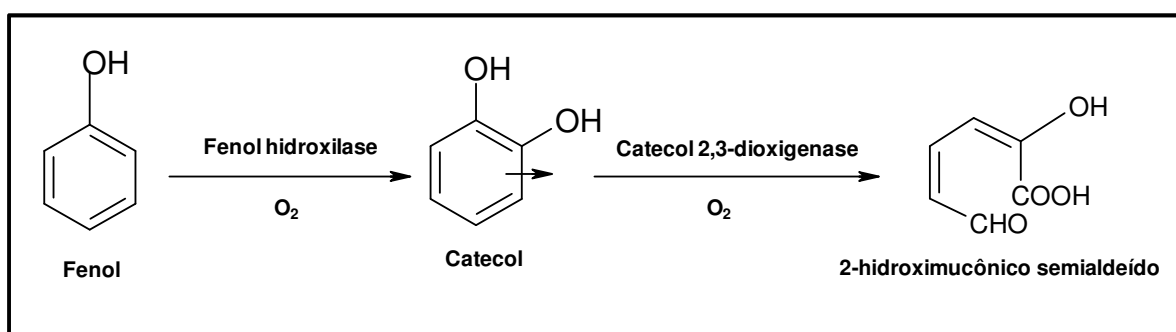


Figura 43: Suposto mecanismo de degradação do fenol em *M. polymorphus*.

Outra enzima que também participa no processo de detoxificação do fenol, a GST, apresentou maior atividade na microalga *M. polymorphus* exposta a esse poluente ($7,8 \pm 3,4 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ e $14,0 \pm 2,1 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ no grupo controle e fenol, respectivamente). Valores similares foram encontrados na microalga *Skeletonema costatum* ($13,24 \pm 4,33 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$) exposta a 6 mg. L^{-1} de 2,4-

diclorofenol (2,4-DCP) por 96 h. A adição de GSH exógena para a cultura da diatomácea *S. costatum* aumentou a degradação de 2,4-DCP e promoveu o crescimento da microalga, sugerindo que a conjugação com GSH foi o principal mecanismo envolvido na detoxificação do 2,4-DCP neste organismo (Yang *et al.*, 2002). Na costa noroeste de Portugal a GST foi utilizada como biomarcador em diversas espécies de *Fucus* apresentando maior atividade em locais contaminados (Cairrão *et al.*, 2004).

Em *M. polymorphus* o fenol provocou uma diminuição do conteúdo de GSH e a razão de GSH/GSSG diminuiu em aproximadamente 80% no grupo tratado com o poluente. Isto pode ser explicado pelo consumo de GSH durante a maior atividade de GST ou ainda a GSH pode estar envolvida em outros processos, como glutationação protéica. Esses resultados demonstram que GSH exerce uma função importante na detoxificação de fenol por *M. polymorphus*.

O grupo controle e tratado com fenol não apresentaram diferenças significativas no conteúdo de MDA sugerindo que o poluente fenol não provocou danos nas membranas lipídicas.

A exposição ao fenol também não alterou o conteúdo dos pigmentos fucoxantina, diatoxantina, diadinoxantina e β -caroteno em *M. polymorphus*, no entanto, provocou uma diminuição nos níveis de clorofila a.

Em culturas de *M. polymorphus* exposta a $1,0 \text{ mmol.L}^{-1}$ de fenol a concentração do mesmo diminuiu aproximadamente $250 \text{ }\mu\text{mol.L}^{-1}$ ao longo de 6 dias. A remoção de fenol em culturas de microalgas pode ocorrer por perda abiótica, como fotodegradação e/ou evaporação, por bioacumulação ou por biotransformação

(Petroutsos *et al.*, 2007). Para verificar a perda abiótica de fenol foi realizado um controle contendo apenas meio de cultura e fenol, sem a presença da microalga, no qual a concentração de fenol permaneceu constante durante os 6 dias de experimento.

A bioacumulação de fenol não foi observada em *M. polymorphus* uma vez que o fenol não foi encontrado dentro da célula. Mas ao contrário, ocorreu um aumento do conteúdo de catecol intracelular ao longo do tempo sendo que com a mesma técnica não foram encontrados na célula o ácido cis, cis-mucônico e ácido trans, trans-mucônico. O acúmulo de catecol pode ter ocorrido pela baixa atividade de C2,3-D encontrada em *M. polymorphus*. Nas microalgas *Ankistrodesmus braunii* e *Scenedesmus quadriculata* foram observados uma alta remoção de catecol, aproximadamente 50% e 90% em 5 dias e 10 dias de exposição, respectivamente (Pinto *et al.*, 2002).

No meio de cultura onde *M. polymorphus* foi exposta ao fenol não foi detectado a presença de catecol, ácido cis, cis-mucônico e ácido trans, trans-mucônico, indicando que esses metabólitos não foram excretados para o meio.

Em *O. danica* o fenol também apresentou biodegradação via meta-clivagem com conseqüente formação de piruvato e acetaldeído e o tratamento com ^{14}C -fenol mostrou que o mesmo foi completamente metabolizado produzindo 65% de $^{14}\text{CO}_2$ e 20% de ^{14}C incorporado na biomassa em proteínas, lipídeos e carboidratos. O mecanismo de biotransformação do fenol em *O. danica* é apresentado na figura 44 (Semple e Cain, 1996).

