



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

IMYRA MAÍRA MARTINS DE SOUZA

**A INFLUÊNCIA DO FÓSFORO NA TOXICIDADE DE COBRE E
COMPOSIÇÃO BIOQUÍMICA DE *Chlorella vulgaris***

SÃO CARLOS

2011

**A INFLUÊNCIA DO FÓSFORO NA TOXICIDADE DE COBRE E
COMPOSIÇÃO BIOQUÍMICA DE *Chlorella vulgaris***

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

IMYRA MAÍRA MARTINS DE SOUZA

**A INFLUÊNCIA DO FÓSFORO NA TOXICIDADE DE COBRE E
COMPOSIÇÃO BIOQUÍMICA DE *Chlorella vulgaris***

**Dissertação apresentada ao Programa
de Pós Graduação em Ecologia e Recursos
Naturais da Universidade Federal de São
Carlos para obtenção do Título de Mestre
em Ecologia e Recursos Naturais**

Orientação: Prof.Dr. Ana Teresa Lombardi

SÃO CARLOS

2011

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da
Biblioteca Comunitária da UFSCar**

S729if

Souza, Imyra Maíra Martins de.

A influência do fósforo na toxicidade de cobre e composição bioquímica de *Chlorella vulgaris* / Imyra Maíra Martins de Souza. -- São Carlos : UFSCar, 2011.
59 f.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2011.

1. Ecologia aquática. 2. Ecotoxicologia. 3. Alga. 4. Cobre. 5. Fósforo. 6. Composição bioquímica. I. Título.

CDD: 574.5263 (20^a)

Imyra Maíra Martins de Souza

**A INFLUÊNCIA DO FÓSFORO NA TOXICIDADE DE COBRE E
COMPOSIÇÃO BIOQUÍMICA DE *CHLORELLA VULGARIS***

Dissertação apresentada à Universidade Federal de São Carlos, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ecologia e Recursos Naturais.

Aprovada em 02 de setembro de 2011

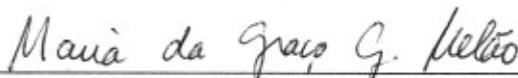
BANCA EXAMINADORA

Presidente



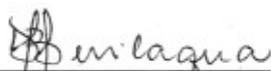
Profª. Dra. Ana Teresa Lombardi
(Orientadora)

1º Examinador



Profª. Dra. Maria da Graça Gama Melão
PPGERN/UFSCar

2º Examinador



Profª. Dra. Denise Bevilaqua
UNESP/Araraquara-SP

Dedico este trabalho ao Tiago, meu namorado,
que me ajudou, apoiou e ouviu muito
sobre ele, sem nem reclamar.

AGRADECIMENTOS

À Professora Ana Teresa Lombardi, pela ajuda, conhecimento e idéias;

À professora Graça, pelo espaço em seu laboratório;

Aos meus colegas de Laboratório, especialmente ao Mathias pelas determinações da composição bioquímica e, à Jaque e Gi pela contribuição e amizade durante todo o desenvolvimento desta pesquisa;

Ao meu namorado, Tiago, pela paciência com “pirações” que ele teve que aguentar;

À Juliana, minha super companheira de casa, pelo carinho, ajuda e paciência;

À minha família, que não estava presente fisicamente, mas entendeu minha ausência;

“Stand back! I’m going to try SCIENCE!”

xkcd

RESUMO

As microalgas apresentam uma estreita relação com o meio circundante, sendo a parede e membrana celulares a via de entrada dos compostos dissolvidos. Mas, o modo como as algas interagem com os metais no ambiente, depende grandemente da especiação química do elemento. Portanto, a toxicidade de metais para microalgas relaciona-se, não somente com sua história evolutiva e condição fisiológica, mas também com a forma em que o metal é encontrado no ambiente. Nesta pesquisa, investigamos o efeito de diversas combinações de concentrações de fosfato (P) e cobre (Cu) na toxicidade do micronutriente e na composição bioquímica da microalga de água doce *Chlorella vulgaris*. O cobre foi analisado na forma iônica livre pois esta é uma das espécies de maior toxicidade para as algas.

Antes da adição de cobre, a microalga foi aclimatada para a concentração de fosfato do respectivo tratamento experimental (P:Cu). As células foram consideradas aclimatadas para uma concentração específica de P após sua taxa de crescimento ter sido estabilizada por quatro gerações, sempre transferindo as células em fase inicial de crescimento exponencial.

Para cada tratamento efetuado, os parâmetros de biomassa e fisiológicos analisados foram número de células por mL, concentração de clorofila-a, biomassa seca, classes lipídicas, através do equipamento (Iatroscan TLC/FID), proteínas e carboidratos celulares totais.

As concentrações de P testadas foram $5,0 \times 10^{-5}$, $2,5 \times 10^{-5}$, $5,0 \times 10^{-6}$ e $1,0 \times 10^{-6}$ mol.L⁻¹ e a amplitude de concentração de ions Cu²⁺ livres ficou entre 1×10^{-10} and 5×10^{-8} mol.L⁻¹. Cobre livre foi determinados através de eletrodo seletivo ao íon (ISE) cobre. Nossos resultados mostraram que a toxicidade de Cu para *C. vulgaris* foi afetada pela concentração de fosfato no meio de cultura. Em baixas concentrações de fósforo, houve a maior toxicidade do Cu, aumento na produção de carboidratos e de lipídios.

A análise das classes lipídicas revelaram que os hidrocarbonetos alifáticos (HC), ésteres de cera (WE) e esterol (ST) tiveram sua síntese ativada em concentrações tóxicas de Cu e de baixo fósforo. Similarmente, a síntese proteica aumentou sob essas condições, com a maior quantidade de síntese proteica obtida na menor concentração fósforo testada.

Palavras-chave: cobre, fósforo, fitoplâncton, *C. vulgaris*, lipídios, composição bioquímica

ABSTRACT

Metal toxicity to microalgae is dependent on environmental conditions, evolutionary history of the microalgae, and previous exposure of the organism to the specific metal. Also, it is importantly influenced by the physiological condition of the algae in the moment of metal exposure. In this research we investigated several combinations of phosphorus (P) and copper (Cu) concentrations on the biochemical composition and Cu toxicity to *Chlorella vulgaris*. Due to its known toxicity, copper was considered in its free Cu^{2+} ions specie.

Because microalgae physiology reflects the environmental conditions, but it also stores some of the inorganic nutrients, previous to Cu spike in the cultures, the algae were acclimated to each treatment's specific P concentration to be tested in combination with Cu. We considered cells were acclimated to a specific P concentration after its growth rate had been stabilized for at least four generations, always transferring the cells while in the beginning of the exponential growth phase. Biomass and physiological parameters analyzed were cell number (cell.mL^{-1}), chlorophyll-a concentration, dry weight, lipid classes (Iatroscan TLC/FID), and total cellular proteins and carbohydrates at several combinations of P/Cu.

The P concentrations tested were 5.0×10^{-5} , 2.5×10^{-5} , 5.0×10^{-6} and 1.0×10^{-6} mol.L^{-1} and the free Cu^{2+} ions concentrations ranged within 1×10^{-10} and 5×10^{-8} mol.L^{-1} , and were determined through ion selective electrode (ISE). Our results showed that Cu toxicity to *C. vulgaris* increased at low P. Carbohydrate, protein and lipid productions were in general triggered at low P and high Cu, with some exceptions. TAG was the lipid class most affected by stressing situations. AMPL and PL were the lipid classes with the higher percent composition among the classes; HC, WE and ST were present in minor amounts even under stressing situations.

Keywords: copper, phosphorus, phytoplankton, *C. vulgaris*, lipids, biochemical composition, carbohydrates, proteins

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1: <i>Chlorella vulgaris</i> . Foto obtida em microscópio ótico em objetiva de 40x.	21
Figura 2: Regressão linear obtida para a calibração do eletrodo seletivo ao íon cobre. A concentração de cobre livre (mol. L ⁻¹) está plotada como uma função das leituras (mV). A equação obtida para a calibração foi $y = 357,50 + 32x$.	26
Figura 3: Número de células por mL para os diversos tratamentos experimentais envolvendo diferentes combinações P:Cu. Tempo de exposição de 96 horas	30
Figura 4: Concentração de clorofila-a para os diversos tratamentos experimentais envolvendo diferentes combinações P:Cu. O tempo de exposição foi de 96 horas.	31
Figura 5: . Biomassa seca para os diversos tratamentos experimentais envolvendo diferentes combinações P:Cu. O tempo de exposição foi de 96 horas.	32
Figura 6: EC50 obtidos para os diversos parâmetros de biomassa plotados em função do logarítmo da concentração de fósforo. A letra a representa os valores de EC50 com base no número de células por mL de cultura.	33
Figura 7: Composição bioquímica (lipídios, proteínas e carboidratos) em células de <i>Chlorella vulgaris</i> como uma função das diferentes combinações de fósforo e concentrações de íons livre de cobre.	35
Figura 8: (a) Hidrocarboneto (HC) e (b) ésteres de cera (WE/SE) em células de <i>Chlorella vulgaris</i> como função das diferentes combinações de fósforo e concentrações de ions livres de cobre.	36

Figura 9: **(a)** Triglicerídeos (TAG) e **(b)** ácidos graxos livres (FFA) em células de *Chlorella vulgaris* como função das diferentes combinações de fósforo e concentrações de ions livres de cobre. 37

Figura 10: **(a)** Álcool alifático livre (ALC) e **(b)** esteróis (ST) em *Chlorella vulgaris* como função das diferentes combinações de fósforo e concentrações de ions livres de cobre 39

Figura 11: **(a)** Lipídios polares móveis em acetona (AMPL) e **(b)** fosfolipídios (PL) em *Chlorella vulgaris* como uma função das diferentes combinações de fósforo e concentrações de ions livres de cobre. 40

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1: Taxas de crescimento obtidas durante o processo de aclimação das células de <i>C. vulgaris</i> para as diferentes concentrações de fosfato testadas. As taxas de crescimento são representadas pelos coeficientes angulares da equação de regressão do logaritmo do número de células por mL como função do tempo experimental.	27
Tabela 2: Concentrações de cobre testadas: concentração de cobre dissolvido total adicionado (nominal), concentração de íons cobre livre determinadas para cada tratamento e seu erro (SD). Valores das concentrações reportados em mol.L ⁻¹ .	28

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ALC	Álcool alifático livre
AMPL	Lipídios polares móveis em acetona
Chl-a	Clorofila-a
Cu	Cobre
FFA	Ácidos graxos livres
HC	Hidrocarboneto alifático
P	Fósforo
PL	Fosfolipídios
ST	Esterol
TAG	Triglicerídeos
WE/SE	Éster de cera

SUMÁRIO

	Página
1. Introdução	14
2. Objetivos	19
Específicos	19
3. Materiais e Métodos	20
3.1. Cultivo da alga	20
3.1.1 Amostragens	21
3.2. Análise estatística	26
4. Resultados	27
5. Discussão	41
5.1. Crescimento e toxicidade	41
5.2. Composição bioquímica	42
6. Conclusões	48
7. Referências Bibliográficas	49
APÊNDICE	55

1. Introdução

A água é constituinte da hidrosfera e da atmosfera, e de acordo com Welzel (2001), possui uma distribuição heretogênea no planeta: aproximadamente 97,5% é água salgada e 2,5% água doce, dos quais cerca de 69,8% constituintes das calotas polares e geleiras, 29,9% são águas subterrâneas, 0,3% rios e lagos e, 0,9% referem-se a outros reservatórios. A água também contém várias características que a torna importante para os organismos: é abundante na superfície terrestre, infiltra-se através dos solos, atua como regulador térmico ajudando a manutenção das condições climáticas do planeta e, ainda mais importante, é um poderoso solvente, o que permite um ótimo meio para os processos químicos dos seres vivos (Ricklefs, 2003).

Segundo Buffle & DeVitre (1993), os processos químicos e biológicos são complementares e intimamente ligados na regulação de ecossistemas aquáticos, o que associado à solubilidade da maioria das substâncias químicas na água, torna muitas substâncias acessíveis aos organismos, não apenas substâncias que são necessárias para seu desenvolvimento, como íons, matéria orgânica e gases, mas também aquelas consideradas prejudiciais.

Substâncias tóxicas encontradas na água são uma preocupação para a saúde humana e do ambiente, pois podem causar significativo impacto na estabilidade dos ecossistemas, além de efeitos adversos ao homem (Casiragui *et al.*, 2005). Dessa forma, o monitoramento da qualidade da água e o conhecimento da dinâmica dos elementos químicos e biológicos constituintes são aspectos importantes para a proteção do meio ambiente e da saúde humana (Schreiber, 2007), além de possibilitar um melhor gerenciamento de reservatórios de abastecimento público.

O crescimento populacional, juntamente com o processo de industrialização e urbanização na sociedade moderna aumenta o risco de contaminação dos ambientes aquáticos (Liu *et al.*, 2009), pois apesar de legislações cada vez mais restritas, observa-se ainda uma tendência de descarte de contaminantes nos ecossistemas aquáticos. Como consequência tem-se frequentemente no Brasil e em outros países, reservatórios de abastecimento e/ou lazer com excesso de população de microalgas e com florescimentos algais o ano todo. Cite-se como exemplos o Reservatório do Iraí, principal manancial de abastecimento da cidade de Curitiba (Paraná) e a Represa Billings, reservatório estratégico para a região metropolitana da cidade de São Paulo (www.sanepar.com.br; www.cetesb.sp.gov.br). Essa alteração na população de

microalgas, tanto quantitativa como também qualitativa, é resultado da entrada de nutrientes através de esgotos domésticos, que levam a um processo de eutrofização. Dentre os nutrientes, destaca-se o fósforo, que diferentemente do nitrogênio, possui ciclo biogeoquímico fechado. Isso significa que o fósforo é um nutriente importante que pode ser manipulado para o controle e gestão dos recursos hídricos.

O fósforo é nutriente essencial para os organismos e requerido em concentrações da ordem de 10^{-5} mol.L⁻¹, entretanto, sua presença é rara na crosta terrestre, o que o torna um fator limitante para o crescimento em ecossistemas aquáticos e terrestres (Vaux, 1995). Em ecossistemas aquáticos grande parte do fósforo se liga com ferro e cálcio e sofrendo precipitação na coluna d'água, tornando-se indisponível para os organismos. Entranto, o excesso dessa substância em fertilizantes utilizados na agricultura e no aporte do esgoto doméstico causam o enriquecimento de ecossistemas aquáticos por fósforo, que é uma das principais causas de eutrofização e conseqüente florescimento algal (Odum, 1983).

Um dos problemas com a eutrofização é o desequilíbrio no ecossistema tornando os processos de regeneração naturais insuficientes para a reciclagem de matéria orgânica. Isso cria uma demanda bioquímica de oxigênio (DBO), que é resultado da decomposição dos detritos orgânicos através da oxidação pelos microrganismos heterotróficos (Ricklefs, 2003). O oxigênio possui baixa solubilidade em água (aproximadamente 1%) e o aumento da DBO diminui ainda mais a quantidade de oxigênio dissolvido na água. Em lagos altamente eutrofizados é possível que o oxigênio seja deplecionado ao longo de toda a coluna d'água, o que causa a morte dos organismos aeróbicos obrigatórios como os peixes (Schindler *et al.*, 2008). Com isso, o gerenciamento desses ambientes depara-se com problemas como o excesso de materiais orgânicos e de elementos nutritivos às microalgas, tais como o fosfato e nitrato, e finalmente o excesso de população algal, que dependendo da espécie, pode ou não produzir toxinas. Além disso, observa-se infestações de alguns vegetais aquáticos e aumento da incidência de doenças hidricamente transmissíveis.

Em várias situações, compostos com propriedades algicidas como o sulfato de cobre são usados para o controle dos microrganismos. O cobre é um elemento traço essencial, uma vez que participa do transporte eletrônico no processo fotossintético, além de funcionar como cofator de várias enzimas. Entretanto, quando presente em concentrações acima das concentrações traço ($\sim 10^{-9}$ mol.L⁻¹), pode tornar-se tóxico. É um elemento que apresenta grande afinidade por ligantes orgânicos e inorgânicos e, como todo metal, não sofre biodegradação, acumulando-se no ambiente e em organismos.