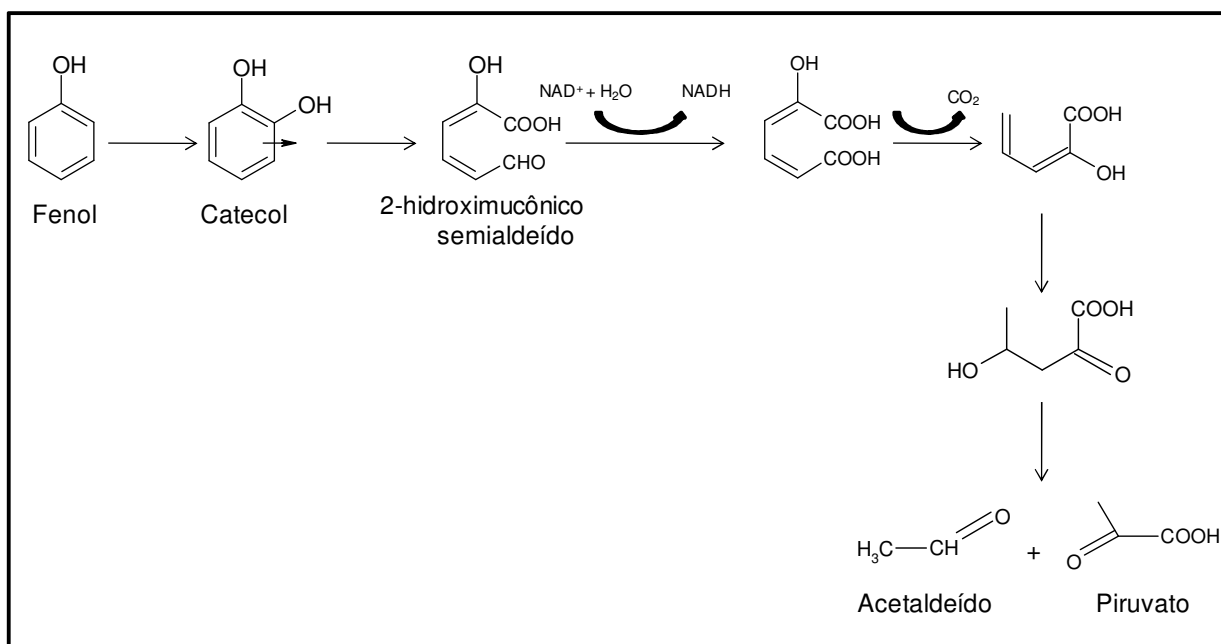


Figura 44: Mecanismo de biotransformação do fenol (adaptado de Müller, 1992 e Semple e Cain, 1996).

Muitos estudos em bactérias e fungos mostram a degradação de fenol por orto clivagem gerando como produto o ácido cis, cis-mucônico (Loh e Chua, 2002; Santos *et al.*, 2003; Margesin *et al.*, 2004). Na bactéria *Pseudomonas putida* ocorreu meta e orto clivagem do catecol formado a partir da degradação de benzoato de sódio, o tipo de via de degradação do catecol foi dependente da concentração inicial de benzoato de sódio, em células expostas até 200 mg.L^{-1} ocorreu orto clivagem com indução da enzima catecol 1,2-dioxigenase e produção de ácido cis, cis- mucônico, e com concentrações acima de 300 mg.L^{-1} ocorreu a meta clivagem com indução da enzima catecol 2,3-dioxigenase e produção de 2-hidroximucônico semialdeído (Loh e Chua, 2002). Apenas na microalga *Synechococcus* PCC 7002, uma cianobactéria, exposta a 100 mg.L^{-1} de fenol foi encontrada a orto-clivagem (Wurster *et al.*, 2003).

Em culturas de *M. polymorphus* previamente expostas ao fenol e, portanto, com as enzimas PH e C2,3-D induzidas, foi possível observar uma maior remoção do fenol. A cultura de microalga exposta a $110,9 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de fenol foi capaz de reduzir essa concentração para $0,9 \mu\text{mol.L}^{-1}$ após 2 horas, indicando uma remoção de 99% de fenol. Estes dados estão em concordância com os encontrados por Semple e Cain, 1997 que também utilizaram *Ochromonas danica* previamente exposta ao fenol para verificar a metabolização.

Petroustos e colaboradores (2007) verificaram a remoção de 65% de 20mg.L^{-1} de p-clorofenol em *Tetraselmis marina*, mas não encontraram remoção de fenol na alga exposta a essa mesma concentração, porém 20mg.L^{-1} de fenol não foi capaz de afetar o crescimento dessa microalga (Petroustos *et al.*, 2007).

Maiores estudos são necessários, no entanto os resultados sugerem que *M. polymorphus*, previamente exposta ao fenol e portanto, com seu sistema enzimático de biodegradação induzido é capaz de absorver o fenol e biotransformá-lo podendo utilizar esse poluente como fonte de carbono para síntese de macromoléculas como por exemplo, proteínas.

6. Conclusões

6.1. Principais conclusões

- ❖ A microalga *M. polymorphus* apresenta bom crescimento e boa sensibilidade ao poluente fenol.
- ❖ O fenol induz o aumento de atividade das enzimas antioxidantes SOD e catalase em *M. polymorphus*, além de provocar uma depressão dos níveis de GSH. Outras enzimas antioxidantes, tais como APx, DHAR, GR e GPx, não apresentaram variação.
- ❖ A microalga *M. polymorphus* pode ser considerada um importante bioindicador e SOD, catalase, GST e GSH importantes biomarcadores de poluição aquática.
- ❖ As enzimas de biotransformação do fenol (PH, C-2,3D e GST) são induzidas pelo substrato em *M. polymorphus*.
- ❖ A microalga *M. polymorphus* é capaz de remover o fenol do meio e apresenta um potencial a biotransformação deste poluente podendo ser utilizada em estações e/ou reatores para o tratamento de efluentes contendo fenol.

7. Referências Bibliográficas

Aebi H. (1984). Catalase in vitro. *Methods in Enzymology*. 105: 121-126.

Aidar, E.; Pereira, S.A.; Sousa, E.C.P.M. e Brasil-Lima, G.M.S. (2002). Testes de toxicidade com microalgas. Em: Métodos em Ecotoxicologia Marinha: Aplicações no Brasil. Nascimento, I.A.; Pereira, E.C. e Sousa, M. (Eds.) Artes Gráficas e Indústria Ltda.

Ahuatzi-Chacón, D.; Ordorica-Morales, G.; Ruiz-Ordaz, N.; Cristiani-Urbina, E.; Juárez-Ramírez, C. and Galíndez-Mayer, J. (2004). Kinetic study of phenol hydroxylase and catechol 1,2-dioxygenase biosyntheses by *Candida tropicalis* cells grown on different phenolic substrates. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*. 20: 695-702.

Aleksieva, Z.; Ivanova, D.; Godjervargova T. and Atanasov, B. (2002). Degradation of some phenol derivatives by *Trichosporum cutaneum* R57. *Process Biochemistry*. 37: 1215-1219.

Andreozzi, R.; Di Somma, I.; Pollio, A.; Pinto, G. and Sanchirico, R. (2008). Toxicity of unwanted intermediates and products formed during accidental thermal decomposition of chemicals. *Journal of Hazardous Materials*. 150: 433-437.

Alexieva, Z.; Gerginova, M.; Zlateva, P. and Peneva, N. (2004). Comparison of growth kinetics and phenol metabolizing enzymes of *Trichosporon cutaneum* R57 and mutants with modified degradation abilities. *Enzyme and Microbial Technology*. 34: 242-247.

Asada, K. (1984). Chloroplasts: Formation of Active oxygen and its Scavenging. *Methods in Enzymology*. 105: 422-429.