A toxicidade do cobre pode manifestar-se através da inibição do transporte de elétrons, inibição da síntese de pigmentos fotossintéticos, diminuição da concentração de potássio e sódio intracelular, alteração do metabolismo da síntese de carboidratos e de ácidos graxos, além de causar efeitos deletérios na estrutura celular (Fathi *et al.*, 2005, Ritter *et al.*, 2008).

Diversos estudos foram feitos para avaliar a toxicidade do cobre nos organismos. Em algas, é observado que o aumento de sua concentração causam a diminuição na sua taxa de crescimento (Franklin *et al.*, 2000, Qian *et al.*, 2009), diminuição na concentração de clorofila-a (Lombardi *et al.*, 2007, Chakraborty *et al.*, 2010, Kováčik *et al.* 2010), assim como mudança em sua composição bioquímica (Einicker-Lamas *et al.*, 2002; Kilham *et al.*, 1997; Zaki & Fathi, 2004; Slowik & Pawlaczyk-Szpilowa, 1979; Verma *et al.* 1993). Quando levado em conta a interação do cobre com o fósforo, Serra *et al.* (2010) mostraram que um aumento na concentração do fósforo ocasionou um aumento na tolerância à toxicidade do cobre em algas e, a diminuição na concentração do fósforo causou um aumento na toxicidade do metal. Resultados similares já haviam sido mostrados em outros trabalhos (Hall *et al.*, 1989; Rijstenbil *et al.*, 1998; Verna *et al.*, 1993; Wang & Dei, 2006).

Vários são os mecanismos pelos quais o cobre atinge ecossistemas aquáticos e, dentre eles, pode-se citar atividades relacionadas à agricultura e indústria, como as mineradoras e fundições. Nos ecossistemas aquáticos eutrofizados, a maior parte do cobre é presente na forma complexada a ligantes orgânicos ou inorgânicos, e apenas uma pequena fração dele aparece como íons Cu^{2+} livres (hidratados) (Lombardi *et al.*, 2005; 2007). A especiação dos metais sempre deve ser considerada quando se investiga seus efeitos tóxicos, pois as diferentes formas físico-química dos elementos, ou suas espécies químicas afetam de modo distinto sua disponibilidade para os organismos aquáticos (Rodgher *et al.*, 2008; 2009; Nogueira *et al.*, 2009; Lombardi *et al.*, 2007; Kola *et al.*, 2005).

O cobre foi um dos primeiros elementos a ser estudado levando em conta suas diferentes espécies químicas e, atualmente, é sabido que a complexação reduz sua toxicidade uma vez que reduz a quantidade de sua forma livre, considerada uma das formas mais tóxicas para os organismos (Andrade *et al.*, 2010). Em ecossistemas marinhos cerca de 99% do cobre está combinada com ligantes orgânicos (Bruland *et al.*, 1991), que fazem parte da matéria orgânica dissolvida natural e formam complexos inertes, tornando o metal indisponível para o organismo.

Assim, em alguns países, a legislação ambiental referente à concentração máxima de metal tolerada em ecossistemas aquáticos tem como base a fração do cobre de maior disponibilidade biológica, tal qual a fração lábil ou livre. No Brasil, a legislação fundamenta-se na resolução CONAMA/003 (art. 70, inciso IX, decreto 88.351, 1984) que determina que níveis máximos da concentração de cobre permitidas nos ambientes de água doce são de 0,02 mg/L ($3,1 \times 10^{-7}$ mol.L⁻¹ – para águas Classe 1 e 2) e 0,5 mg/L ($7,8 \times 10^{-6}$ mol.L⁻¹ – para águas de Classe 3). No entanto, a toxicidade de um elemento não depende somente da forma química em que é encontrado, mas também do estado nutricional do organismo exposto. Isso significa que a presença de outros nutrientes assume papel importante para o efeito de um agente tóxico.

Nas microalgas o fósforo apresenta importante papel nutricional, atuando sobre mecanismos fisiológicos e bioquímicos, tais como a produção de ácidos nucleicos e síntese de proteínas, que por sua vez atuam sobre o processo de divisão celular (Cembella *et al*, 1984). Além disso, foi visto que o fósforo atua sobre a taxa de assimilação da luz e fixação do carbono em células do fitoplâncton (Falkowski e Raven, 1997). Em ecossistemas aquáticos, baixas concentrações de fósforo limitam a produção primária e, em geral, a concentração de fósforo é escassa na superfície de águas bem oxigenadas (Ricklefs, 2003), justamente por ser consumido pelas algas. Enquanto vários dos efeitos fisiológicos do fósforo são bem documentados na literatura, a disponibilidade desse elemento no uso e metabolismo de metais-traço em células do fitoplâncton é ainda pouco conhecido (Ji e Sherrell, 2008).

As microalgas são produtores primários na cadeia alimentar dos ecossistemas aquáticos e, portanto, elementos-chave em estudos de gestão desses ambientes. Além disso, apresentam rápida resposta fisiológica, o que permite a detecção dos efeitos provocados por compostos tóxicos em período de tempo relativamente curto. São sensíveis a diversos produtos, como detergentes surfactantes, efluentes têxteis, tintas, combustíveis, herbicidas e metais, por isso estão entre os organismos recomendados para ensaios de toxicidade (Rodrigues, 2008). Dessa maneira, a química ambiental associada à ecofisiologia de microalgas representa uma nova abordagem ao estudo da interação de metais com os organismos, seus efeitos sub-letais e tóxicos, servindo como ferramenta auxiliar à gestão de ecossistemas aquáticos. Em geral, ambientes eutrofizados apresentam também contaminação por metais, no entanto, a interação entre os agentes da eutrofização (nutrientes) e os metais, ocasionadores de estresses fisiológicos são pouco estudados para concentrações sub-letais dos últimos. É importante salientar que em ambientes eutrofizados, a presença de materiais

orgânicos dissolvidos em geral resulta em redução da concentração de cobre e outros elementos metálicos devido às reações de complexação (Lombardi et al, 2007). Portanto, investigações que empregam concentrações sub-letais, passíveis de serem encontradas no ambiente, são importantes tanto para a compreensão da fisiologia ambiental e como também para a fisiologia dos organismos. Nesse sentido, as microalgas apresentam especial interesse pois seu contato com o meio é direto, através das membranas celulares.

Esta pesquisa se destaca por considerar os aspectos crônicos da contaminação por cobre, ou seja, emprega concentrações ambientalmente relevantes do metal. Avaliamos os efeitos do fosfato no metabolismo do cobre e na constituição bioquímica em células da microalga de água doce *Chlorella vulgaris*, organismo pertencente ao filo Chlorophyta. Foram avaliados os efeitos tóxicos do cobre através da determinação da concentração específica que reduz em 50% a densidade populacional (EC50) para diferentes concentrações de fósforo. A composição bioquímica foi determinada de acordo com a quantidade de lipídios, proteínas e carboidratos.

2. Objetivos

O objetivo geral deste trabalho foi avaliar a influência do nutriente essencial fosfato inorgânico dissolvido (fósforo – P) na toxicidade do cobre (Cu) sobre a toxicidade e composição bioquímica da microalga de água doce, *Chlorella vulgaris*. Para tanto, realizaram-se experimentos em combinação com várias concentrações de fosfato e de cobre sob condições controladas de laboratório.

Objetivos específicos

- Cultivar da espécie estudada em laboratório, sob condições controladas;
- Aclimatar a espécie nas concentrações de fósforo propostas e determinar a curva de crescimento (biomassa seca, número de células por mililitro de cultura e concentração de clorofila a) para cada concentração de fosfato;
- Analisar o crescimento das culturas de *C. vulgaris* sob a influência do fosfato e do cobre através do acompanhamento dos parâmetros: clorofila-a, número de células por mililitro de cultura e biomassa seca;
- Analisar a composição bioquímica (lipídios, proteínas e carboidratos) das culturas de *C. vulgaris* sob a influência do fosfato e do cobre;
- Determinar a concentração de íons cobre livres no meio de cultivo.

3. Materiais e Métodos

Chlorella vulgaris (Figura 1) é uma microalga pertencente ao grupo das Chlorophyceae, bastante comum em ambientes de água doce. Apresenta forma esférica com cerca de 3-10 µm de diâmetro. Possui um único e largo cloroplasto, tendo como pigmentos principais clorofila a e clorofila b.

3.1 Cultivo da alga

A microalga foi mantida em meio de cultura W.C. (Gillhard & Lorenzen, 1972), que contém EDTA ($1.7 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$) em sua formulação. O meio usado foi modificado em relação ao reagente usado como fonte de cobre. Ao invés de sulfato de cobre, como constante do meio original, foi usado o cloreto de cobre. O meio W.C. apresenta concentração de fosfato de $5.0 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$ e, a partir desta concentração, outras menores foram definidas para avaliar o efeito do fosfato na toxicidade do cobre. As concentrações de fósforo na forma de K_2HPO_4 utilizadas no experimento foram: 5.0×10^{-5} (controle), 2.5×10^{-5} , 5.0×10^{-6} e 1.0×10^{-6} . Para cada concentração de fósforo, foram testadas as concentrações de cobre na amplitude entre 1×10^{-8} e $1 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$.

Antes de cada experimento, a microalga foi aclimatada para a concentração específica de fósforo a ser testada. Tal aclimatação é necessária para que o metabolismo da alga reflita a concentração de fósforo que se deseja. Obteve-se aclimatação após vários cultivos da microalga na concentração de fósforo específica, efetuando-se a repicagem da cultura sempre na primeira metade do crescimento exponencial. Desse modo, garantiu-se a estabilização da taxa de crescimento para uma dada concentração de fósforo dissolvido no meio. Somente após aclimatada para uma dada concentração de fósforo, é que a cultura foi submetida ao teste de toxicidade com a combinação fósforo/cobre (P/Cu).

A microalga foi cultivada em frascos do tipo Erlenmeyer de policarbonato com capacidade de 1 L contendo 350 mL de meio de cultura. A temperatura foi controlada em 20-22° C, com ciclo claro/escuro de 12/12 horas e luminosidade de $120 \mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. Amostras das culturas foram retiradas em dias alternados. A partir delas foram analisados a biomassa seca, contagem de células e clorofila a. Com essas informações foram plotadas as curvas de crescimento para *Chlorella vulgaris*. Todas as manipulações das culturas foram feitas em ambiente estéril usando-se uma cabine de fluxo laminar e todo o material usado foi esterilizado através de autoclave, 30 min 1 atm.

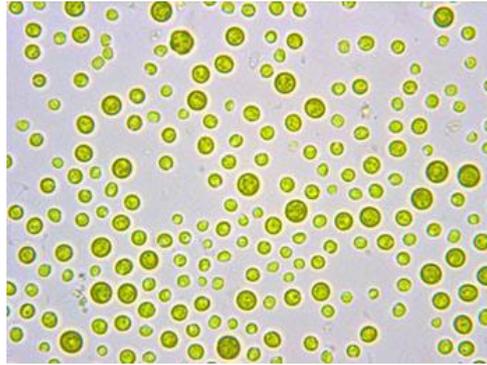


Fig.1 *Chlorella vulgaris*. Foto obtida em microscópio ótico em objetiva de 40x.

3.1.1 Amostragens

Contagem de células

Amostras de 3 mL foram obtidas da cultura e fixadas com Lugol ácido. A contagem de células foi realizada em microscópio ótico Leica, em objetiva com aumento de 40 vezes, com o auxílio de uma câmara de Neubauer. Cada amostra era contada pelo menos 3 vezes e cada resultado obtido foi substituído na fórmula abaixo (equação 1) para a obtenção do número de células por mL.

$$\text{N}^\circ \text{ de células} = (\text{N}^\circ \text{ obtido pela contagem} / \text{N}^\circ \text{ quadrados contados}) \times 1,6 \quad (1)$$

Peso seco

O peso seco foi obtido filtrando 5 mL de amostra da cultura em um filtro de éster de celulose com diâmetro de poro de 0.22 μm previamente seco e pesado em balança analítica (Sartorius, MC21S) com precisão de 1 μg . Após a filtragem, a amostra foi colocada em estufa (60 °C) por 48 h e novamente sua massa foi quantificada. A biomassa seca foi então calculada subtraindo-se a massa obtida na segunda pesagem daquela obtida na primeira pesagem.

Quantificação da clorofila a

A concentração de clorofila a foi determinada de acordo com a metodologia descrita em Shoaf & Lium (1976). Neste método, filtrou-se 5 mL de amostra em filtros de éster de celulose (Millipore) com poro 0.45 μm e o filtro foi imerso em um tubo de ensaio contendo 2 mL de DMSO (dimetil-sulfóxido). Depois de passados 3 minutos, adicionou-se 2 mL de acetona 90%. Os tubos de ensaio foram então centrifugados por 15 minutos a 10 °C e 4400 rpm. O sobrenadante foi então submetido à análise em espectrofotômetro nos comprimentos de onda de 664 nm e 630 nm. O branco foi feito com o filtro, acrescido de 2 mL de DMSO e 2 mL de acetona 90%. Com os resultados obtidos no espectrofotômetro, a fórmula descrita abaixo (equação 2) foi aplicada.

$$\text{Concentração de clorofila a (mg/L)} = [11,47 (\lambda 664\text{nm}) - 0,40(\lambda 630)]. x/y \quad (2)$$

Onde: x= volume do solvente e y= volume da amostra filtrada

Quantificação de proteínas

A extração de proteína foi feita de acordo com o protocolo de extração descrito em Rausch (1981), onde 5 mL de amostra das culturas foram filtrados em filtros de fibra de vidro e, em seguida, armazenadas no freezer por no máximo 2 semanas. No momento de quantificação, essas amostras então foram aquecidas em 0.5 N NaOH por 2 horas. As proteínas totais foram quantificadas usando o método de Bradford (1976) com *serum* de albumina bovina (BSA) como padrão de proteína. As curvas de calibrações foram feitas utilizando-se um intervalo de concentração entre 0 - 150 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e a absorção das amostras foi realizada em 595 nm. As curvas de calibração obtidas são apresentadas no apêndice.

Quantificação de carboidratos

Na quantificação de carboidratos, 5 mL de amostra das culturas foram filtradas em filtros de éster de celulose (Millipore) com poro 0.45 μm e, em seguida, armazenadas no

freezer por no máximo 2 semanas. A quantidade de carboidratos intracelular foi determinada usando-se o método modificado de Liu et al. (1973) de ácido de fenol-sulfúrico com glucose como padrão. As curvas de calibração foram medidas entre 0 - 150 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Todos os padrões foram determinados em 485 nm comparados com um branco. As curvas de calibração obtidas são apresentadas no apêndice.

Quantificação de lipídios

A extração de lipídios foi feita utilizando-se o método modificado de Folch descrito em (Parrish, 1999) usando a razão de diclorometano:metanol 2:1. Para a amostragem, foi usado 50 mL de cultura que foi filtrada em filtros de fibra de vidro, previamente incinerados. Em todas as amostras foi adicionado padrão interno (Hexadecanona, Sigma-Aldrich) antes da extração. As amostras foram homogeneizadas com um bastão de vidro e então sonicadas por 2 minutos em 2 ciclos de 1 minuto. Após a homogeneização, as amostras foram concentradas com gás de nitrogênio (N_2) e aplicada em colunas cromatográficas envoltas por sílica gel (Chromarods-SIII). A detecção das classes lipídicas foram feitas em um sistema Iatroscan TLC-FID MK6S de acordo com Parrish (1999). A identificação dos picos foi feita com as curvas de calibração obtidas com 9 padrões lipídicos: n-nonadecano (hidrocarboneto alifático, HC), estearil palmitato (éster de cera, WE/SE), 3-hexadecanona (cetona, KET), glyceryl tripalmitate (triglicerídeo, TAG), ácido palmítico (ácidos graxos livres, FFA), cetil álcool (álcool alifático livre, ALC), colesterol (esterol, ST), monopalmitina (lipídios polares móveis em acetona, AMPL) e leticina (fosfolipídios, PL) obtidos através da Sigma-Aldrich (U.S.A.). As curvas de calibração obtidas são apresentadas no apêndice.