ATSDR - Agency for Toxic Substances and Disease Register. (2005). CERCLA - Comprehensive Environmental Response, Compensation, and Liability Act. 2005 CERCLA Priority List of Hazardous Substances. Disponível em: <http://www.atsdr.cdc.gov/cercla/05list.html>. Acesso em: 27 de outubro de 2008.

ATSDR - Agency for Toxic Substances and Disease Register. (2006). *Toxicological Profile for Phenol*. Department of Health and Human Services. Disponível em: <http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp115.pdf>. Acesso em: 27 de outubro de 2008.

Barros, M.P.; Granbom, M.; Colepicolo, P. and Pedersén, M. (2003). 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*. 420: 161-168.

Bartels, I.; Knackmuss, H.J. and Reineke, W. (1984). Suicide inactivation of catechol 2,3-dioxygenase from *Pseudomonas putida* mt-2 by 3-halocatechol. *Applied and Environmental Microbiology*. 47 (3): 500-505.

- Bengtson Nash, S.M.; Quayle, P.A.; Schreiber, U. and Müller, J.F. (2005). The selection of a model microalgal species as biomaterial for a novel aquatic phytotoxicity assay. *Aquatic Toxicology*. 72: 315–326.
- Bergauer, P.; Fonteyne, P.A.; Nolard, N.; Schinner, F. and Margesin, R. (2005). Biodegradation of phenol and phenol-related compounds by psychrophilic and cold-tolerant alpine yeasts. *Chemosphere*. 59: 909-918.
- Borde, X.; Guieysse, B.; Delgado, O.; Muñoz, R.; Hatti-Kaul, R.; Nugier-Chauvin, C.; Patin, H. and Matiasson, B. (2003). Synergistic relationships in algal-bacterial microcosms for the treatment of aromatic pollutants. *Bioresource Technology*. 86: 293-300.
- Bradford M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of proteins-dye binding. *Analytical Biochemistry*. 72: 248-254.
- Britton (1995). *Carotenoids, Isolation and Analysis*, Birkhäuser Verlag, Boston. Pp.28.
- Brown, R.K. and Kelly, F.J. (1996). Peroxides and other products. *In: Free Radicals, a practical approach*. Oxford University Press, New York.
- Buswell, J.A. (1974). The meta-cleavage of catechol by a thermophilic *Bacillus* species. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 60 (3): 934-941.
- Cáceres, T.; Megharaj, M. and Naidu, R. (2008). Toxicity and transformation of fenamiphos and its metabolites by two micro algae *Pseudokirchneriella subcapitata* and *Chlorococcum* sp. *Science of the Total Environment*. 398: 53-59.
- Cairrão, E.; Couderchet, M.; Soares, A.M.V.M. and Guilhermino, L. (2004). Glutathione-S-transferase activity of *Fucus* spp. as a biomarker of environmental contamination. *Aquatic Toxicology*. 70: 277–286.
- Galberg, I. and Mannervik, B. (1975). Purification and Characterization of the Flavoenzyme Glutathione Reductase from Rat Liver. *The Journal of Biological Chemistry*. 250: 5475-5480.
- Cardozo, K.H.M; Guaratini, T.; Barros, M.P.; Falcão, V.; Tonon, A.P.; Lopes, N.P.; Campos, S.C.G.; Torres, M.A.; Souza, A.O.; Colepicolo, P. and Pinto, E. (2007). Metabolites from algae with economical impact. *Comparative Biochemistry and Physiology C*. 146: 60-78.
- Cerniglia, C.E.; Gibson, D.T. and Baalen, C.V. (1980). Oxidation of naphthalene by cyanobacteria and microalgae. *Journal of General Microbiology*. 116: 495-500.

Cerniglia, C.E.; Gibson, D.T. and Baalen, C.V. (1982). Naphthalene metabolism by diatoms from the kachemak Bay Region of Alaska. *Journal of General Microbiology*. 128: 987-990.

CETESB - Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental. (2001). *Variáveis de qualidade das águas*. Disponível em: <http://www.cetesb.sp.gov.br/Agua/rios/variaveis.asp#fenois>. Acesso em: 27 de outubro de 2008.

Chaufan G.; Juárez, A.; Basack, S.; Ithuralde, E.; Sabatini, S.E.; Genovese, G.; Oneto, M.L.; Kesten, E. and Molina, M.C.R. (2006). Toxicity of hexachlorobenzene and its transference from microalgae (*Chlorella Kessleri*) to crabs (*Chasmagnathus granulatus*). *Toxicology*. 227: 262-270.

Colepicolo, P.; Camarero, V.C.P.C. and Hastings, J.W. (1992). A circadian rhythm in the activity of superoxide dismutase in the photosynthetic algae *Gonyaulax polyedra*. *Chronobiology International*. 9: 266-268.

Conti, M.E. and Cecchetti, G. (2003). A biomonitoring study: trace metals in algae and molluscs from Tyrrhenian coastal areas. *Environmental Research*. 93: 99-112.

Dagley, S.; Evans, W.C. and Ribbons, D.W. (1960). New pathways in the oxidative metabolism of aromatic compounds by microorganisms. *Nature*. 188 (4750): 560-566.

Day, J.G.; Benson, E.E. and Fleck, R.A. (1999). In vitro culture and conservation of microalgae: applications for aquaculture, biotechnology and environmental research. *In Vitro Cell Dev. Bio-Plant*. 35: 127-136.

DellaGreca, M.; Pinto, G.; Pollio, A.; Previtiera, L. and Temussi, F. (2003). Biotransformation of sinapic acid by the green algae *Stichococcus bacillaris* 155LTAP and *Ankistrodesmus braunii* C202.7a. *Tetrahedron Letters*. 44: 2779-2780.

Derraik, J.G.B. (2002). The pollution of the marine environment by plastic debris: a review. *Marine Pollution Bulletin*. 44: 842-852.

Dönmez, G.C.; Aksu, Z.; Öztürk, A. and Kutsal, T. (1999). A comparative study on heavy metal biosorption characteristics of some algae. *Process Biochemistry*. 34: 885-892.

Fent, k. (2003). Ecotoxicological problems associated with contaminated sites. *Toxicological Letters*. 140-141: 353-365.

Ferrat, L.; Pergent-Martini, C. and Roméo, M. (2003). Assessment of the use of biomarkers in aquatic plants for the evaluation of environmental quality: application to seagrasses. *Aquatic Toxicology*. 65: 187-204.