A concentração total dos lipídios em cada extrato foi assumida ser a soma das concentrações das diferentes classes lipídicas. As condições analíticas do Iatroscan para todas as amostras foram: fluxo de hidrogênio de 173 ml.min^{-1} , fluxo de ar 2 de L.min^{-1} e velocidade de leitura de 4 mm.s^{-1} . Todos os filtros GF/C, utensílios de vidro e materiais de metal que entraram em contato com as amostras foram previamente deixados em mufla a 400 ° C durante 12 horas. Materiais de Teflon® e vidro foram lavados com metanol e diclorometano imediatamente antes de serem utilizados, para reduzir a contaminação.

Quantificação do cobre

A concentração de íons cobre livre (Cu^{2+}) foi determinada utilizando-se um eletrodo seletivo para o íon cobre (Orion 94, E.U.A.) em conjunto com um eletrodo de referência de vidro de dupla junção (ANALION, modelo R-684, Brasil). As determinações do potencial foram feitas através de um voltímetro (ANALION 2000, modelo 608, Brazil) com resolução de 0.1 mV. Para isso, a temperatura ambiente foi controlada em 21 ± 1 ° C. A força iônica das amostras foi ajustada para $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ usando-se NaNO_3 ultra puro (MicroSelect, Fluka, Suíça); a mesma força iônica foi usada para padrões e amostras. Todos os padrões tiveram seu pH ajustado para 4.5 – 5.0.

A determinação de concentrações ambientalmente relevantes de metais exige cuidados especiais na limpeza do material e sistemática de atividades no laboratório, assim como nas calibrações. Em geral, os sistemas ISE para a detecção de cobre apresentam linearidade até cerca de $10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$ do metal, o que inviabilizaria seu uso para a detecção de concentrações de importância ambiental, que são cerca de $10^4 - 10^5$ vezes menores do que $10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$. Portanto, o desenvolvimento e aprimoramento de ferramentas analíticas para a extensão da linearidade da técnica tem grande importância ecológica e fisiológica, uma vez que são às concentrações mais baixas que os organismos estão expostos. Contaminações agudas por metais são eventos raros; normalmente os metais atingem os ecossistemas aquáticos através de despejos crônicos, o que significa concentrações sub-letais cujos efeitos não são facilmente detectáveis nos organismos. Uma das ferramentas de que dispõe a química analítica para a extensão dos limites de detecção de sistemas ISE são os tampões metálicos, que, nesta pesquisa foram usados para a calibração do sistema e permitiram a detecção de concentrações até cerca de $10^{-11} \text{ mol.L}^{-1}$ do metal na forma livre. Essa concentração é cerca de 10 vezes menor do que a concentração presente em nosso meio de cultura controle.

Antes da sua utilização nos experimentos, o eletrodo foi calibrado usando-se tampões metálicos, que foram elaborados com NTA ($10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$) como ligante, PIPES ($10^{-2} \text{ mol.L}^{-1}$) como ajustador de pH, NaNO_3 ultra puro como ajustador de força iônica. Os tampões metálicos foram preparados em concentrações de Cu^{2+} de 10^{-12} , 10^{-11} e $10^{-9} \text{ mol.L}^{-1}$ e não tiveram o pH ajustado. Os tampões foram deixados estabilizando em contato com o eletrodo por 12 - 15 h. Detalhes da metodologia encontram-se descritos em Lombardi et al. (2007) e a figura 2 mostra a curva de calibração obtida. Para a determinação da concentração de cobre nas amostras, após a calibração, o eletrodo foi deixado equilibrar em uma alíquota de amostra com força iônica ajustada.

Contaminação com cobre

Para cada concentração de fosfato usada, as células algais em crescimento exponencial e previamente aclimatadas àquela concentração de fosfato, foram expostas por 96 horas a diversas concentrações de cobre. De acordo com Hook et al. (2002) 96 h é o tempo necessário para que cada célula tenha a concentração intracelular uniforme do metal.

Todos os experimentos envolvendo o cobre foram realizados em frascos de policarbonato com 3 réplicas. O controle consistiu de algas não contaminadas com cobre, mas sendo este metal fornecido nas condições de micronutriente, ou seja, na concentração originalmente presente no meio nutritivo W.C. (células saudáveis). Para cada concentração de cobre, quatro concentrações de fosfato, incluindo o controle, foram testadas. Uma vez iniciados os experimentos, os frascos foram colocados sob iluminação e temperatura controladas iguais às usadas para a manutenção das culturas. Todos os materiais envolvidos nos experimentos foram previamente lavados com detergente neutro (sem fosfatos), enxaguados e em seguida deixados em imersão em HCL 1,0 mol.L⁻¹ por 7 dias. Posteriormente foram enxaguados com água destilada e deionizada, secos em estufa e, em seguida, autoclavados. Todas as amostras foram avaliadas para densidade populacional (contagem do número de células por mL), clorofila a (mg L⁻¹), biomassa seca (g). No meio filtrado, as amostras foram analisadas para determinação da concentração de íons cobre livre no meio de acordo com o procedimento descrito em Lombardi et al. (2007).

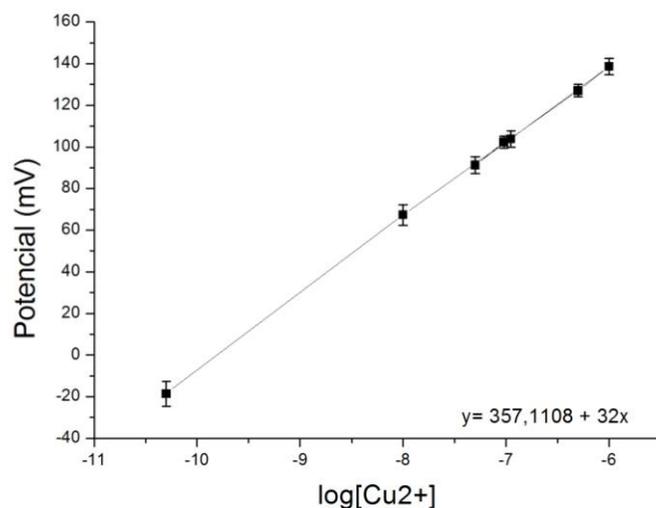


Fig.2 Regressão linear obtida para a calibração do eletrodo seletivo ao íon cobre. A concentração de cobre livre (mol. L⁻¹) está plotada como uma função das leituras (mV). A equação obtida para a calibração foi $y = 357,50 + 32x$.

3.2 Análise estatística

Os resultados obtidos para o crescimento da alga nas diversas concentrações de fosfato em combinação com as concentrações de cobre foram utilizados para a obtenção dos valores de EC50 através de uma regressão linear simples. Esses valores foram comparados através de análise de variância (ANOVA).

Os efeitos dos diversos tratamentos na composição bioquímica da alga foram comparados com um teste factorial, o modelo linear multivariado geral ANOVA e o teste *post hoc* feito foi o HSD de Tukey. Todas as análises foram feitas em nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

4. Resultados

Na Tabela 1 são apresentadas as taxas de crescimento obtidas para as diversas concentrações de fósforo utilizadas neste estudo durante o processo de aclimação. A concentração de cobre presente no meio de cultura foi a mesma em todos os tratamentos. As taxas de crescimento são o coeficiente angular da equação de regressão linear calculada para cada tratamento de fósforo. Para sua obtenção, foi plotado o logaritmo do número de células por mL pelo tempo experimental.

Uma geração foi considerada como o intervalo de tempo entre o inóculo inicial da cultura até o momento em que a cultura, ainda em fase exponencial, era repicada. A cultura foi considerada aclimatada quando a diferença das taxas de crescimento entre uma geração e outra não fosse significativa, o que ocorreu entre a quarta e a quinta geração.