- Flohé, L. and Gunzler, W.A. (1984). Assays of glutathione peroxidase. *Methods in Enzymology*. 105: 114-121.
- Fridovich, I. (1978). The biology of oxygen radicals. *Science*. 201: 875-880.
- Fridovich, I. (1986). Superoxide dismutase. *Advances in Enzymology*. 58: 62-98.
- Fukunaga, K.; Takama, K. and Suzuki, T. (1995). High-performance liquid-chromatographic determination of plasma malondialdehyde level without a solvent-extraction procedure. *Analytical Biochemistry*. 230: 20-23.
- Gibson, J.A.E.; Garrick, R.C.; Burton, H.R. and McTaggart, A.R. (1990). Dimethylsulfide and the alga *Phaeocystis pouchettii* in antartic coastal waters. *Marine Biology*. 104 (2): 339-346.
- Guaratini, T.; Cardozo, K.H.M.; Pinto, E. and Colepicolo, P. (2007). HPLC-DAD-ECD method for identification and quantification of pigments from algae. *Journal of Chromatographic A*. (submetido).
- Guillard, R.R.L. (1975). Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates. In: Smith WL, Chanley MH (eds.). *Culture of marine invertebrate animals*. Plenum Pub., Corp., New York. Pp. 29-60.
- Guillard, R.R. and Rhyther, J.H. (1962). Studies of marine planktonic diatoms I. *Cyclotella Nana* (Husted) and *Detonula Confervacea* (Cleve) Gran. *Journal Microbiology*. 8: 229-239.
- Habig, W.H.; Pabst, M.J. and Jakoby, W.B. (1974). Glutathione S-transferases: The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *The Journal of Biological Chemistry*. 249: 7130-7139.
- Halliwell, B. and Gutteridge, J.M.C. (2007). *Free Radicals in Biology and Medicine*, 4th ed., Oxford University Press, New York.
- Harvey, P.R.C.; Ilson, R.G. and Strasberg, S.M. (1989). The simultaneous determination of oxidized and reduced glutathiones in liver tissue by ion pairing reverse phase high performance liquid chromatography with a coulometric electrochemical detector. *Clinica Chimica Acta*. 180: 203-212.
- Haynes, D. and Johnson, J.E. (2000). Organochlorine, heavy metal and polyaromatic hydrocarbon pollutant concentrations in the Great Barrier Reef (Australia) environment: a review. *Marine Pollution Bulletin*. 41: 7-12.
- Hédouin, L.; Bustamante, P.; Fichez, R. and Warnau, M. (2008). The tropical brown alga *Lobophora variegata* as a bioindicator of mining contamination in the New

Caledonia lagoon: A field transplantation study. *Marine Environmental Research*. 66: 438-444.

Hidalgo, A.; Jaureguibeitia, A.; Begoña Prieto, M.; Rodríguez-Fernández, C.; Serra, J.L. and Llama, M.J. (2002). Biological treatment of phenolic industrial wastewaters by *Rhodococcus erythropolis* UPV-1. *Enzyme and Microbiology Technology*. 31: 221-226.

Hirooka, T.; Akiyama, Y.; Tsuji, N.; Nakamura, T.; Nagase, H.; Hirata, K. and Miyamoto, K. (2003). Removal of hazardous phenols by microalgae under photoautotrophic conditions. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 9 (2): 200-203.

Hirooka, T.; Nagase, H.; Uchida, K.; Hiroshige, Y.; Ehara, Y.; Nishikawa, J.I.; Nishihawa, T.; Miyamoto, K. and Hirata, Z. (2005). Biodegradation of bisphenol A and disappearance of its estrogenic activity by the green alga *Chlorella fusca* var. *vacuolata*. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 24 (8): 1896-1901.

His, E.; Beiras, R.E. and Seaman, M.N.L. (1999). The assessment of marine pollution. In: *Advances in Marine Pollution* (Southward, A. J.; Tyler, P.A. e Young, C.M. Ed.) Academic Press, London.

Hodgson, E. and Smart, R.C. (2000). In: *Introduction to biochemical toxicology*. 3rd ed., Wiley-Interscience, New York.

IBAMA - Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. (1988). *Manual de testes para a avaliação da ecotoxicidade de agentes químicos*. Secretaria do Meio Ambiente. Brasília.

Iscan, M. (2004). Hazard identification for contaminants. *Toxicology*. 205: 195-199.

Ishida, T.; Tanaka, H. and Horiike, K. (2004). 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*. 135: 721-730.

Islam, Md.S. and Tanaka, M. (2004). Impacts of pollution on coastal and marine ecosystems including coastal and marine fisheries and approach for management: a review and synthesis. *Marine Pollution Bulletin*. 48: 624-649.

Jinqi, I. and Hountian, O. (1992). Degradation of azo dyes by algae. *Environmental Pollution*. 75: 273-278.

Kirso, U. and Irha, N. (1998). Role of algae in fate of carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons in the aquatic environment. *Ecotoxicological and Environmental Safety*. 41: 83-89.

Klecka, G.M. and Gibson, D.T. (1981). Inhibition of catechol 2,3-dioxygenase from *Pseudomonas putida* by 3-chlorocatechol. *Applied and Environmental Microbiology*. 41 (5): 1159-1165.

Knapp, D.R. *Handbook of Analytical Derivatization Reactions*. John Wiley & Sons, New York.

Kranoschekova, R., Kirso, U., Perin, F. and Jacquignon, P. (1992). Binding of heteropolyarenes to protein. *Polycyclic Aromatic Comp*. 3: 41-49.

Krien, P.M.; Margou, V. and Kermici, M. (1992). Electrochemical determination of femtomole amounts of free reduced and oxidized glutathione. Application to human hair follicles. *Journal of Chromatography B*. 576: 255-261.

Kuhn, R.M.; Streb, C.; Breiter, R.; Richter, P.; NeeBe, T. and Häder, D.P. (2006). Screening for unicellular algae as possible bioassay organisms for monitoring marine water samples. *Water Research*. 40: 2695-2703.

Kuşçu, Ö.S. and Sponza, D.T. (2005). Performance of anaerobic baffled reactor (ABR) treating synthetic wastewater containing p-nitrophenol. *Enzyme and Microbiology Technology*. 36: 888-895.

Lakritz, J.; Plopper, C.G. and Buckpitt, A.R. (1997). Validated high-performance liquid chromatography – electrochemical method for determination of glutathione and glutathione disulfide in small tissue samples. *Analytical Biochemistry*. 247: 63-68.

Leitão, M.A.S.; Cardozo, K.H.M.; Pinto, E. and Colepicolo, P. (2003). PCB-induced oxidative stress in the unicellular marine dinoflagellate *Lingulodinium polyedrum*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. 45 (1): 59-65.

Levy, J.L.; Stauber, J.L. and Jolley, D.F. (2007). Sensitivity of marine microalgae to copper: The effect of biotic factors on copper adsorption and toxicity. *Science of The Total Environment*. 387: 141-154.