Tabela 1. Taxas de crescimento obtidas durante o processo de aclimação das células de *C. vulgaris* para as diferentes concentrações de fosfato testadas. As taxas de crescimento são representadas pelos coeficientes angulares da equação de regressão do logaritmo do número de células por mL como função do tempo experimental.

Concentração de fósforo (mol.L)	Concentração			
	5×10^{-5}	2.5×10^{-5}	5×10^{-6}	1×10^{-6}
Geração				
1	0,176	0,173	0,177	0,182
2	0,179	0,168	0,168	0,130
3	0,176	0,160	0,157	0,137
4	0,176	0,154	0,117	0,106
5	0,177	0,153	0,121	0,101

Como a concentração de cobre adicionada é diferente da concentração de cobre que permanece disponível para as algas, ou seja, o metal livre (Cu^{2+}), na Tabela 2 são apresentados os valores determinados pelo eletrodo seletivo para cada concentração de cobre

adicionado no meio de cultura. Não foi detectado qualquer efeito da concentração de fósforo sobre as concentrações de cobre, entretanto, em todos os tratamentos, aproximadamente 99,0% do cobre adicionado no meio de cultura encontrava-se na forma complexado, provavelmente com o ligante sintético adicionado ao meio, EDTA.

Tabela 2. Concentrações de cobre testadas: concentração de cobre dissolvido total adicionado (nominal), concentração de íons cobre livre determinadas para cada tratamento e seu erro (SD). Valores das concentrações reportados em mol.L⁻¹.

Cu nominal (mol/L)	Cu ²⁺ livre(mol/L)	Erro (SD)
1x10 ⁻⁷	1,03 ⁻¹⁰	1,58 ⁻¹¹
1x10 ⁻⁶	1,04 ⁻⁹	1,00 ⁻¹⁰
5x10 ⁻⁶	5,09 ⁻⁹	1,23 ⁻¹⁰
1x10 ⁻⁵	1,29 ⁻⁸	1,99 ⁻⁹
5x10 ⁻⁵	5,13 ⁻⁸	1,31 ⁻⁹

Na figura 3 são apresentados os resultados obtidos para o número de células por mL nos diferentes tratamentos de fósforo para as várias contaminações de cobre. É possível notar que o aumento na concentração do cobre causa diminuição no número de células obtidos a cada dia e, a diminuição na concentração de fosfato acentua este fenômeno, principalmente nas concentrações mais baixas de fósforo.

Os resultados do EC50, calculado com base nos parâmetros de biomassa (número de células por mL, concentração de clorofila-a e biomassa seca) para cada concentração de fósforo estão apresentados na tabela 3.

A figura 4 mostra os resultados obtidos para clorofila-a nos diferentes tratamentos de fósforo para as várias contaminações de cobre. Assim como na figura 3, é possível notar que o aumento na concentração do cobre e diminuição na concentração de fosfato causam a diminuição da concentração de clorofila-a, mas essa diminuição é mais acentuada na concentração de 10⁻⁸ mol.L⁻¹ de cobre, e não na concentração de 5.10⁻⁸ mol.L⁻¹ de cobre, a mais alta empregada nesta pesquisa.

A figura 5 mostra os resultados obtidos para a biomassa seca nos diferentes tratamentos de fósforo para as várias contaminações de cobre. Manteve-se a mesma tendência dos dados descritos para as figuras 3 e 4. No entanto, com excessão do controle de cobre (concentração de 10^{-10} mol.L⁻¹), não houve aumento de biomassa seca.

A Figura 6 mostra os resultados dos EC50 obtidos para cada parâmetro de biomassa (número de células por mL, clorofila-a, biomassa seca). O gráfico, cujo eixo X representa o log da concentração de fosfato, resultou em uma função linear. Todas as retas de regressão obtidas são significativas a 5%.

Tabela 3. Resultados obtidos no cálculo do EC50 relativo à cada concentração de fósforo para os parâmetros de biomassa.

Cobre Livre (Cu ²⁺) (mol.L ⁻¹)	Valores de EC50 (mol.L ⁻¹)		
	Cels/mL	Clorofila-a	Biomassa seca
$5,0 \times 10^{-5}$	$5,62 \times 10^{-9}$	$4,92 \times 10^{-9}$	$4,43 \times 10^{-9}$
$2,5 \times 10^{-5}$	$4,46 \times 10^{-9}$	$3,38 \times 10^{-9}$	$3,89 \times 10^{-9}$
$5,0 \times 10^{-6}$	$3,63 \times 10^{-9}$	$2,63 \times 10^{-9}$	$2,71 \times 10^{-9}$
$1,0 \times 10^{-6}$	$1,95 \times 10^{-9}$	$1,0 \times 10^{-9}$	$1,95 \times 10^{-9}$