Lewis, M.E. (1995). Use of freshwater plants for phytotoxicity testing: a review. *Environmental Pollution*. 87: 319-336.

Liebe, B. and Fock, H.P. (1992). Growth and adaptation of the green alga *Chlamydomonas reinhardtii* on diesel exhaust particle extracts. *Journal of General Microbiology*. 138: 973-978.

Livingstone, D.R. (2001). Contaminant-stimulated reactive oxygen species production and oxidative damage in aquatic organisms. *Marine Pollution Bulletin*. 42 (8): 656-666.

- Loh, k.C. and Chua, S.S. (2002). *Ortho* pathway of benzoate degradation in *Pseudomonas putida*: induction of *meta* pathway at high substrate concentrations. *Enzyme and Microbial Technology*. 30: 620-626.
- López-Suárez, C.E.; Castro-Romero, J.M.; González-Rodríguez, M.V.; González-Soto, E.; Pérez-Iglesias, J.; Seco-Lago, H.M. and Fernández-Solís, J.M. (2000). Study of the parameters affecting the binding of metals in solution by *Chlorella vulgaris*. *Talanta*. 50: 1313-1318.
- Lourenço, E.L.B.; Ferreira, A.; Pinto, E.; Yonamine, M. and Farsky, S.H.P. (2006). On-fiber derivatization of SPME extracts of phenol, hydroquinone and catechol with GC-MS detection. *Chromatographia*. 63: 175-179.
- Lovejoy, T.E. (1997). Biodiversity: What is it? In *Biodiversity II: Understanding and Protecting our Biological Resources* (Reaka-Kuda, M.K.; Wilson, D.E. e Wilson, E.O. Eds.) Joseph Henry Press, Washington DC. Pp. 7-14.
- Lu, G.H.; Yuan, X. and Zao, Y.H. (2001). QSAR study on the toxicity of substituted benzenes to the algae (*Scenedesmus obliquus*). *Chemosphere*. 44: 437-440.
- Lu, G.H.; Wang, C. and Guo, X.L. (2008). Prediction of toxicity of phenols and anilines to algae by quantitative structure-activity relationship. (2008). *Biomedical and Environmental Sciences*. 21: 193-196.
- Luke, A.K. and Burton, S.G. (2001). A novel application for *Neurospora crassa*: Progress from batch culture to a membrane bioreactor for the bioremediation of phenols. *Enzyme and Microbiology Technology*. 29: 348-356.
- Margesin, R.; Bergauer, P. and Gander, S. (2004). Degradation of phenol and toxicity of phenolic compounds: a comparison of cold-tolerant *Arthrobacter* sp. and mesophilic *Pseudomonas putida*. *Extremophiles*. 8: 201-207.
- McCord J.M. and Fridovch I. (1968) The reduction of cytochrome c by milk xanthine oxidase. *Journal of Biological Chemistry*. 243: 5753-5760.
- Melnyk, S.; Pogribna, M.; Pogribny, I.; Jean Hine, R. and Jill James, S. (1999). A new HPLC method for the simultaneous determination of oxidized and reduced plasma amino thiols using coulometric electrochemical detection. *The Journal of Nutritional Biochemistry*. 10: 490-497.
- Moore, M.N., Depledge, M.H., Readman, J.W. and Leonard, P. (2004). An integrated biomarker-based strategy for ecotoxicological evaluation of risk in environmental management. *Mutation Research*. 552: 247-268.

- Mordocco, A.; Kuek, C. and Jenkins, R. (1999). Continuous degradation of phenol at low concentration using immobilized *Pseudomonas putida*. *Enzyme and Microbiology Technology*. 25: 530-536.
- Moreno-Garrido, I.; Lubián, L.M. and Soares, A.M.V.M. (2000). Influence of cellular density on determination of EC₅₀ in microalgal growth inhibition tests. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 47: 112-116.
- Moriarty, F. (1990). In: *Ecotoxicology*. The study of pollutants in Ecosystems. Academic Press, London.
- Müller, R. (1992). Bacterial degradation of xenobiotics. In: *Microbial control of pollution*. Symposium 48, Society for General Microbiology (Fry, J.C.; Gadd, G.M.; Hebert, R.A.; Jones, C.W. and Watson-Craik, I.A. Eds.). Cambridge University Press.
- Nakajima, N.; Teramoto, T.; Kasai, F.; Sano, T.; Tamaoki, M.; Aono, M.; Kubo, A.; Kamada, H.; Azumi, Y. and Saji, H. (2007). Glycosylation of bisphenol A by freshwater microalgae. *Chemosphere*. 69: 934-941.
- Nakano, Y. and Asada, K. (1981). Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant Cell Physiology*. 22: 867-880.
- Navarro, A. E.; Portales, R.F.; Sun-Kou, M.R. and Llanos, B.P. (2008). Effect of pH on phenol biosorption by marine seaweeds. *Journal of Hazardous Materials*. 156: 405-411.
- Neujahr, H.Y. and Varga, J.M. (1970). Degradation of phenols by intact cells and cell-free preparations of *Trichosporum cutaneum*. *European Journal of Biochemistry*. 13: 37-44.
- Neujahr, H.Y. and Kjellén, K.G. (1978). Phenol hydroxylase from yeast. *The Journal of Biological Chemistry*. 253 (24): 8835-8841.
- Newsted, J.L. (2004). Effect of light, temperature, and pH on the accumulation of phenol by *Selenastrum capricornutum*, a green alga. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 59 (2): 237-243.
- Nicholson, S. and Lam, P.K.S. (2005). Pollution monitoring in Southeast Asia using biomarkers in the mytilid mussel *Perna viridis* (Mytilidae: Bivalvia). *Environment International*. 31: 121-132.
- Nishigima, F.N.; Weber, R.R. and Bicego, M.C. (2001). Aliphatic and aromatic hydrocarbons in sediments of Santos and Cananéia, SP, Brazil. *Marine Pollution Bulletin*. 42 (11): 1064-1072.

Nozaki, M.; Kagamiyama, H. and Hayaishi, O. (1963). Metapyrocatechase I. Purification, crystallization and some properties. *Biochemistry Zeitschrift*. 338: 582-590.

Nuhoglu, A. and Yalcin, B. (2005). Modelling of phenol removal in a batch reactor. *Process Biochemistry*. 40: 1233-1239.

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

Okamoto, O.K.; Asano, C.S.; Aidar, E. and Colepicolo, P. (1996). Effects of cadmium on growth and superoxide dismutase activity of the marine microalga *Tetraselmis gracilis*. *Journal of Phycology*. 32: 74-79.

Okamoto, O.K. and Colepicolo, P. (1998). Response of superoxide dismutase to pollutant metal stress in marine dinoflagellate *Gonyaulax polyedra*. *Comparative Biochemistry and Physiology C*. 119: 67-73.

Okamoto, O.K.; Pinto, E.; Latorre, L.R.; Bechara, E.J.H. and Colepicolo, P. (2001a). Antioxidant modulation in response to metal-induced oxidative stress in algal chloroplasts. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. 40: 18-24.

Okamoto, O.K.; Robertson, D.L.; Fang, T.F.; Hastings, J.W. and Colepicolo, P. (2001b). Different regulatory mechanisms modulate the expression of a dinoflagellate iron-superoxide dismutase. *Journal of Biological Chemistry*. 276: 19989-19993.

Okay, O.S.; Donkin, P.; Peters, L.D. and Livingstone, D.R. (2000). The role of algae (*Isochrysis galbana*) enrichment on the bioaccumulation of benzo[a]pyrene and its effects on the blue mussel *Mytilus edulis*. *Environmental Pollution*. 110: 103-113.

Pavlostathis, S.G. and Jackson, G.H. (2002). Biotransformation of 2,4,6-trinitrotoluene in a continuous-flow *Anabaena* sp. system. *Water Research*. 36: 1699-1706.

Peakall, D.W. (1994). Biomarkers: the way forward in environmental assessment. *Toxicology Ecotoxicology News*. 1: 55-60.

Pérez-Ruzafa, A.; Navarro, S.; Baraba, A.; Marcos, C.; Cámara, M.A.; Slas, F. and Gutiérrez, J.M. (2000). Presence of Pesticides throughout trophic compartments of the food web in the Mar Menor Lagoon (SE Spain). *Marine Pollution Bulletin*. 40 (2): 140-151.

Petroutsos, D.; Katapodis, P.; Christakopoulos, P. and Kekos, D. (2007). Removal of *p*-chlorophenol by the marine microalga *Tetraselmis marina*. *Journal of Applied Phycology*. 19: 485-490.

- Pinto, E.; Catalani L.H.; Lopes N.P.; Di Mascio P., Colepicolo P. (2000). Peridinin as the major biological carotenoid quencher of singlet oxygen in marine algae *Gonyaulax polyedra*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 268: 496–500.
- Pinto, E.; Sigaud-Kutner, T.C.S.; Leitão, M.A.S.; Okamoto, O.K.; Morse, D. and Colepicolo, P. (2003). Heavy metal-induced oxidative stress in algae. *Journal of Phycology*. 39: 1-11.
- Pinto, G.; Pollio, A.; Previtiera, L. and Temussi, F. (2002). Biodegradation of phenols by microalgae. *Biotechnology Letters*. 24:2047-2051.
- Pryor, W.A. (1966). *Introduction to Free Radicals Chemistry*. Prentice-Hall, New Jersey.
- Punín Crespo, M.O. and Lage Yusty, M.A. (2004). Determination of aliphatic hydrocarbons in the alga *Himantalia elongata*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 57: 226-230.
- Rainbow, P.S. (1995). Biomonitoring of heavy metal availability in the marine environment. *Marine Pollution Bulletin*. 31 (4-12): 183-192.
- Reed, D.J. (1990). Glutathione: toxicological implications. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*. 30: 601-630.
- Rice-Evans, C.A.; Diplock A.T.; Symons, M.C.R. (1991). *Techniques in free radicals research*. In: Laboratory techniques in biochemistry and molecular biology. Eds. Burdon R.H, Van Knippenberg P.H. Amsterdam Elsevier.
- Rocha, A.A. (1992). *Algae and Environment: A General Approach*. Pp: 34.
- Rodríguez-Ariza, A.; Toribio, F. and López-Barea, J. (1994). Rapid determination of glutathione status in fish liver using high-performance liquid chromatography and electrochemical detection. *Journal of Chromatography B*. 656: 311-318.
- Rosenberg, J.N.; Oyler, G.A.; Wilkinson, L. and Betenbaugh, M.J. (2008). A green light for engineered algae: redirecting metabolism to fuel a biotechnology revolution. *Current Opinion in Biotechnology*. 19: 430-436.
- Samecka-Cymerman, A. and Kempers, A.J. (2002). Aquatic macrophytes as biomonitors of pollution by textile industry. *Bulletin of Environment Contamination and Toxicology*. 69: 82-96.
- Santos, V.L.; Heilbuth, N.M.; Braga, D.T.; Monteiro, A.S. and Linardi, V.R. (2003). Phenol degradation by *Graphium* sp. FIB4 isolated from industrial effluents. *Journal Basic Microbiology*. 43: 238-248.

- Scragg, A.H. (2006). The effect of phenol on growth of *Chlorella vulgaris* and *Chlorella* VT-1. *Enzyme and Microbial Technology*. 39: 796-799.
- Semple, K.T. and Cain, R.B. (1996). Biodegradation of phenols by the alga *Ochromonas danica*. *Applied and Environmental Microbiology*. 62 (4): 1265-1273.
- Semple, K.T. and Cain, R.B. (1997). Degradation of phenol and its methylated homologues by *Ochromonas danica*. *FEMS Microbiology Letters*. 152: 133-139.
- Semple, K.T.; Cain, R.B. and Schmidt, S. (1999). Biodegradation of aromatic compounds by microalgae. *FEMS Microbiology Letters*. 170: 291-300.
- Sigaud-Kutner, T.C.S.; Pinto, E.; Okamoto, O.K.; Latorre, L.R. and Colepicolo, P. (2002). Changes in superoxide dismutase activity and photosynthetic pigment content during growth of marine fitoplâncton in batch-cultures. *Physiologia Plantarum*. 114: 566-571.
- Sigaud-Kutner, T.C.S.; Neto, A.M.P.; Pinto, E. and Colepicolo, P. (2005). Diel activities of antioxidant enzymes, photosynthetic pigments and malondialdehyde content in stationary-phase cells of *Tetraselmis gracilis* (Prasinophyceae). *Aquatic Botany*. 82: 239-249.
- Smith, N.C.; Dunett, M. and Mills, P.C. (1995). Simultaneous quantitation of oxidized and reduced glutathione in equine biological fluids by reversed-phase high-performance liquid chromatography using electrochemical detection. *Journal of Chromatography B*. 673: 35-41.
- Stefelfs, J. and Van Boekel, W.H.M. (1993). Production of DMS from dissolved DMSP in axenic cultures of the marine phytoplankton species *Phaeocystis* sp. *Marine Ecology Progress Series*. 97 (1): 11-18.
- Stón, J. and Kosakowska, A. (2002). Phytoplankton pigments designation - an application of RP-HPLC in qualitative and quantitative analysis. *Journal of Applied Phycology*. 14 (3): 205-210.
- Swaminathan, M.S. (2003). Bio-diversity: an effective safety net against environmental pollution. *Environmental Pollution*. 126: 287-291.
- Tisler, T. and Zagorc-Koncan, J. (1997). Comparative assessment of toxicity of phenol, formaldehyde, and industrial wastewater to aquatic organisms. *Water, Air and Soil Pollution*. 97: 315-322.
- Torres, M.A.; Barros, M.P.; Campos, S.C.G.; Pinto, E.; Rajamani, S.; Sayre, R.T. and Colepicolo, P. (2008). Biochemical biomarkers in algae and marine pollution: A review. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 71 (1): 1-15.