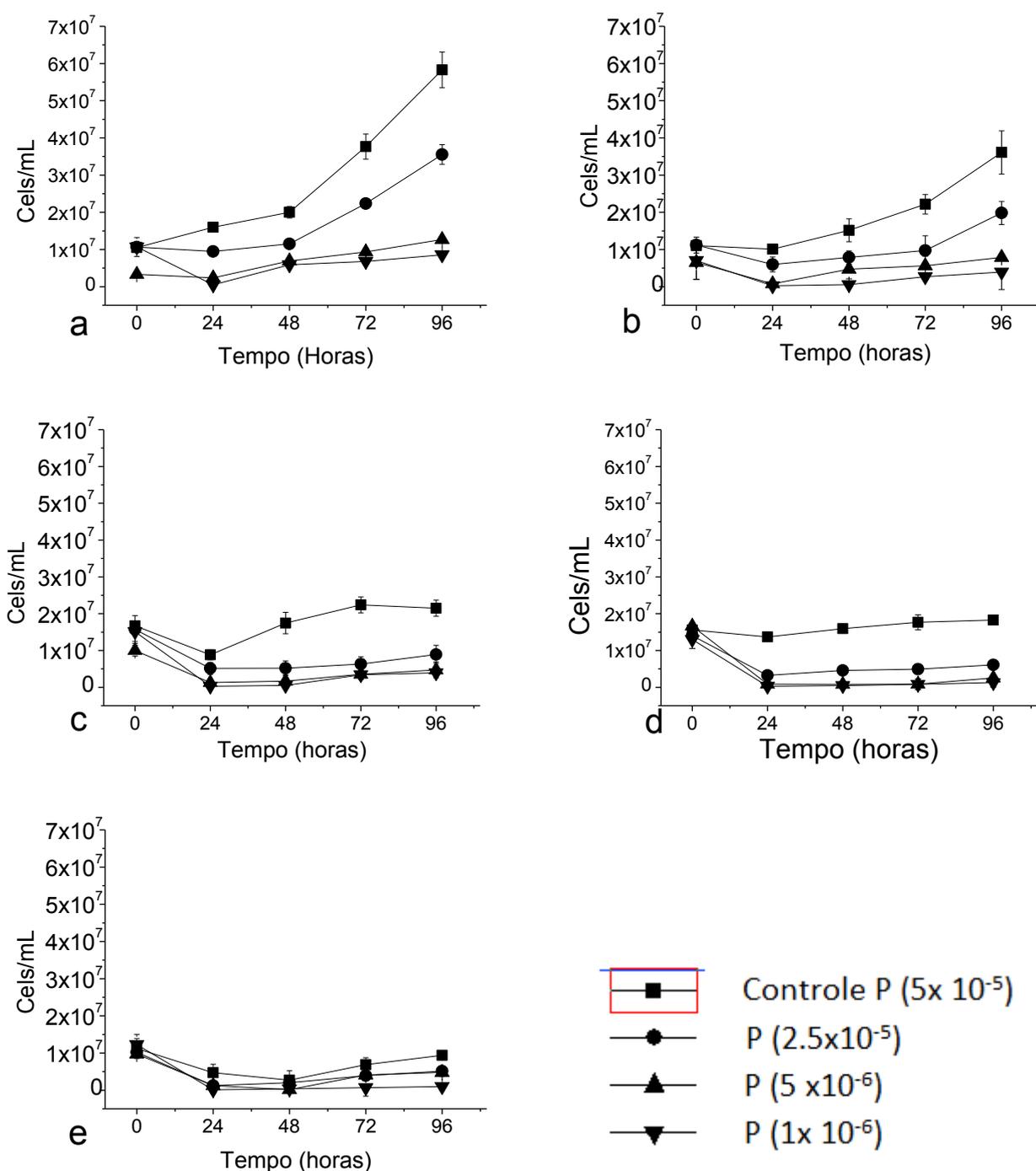


Fig. 3. Número de células por mL para os diversos tratamentos experimentais envolvendo diferentes combinações P:Cu. Tempo de exposição de 96 horas. Os símbolos se referem à concentração de fósforo utilizada: ■ representa o controle de fósforo, 5×10^{-5} ; ● representa a concentração de $2,5 \times 10^{-5}$ de fósforo; ▲ representa a concentração de 5×10^{-6} de fósforo e ▼ representa a concentração de 10^{-6} de fósforo. Na legenda, a letra **a** representa o controle (concentração de cobre de 10^{-10} mol.L $^{-1}$); a letra **b** representa a concentração de cobre de 10^{-9} mol.L $^{-1}$; a letra **c** representa a concentração de 5×10^{-9} mol.L $^{-1}$ de cobre; a letra **d** representa a concentração de 10^{-8} mol.L $^{-1}$ de cobre e, por fim, a letra **e** representa a concentração de 5×10^{-8} mol.L $^{-1}$ de cobre.

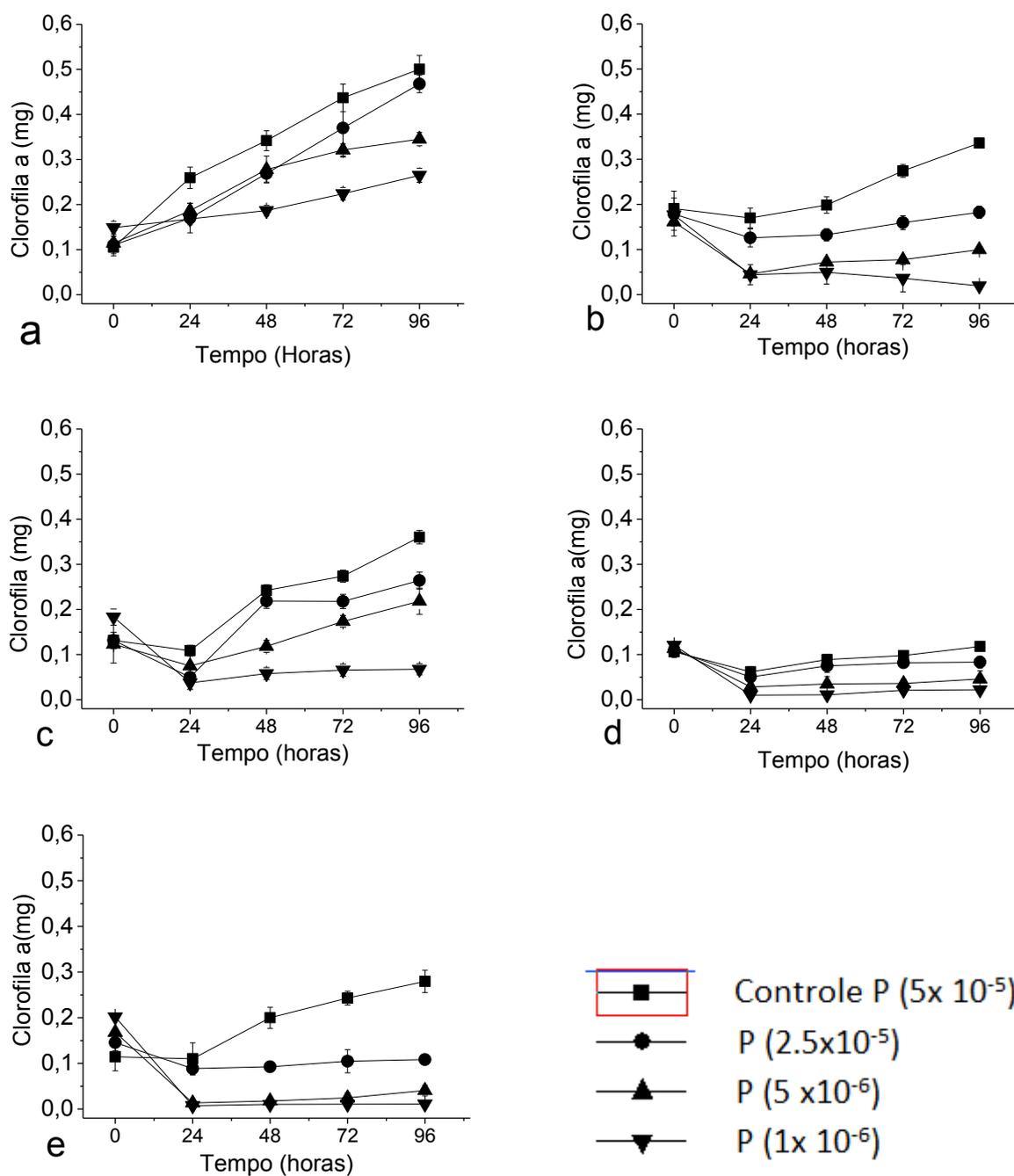


Fig. 4. Concentração de clorofila-a para os diversos tratamentos experimentais envolvendo diferentes combinações P:Cu. O tempo de exposição foi de 96 horas. Os símbolos se referem à concentração de fósforo utilizada: ■ representa o controle de fósforo, 5×10^{-5} ; ● representa a concentração de $2,5 \times 10^{-5}$ de fósforo; ▲ representa a concentração de 5×10^{-6} de fósforo e ▼ representa a concentração de 10^{-6} de fósforo. Na legenda, a letra **a** representa o controle (concentração de cobre de $10^{-10} \text{ mol.L}^{-1}$); a letra **b** representa a concentração de cobre de $10^{-9} \text{ mol.L}^{-1}$; a letra **c** representa a concentração de $5 \times 10^{-9} \text{ mol.L}^{-1}$ de cobre; a letra **d** representa a concentração de $10^{-8} \text{ mol.L}^{-1}$ de cobre e, por fim, a letra **e** representa a concentração de $5 \times 10^{-8} \text{ mol.L}^{-1}$ de cobre.