Travieso, L.; Pellón, A.; Benítez, F.; Sánchez, E.; Borja, R.; O'Farrill, N. and Weiland, P. (2002). BIOALGA reactor: preliminary studies for heavy metals removal. *Biochemical Engineering Journal*. 12: 87-91.

Tremolada, P.; Finizio, A.; Villa, S.; Gaggi, C. and Vighi, M. (2004). Quantitative inter-specific chemical activity relationships of pesticides in the aquatic environment. *Aquatic Toxicology*. 67: 87-103.

Tukaj, Z. and Aksmann, A. (2007). Toxic effects of anthraquinone and phenanthrenequinone upon *Scenedesmus* strains (green algae) at low and elevated concentration of CO₂. *Chemosphere*. 66: 480-487.

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

U.S. EPA - United States Environmental Protection Agency. (2000). Toxicological Review for Phenol - CAS No. 108-95-2. Washington, D.C. 96pp.

Van der Oost, R.; Beyer, J. and Vermeulen, N.P.E. (2003). Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. 13: 57-149.

Varga, J.M. and Neujahr, H.Y. (1970). Purification and properties of catechol 1,2-oxygenase from *Trichosporum cutaneum*. *European Journal of Biochemistry*. 12: 427-434.

Venturini, N. and Tommasi, L.R. (2004). Polycyclic aromatic hydrocarbons and changes in the trophic structure of polychaete assemblages in sediments of Todos os Santos Bay, Northeastern, Brazil. *Marine Pollution Bulletin*. 48: 97-107.

Walker, J.D.; Colwell, R.R. and Petrakis, L. (1975). Degradation of petroleum by an alga, *Prototheca zopfii*. *Applied Microbiology*. 30 (1): 79-81.

Walsh, G.E.; McLaughlin, L.L.; Yoder, M.J.; Moody, P.H.; Lores, E.M.; Forester, J. and Wessinger-Duvall, P.B. (1988). *Minutocellus polymorphus*: a new marine diatom for use in algal toxicity tests. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 7: 925-929.

Wang, L.; Zheng, B. and Meng, W. (2008). Photo-induced toxicity of four polycyclic aromatic hydrocarbons, singly and in combination, to the marine diatom *Phaeodactylum tricorutum*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 71: 465-472.

Warshawsky, D.; Cody, T.; Radike, M.; Reilman, R.; Schuman, B.; Ladow, K. and Schneider, J. (1995). Biotransformation of benzo(a)pyrene and other polycyclic aromatic hydrocarbons and heterocyclic analogs by several green algae and other algal species under gold and white light. *Chemico-Biological Interactions*. 97: 131-148.

- Watanabe, T.; Coler, R.A. and Paz, R.J. (1999). The implementation of a regional biomonitoring program in northeast Brazil. *Aquatic Ecosystem Health and Management*. 2: 187–189.
- Willians, C. (1996). Combating marine pollution from land-based activities: Australian initiatives. *Ocean and Coastal Management*. 33 (1-3): 87-112.
- Winterbourn, C.C. (2008). Reconciling the chemistry and biology of reactive oxygen species. *Nature Chemical Biology*. 4 (5): 278-286.
- Wurster, M.; Mundt, S.; Hammer, E.; Schauer, F. and Lindequist, U. (2003). Extracellular degradation of phenol by the cyanobacterium *Synechococcus* PCC 7002. *Journal of Applied Phycology*. 15:171-176.
- Yang, C.S.; Tsai, P.J.; Wu, J.P.; Lin, N.N.; Chou, S.T. and Kuo, J.S. (1997). Evaluation of extracellular lipid peroxidation in brain cortex of anaesthetized rats by microdialysis perfusion and high performance liquid chromatography with fluorimetric detection. *Journal of Chromatography B*. 693: 257-263.
- Yang, S.; Wu, R.S.S. and Kong, R.Y.C. (2002). Biodegradation and enzymatic response in the marine diatom *Skeletonema costatum* upon exposure to 2,4-dichlorophenol. *Aquatic Toxicology*. 59: 191-200.
- Zhou, Q.; Zhang, J.; Fu, J.; Shi, J. and Jiang, G. (2008). Biomonitoring: An appealing tool for assessment of metal pollution in the aquatic ecosystem. *Analytica Chimica Acta*. 606: 135-150.

Curriculum Vitae

Dados pessoais

Sara Cristina Gonçalves Campos

São Paulo, 6 de novembro de 1979.

e-mail: sara@iq.usp.br

sarinhafarm@yahoo.com.br

Formação Acadêmica

2003-2008 Doutorado em Ciências – Bioquímica, Instituto de Química,
Universidade de São Paulo, USP, São Paulo.

Bolsa: Capes/CEPEMA

Orientador: Prof^o. Dr. Pio Colepicolo

1998-2002 Graduação em Farmácia.

Universidade Federal de Alfenas – UNIFAL (antiga Escola de
Farmácia e Odontologia de Alfenas - EFOA), Minas Gerais.

Ocupação

Bolsista de doutorado Capes/CEPEMA (agosto de 2003 a julho de 2007).

Outras Atividades

1999-2001 Programa de Treinamento Especial – PET/ CAPES-SESU

Instituição: EFOA, Alfenas – MG

1999-2001 Iniciação Científica em Bioquímica
 Instituição: EFOA, Alfenas - MG
 Orientador: Prof^a. Dra. Máisa Ribeiro Pereira Lima Brigagão
 Projeto: Estudos de Danos Oxidativos em Glândulas Salivares no Alcoolismo Crônico.

Publicações

- ✓ Torres, M.A.; Barros, M.P.; **Campos, S.C.G.**; Pinto, E.; Rajamani, S.; Sayre, R.T. and Colepicolo, P. (2008). Biochemical biomarkers in algae and marine pollution: A review. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 71 (1): 1-15.
- ✓ Cardozo, K.H.M.; Guaratini, T.; Barros, M.P.; Falcão, V.R.; Tonon, A.P.; Lopes, N.P.; **Campos, S.C.G.**; Torres, M.A.; Souza, A.O.; Colepicolo, P. and Pinto, E. (2007). Metabolites from algae with economical impact. *Comparative Biochemistry and Physiology. C*. 146: 60-78.
- ✓ **Campos, S.C.G.**; Moreira, D.A.C.; Nunes, T.D.S.; Colepicolo, P. and Brigagão, M.R.P.L. (2005). Oxidative stress in alcohol-induced rat parotid sialadenosis. *Archives of Oral Biology*. 50 (7): 661-668.
- ✓ Carvalho, A.; Pereira Neto, A.M.; Tonon, A.; Pinto, E.; Cardozo, K.H.M.; Brigagão, M.R.P.L.; Barros, M.P.; Torres, M.A.; Magalhães, P.; **Campos, S.C.G.**; Guaratini, T.; Sigaud-Kutner, T. C.; Falcão, V.R. and Colepicolo, P. (2004). Circadian protection against oxidative stress in marine algae. *Hypnós*. 1 (1): 142-157.

Resumos em Congressos

- ✓ Marques, L.G.; **Campos, S.C.G.**; Cardozo, K.H.M.; Guaratini, T.; Colepicolo, P. Changes in MDA and Pigment Content During Growth of Marine Microalgae *Tetraselmis gracilis*. *XXXVI Annual Meeting of the Brazilian Society for Biochemistry and Molecular Biology (SBBq) and 10th International Union of Biochemistry and Molecular Biology (IUBMB) Conference*. (Salvador - BA, 2007).

- ✓ **Campos, S.C.G.**; Paula, D.M.L.; Yonamine, M.; Pinto, E.; Colepicolo, P. Phenol Biodegradation in the Microalga *Minutocellus polymorphus*. XXXVI Annual Meeting of the Brazilian Society for Biochemistry and Molecular Biology (SBBq) and 10th International Union of Biochemistry and Molecular Biology (IUBMB) Conference. (Salvador - BA, 2007).
- ✓ **Campos, S.C.G.**; Torres, M.A.; Pinto, E.; Colepicolo, P. Aspectos Oxidativos e de Biodegradação do Poluente Fenol na Microalga Marinha *Minutocellus polymorphus*. XI Congresso Brasileiro de Ficologia & Simpósio Latino-Americano Sobre Algas Nocivas. (Itajaí - SC, 2006)
- ✓ **Campos, S.C.G.**; Torres, M.A.; Pinto, E.; Colepicolo, P. Oxidative Aspects During Phenol Biotransformation by Marine Microalgae *Minutocellus polymorphus*. SETAC Europe 16th Annual Meeting - Controversies and Solutions in Environmental Sciences. (The Hague – Holanda, 2006)
- ✓ Torres, M.A.; **Campos, S.C.G.**; Leitão, M.A.; Colepicolo, P. Estresse Oxidativo e Biotransformação de Fase II em Culturas da Diatomácea *Minutocellus polymorphus* Expostas ao Benzo[a]pireno. IX Congresso Brasileiro de Ecotoxicologia. (São Pedro – SP, 2006).
- ✓ Souza, L.M.; **Campos, S.C.G.**; Torres, M.A.; Colepicolo, P.; Pinto, E. Toxicological Aspects of the Aromatic Compound Phenol on the Freshwater Microalga *Monoraphidium convolutum*. XXXV Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular SBBQ. (Águas de Lindóia – SP, 2006)
- ✓ Souza, L.M.; **Campos, S.C.G.**; Torres, M.A.; Colepicolo, P.; Pinto, E. Toxicological Aspects of Phenol on Freshwater Microalga *Monoraphidium convolutum*. 14^o Reunião de Iniciação Científica - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, FCF – USP. (São Paulo – SP, 2006).
- ✓ **Campos, S.C.G.**; Torres, M.A.; Souza, L.M.; Pinto, E.; Colepicolo, P. Possible Oxidative Stress Implications During Phenol Biotransformation Process in Diatom *Minutocellus polymorphus*. XXXIV Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular SBBQ. (Águas de Lindóia – SP, 2005).
- ✓ Torres, M.A.; **Campos, S.C.G.**; Souza, L.M.; Colepicolo, P. Response of Oxidative Stress Enzymes Biomarkers in the Diatom *Minutocellus polymorphus* Exposed to Diphenyl Ether Herbicide. XXXIV Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular SBBQ. (Águas de Lindóia – SP, 2005).

- ✓ Torres, M.A.; **Campos, S.C.G.**; Pinto, E.; Colepicolo, P. Oxidative Stress Implications in the Diatom *Minutocellus polymorphus* Exposed to Both Oxyfluorfen and Phenol Pollutants. *IV Meeting of the South American Group of the Society for Free Radical Biology and Medicine*. (Águas de Lindóia – SP, 2005).
- ✓ Torres, M.A.; **Campos, S.C.G.**; Souza, L.M.; Colepicolo, P. Response of Oxidative Enzymes in the Diatom *Minutocellus polymorphus* Exposed to Diphenyl Ether Herbicide. *SETAC North America 26th Annual Meeting*. (Baltimore, Maryland – EUA, 2005).
- ✓ Leitão, M.A.S.; Cardozo, K.H.M.; **Campos, S.C.G.**; Torres, M.A.; Pinto, E.; Colepicolo, P. PCB-Induced Oxidative Stress in the Toxic Unicellular Marine Dinoflagellate *Lingulodinium polyedrum*. *VIII Congresso Brasileiro de Ecotoxicologia promovido pela Sociedade Brasileira de Ecotoxicologia - SETAC Brasil*. (Florianópolis – SC, 2004).
- ✓ **Campos, S.C.G.**; Pinto, E.; Kujbida, P.; Quina, F.H.; Nascimento, C.A.O.; Colepicolo, P. Phenol: Toxicity and Biodegradation in the Microalgae *Minutocellus polymorphus*. *XXXIII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular SBBQ*. (Caxambu – MG, 2004).
- ✓ **Campos, S.C.G.**; Weis, F.; Sigaud-Kutner, T.C.; Colepicolo, P. Teste de Inibição de Crescimento de *Tetraselmis gracilis* e *Minutocellus polymorphus* para Mercúrio. *X Reunião da Sociedade Brasileira de Ficologia RBFIC*. (Salvador – BA, 2004).