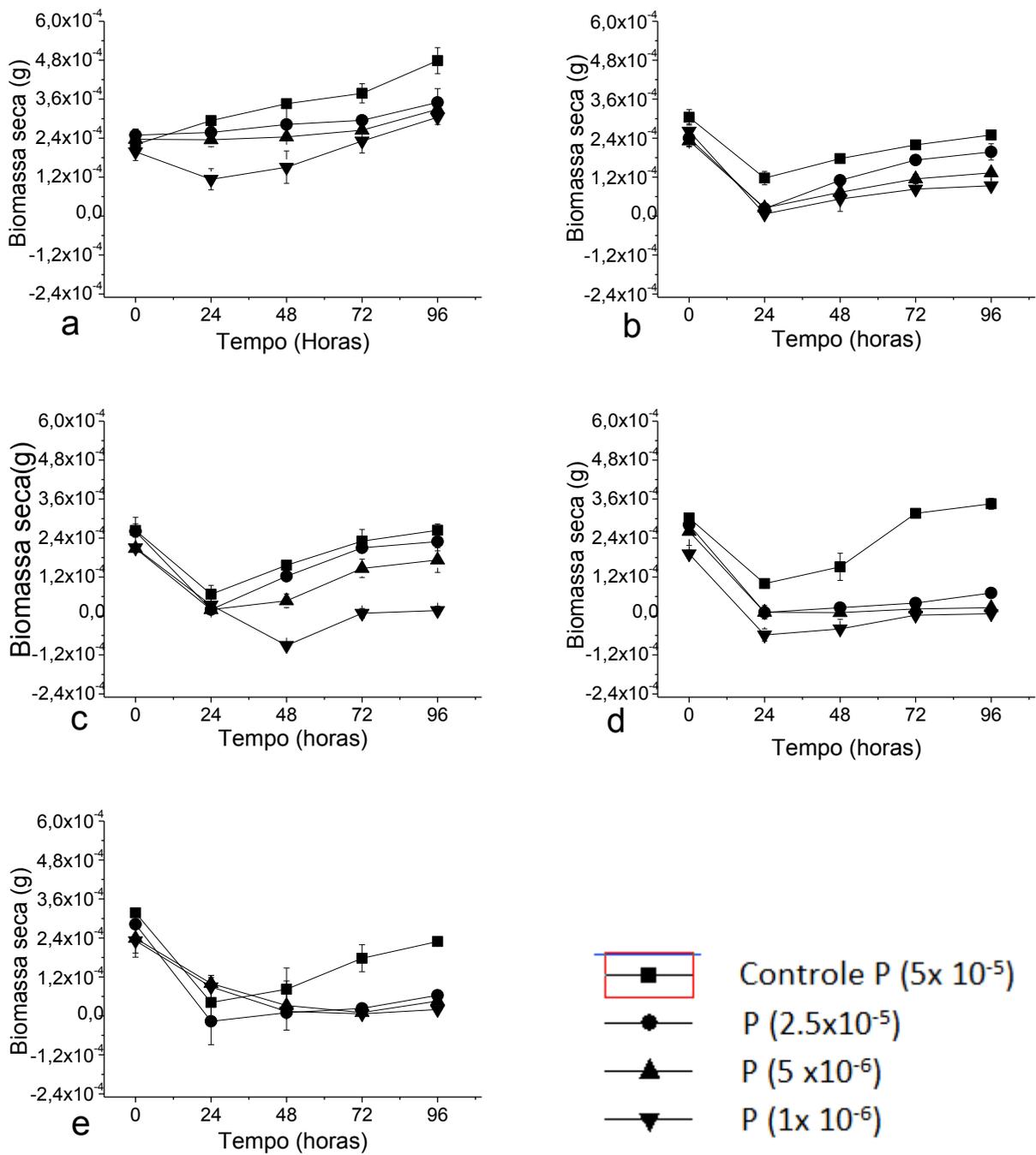


Fig. 5. Biomassa seca para os diversos tratamentos experimentais envolvendo diferentes combinações P:Cu. O tempo de exposição foi de 96 horas. Os símbolos se referem à concentração de fósforo utilizada: ■ representa o controle de fósforo, 5×10^{-5} ; ● representa a concentração de $2,5 \times 10^{-5}$ de fósforo; ▲ representa a concentração de 5×10^{-6} de fósforo e ▼ representa a concentração de 10^{-6} de fósforo. Na legenda, a letra **a** representa o controle (concentração de cobre de 10^{-10} mol.L⁻¹); a letra **b** representa a concentração de cobre de 10^{-9} mol.L⁻¹; a letra **c** representa a concentração de 5×10^{-9} mol.L⁻¹ de cobre; a letra **d** representa a concentração de 10^{-8} mol.L⁻¹ de cobre e, por fim, a letra **e** representa a concentração de 5×10^{-8} mol.L⁻¹ de cobre.

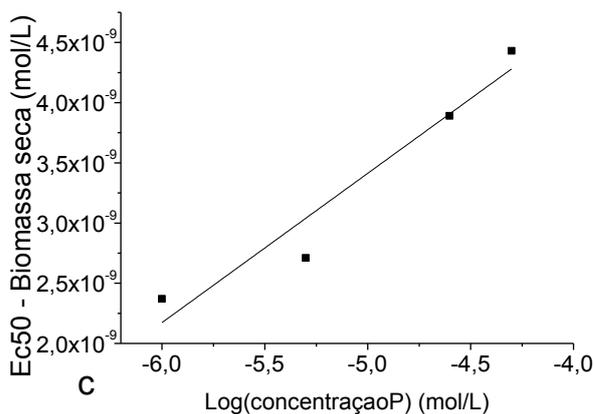
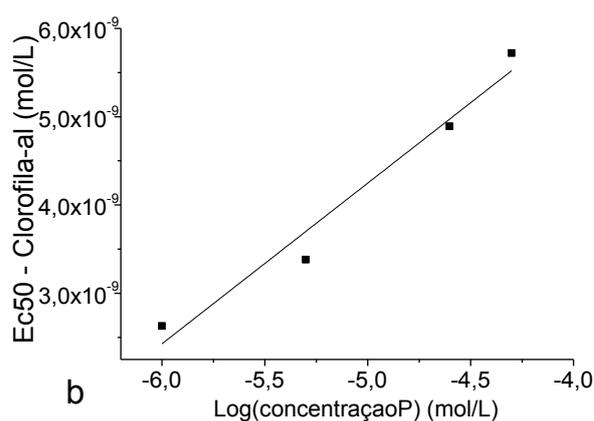
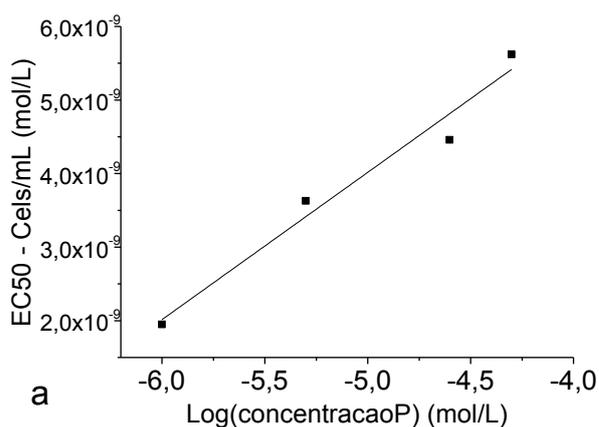


Fig. 6 EC50 obtidos para os diversos parâmetros de biomassa plotados em função do logaritmo da concentração de fósforo. A letra **a** representa os valores de EC50 com base no número de células por mL de cultura. A equação da reta de regressão obtida foi $y = 1,40 \times 10^{-8} + 2,00 \times 10^{-9}x$, com r^2 ajustado de 0,95. A letra **b** representa os valores de EC50 baseados na concentração de clorofila-a. A equação da reta de regressão obtida foi $y = 1,34 \times 10^{-8} + 1,82 \times 10^{-9}x$, com um r^2 ajustado de 0,95. A letra **c** representa os valores de EC50 com base na biomassa seca. A equação da reta de regressão obtida foi $y = 9,62 \times 10^{-9} + 1,42 \times 10^{-9}x$, com um r^2 ajustado de 0,91. Todas as retas são significativas a 5%.

A figura 8 mostra os resultados obtidos para a concentração de carboidratos totais (**a**), proteínas totais (**b**) e lipídios totais (**c**) nos diferentes tratamentos combinados de fósforo e cobre. Em geral o aumento na concentração de cobre livre causou um aumento na concentração de carboidratos (fig.8a), exceto para a concentração de cobre livre de 5×10^{-9} em conjunto com a concentração de $2,5 \times 10^{-5}$ de fosfato, onde houve diminuição da concentração de carboidratos. Essa tendência de aumento também apareceu em relação à concentração de proteínas totais, que aumentaram em uma baixa concentração de fosfato e alto estresse de cobre (153 pg.cell^{-1} de proteína). A limitação do fosfato associada a níveis mais elevados de cobre livre tenderam a aumentar a produção de lipídios totais por célula em cerca de 35 vezes a concentração observada nas concentrações saudáveis de cobre e fosfato (controles).

A figura 9 representa os resultados obtidos para duas das classes lipídicas: hidrocarbonetos alifáticos (HC, fig. **9a**) e ésteres de cera (WE, fig. **9b**). Os hidrocarbonetos alifáticos aumentaram com o aumento na concentração de cobre, mas as concentrações com mais alto fosfato foram aquelas que obtiveram a menor concentração dessa classe lipídica. No controle, onde há a maior concentração de fosfato e a menor concentração de cobre, foi detectado $0,01 \text{ pg/célula}$ de HC. Enquanto isso, no tratamento com a menor concentração de fósforo e de maior concentração de cobre, essa quantificou-se $0,32 \text{ pg/célula}$.

Os resultados obtidos para os ésteres de cera não mostraram consistência nos tratamentos, sendo ausente em alguns deles. Sua parte na porcentagem de lipídios totais foi menor do que 1% e em geral estava mais associado com alto cobre ou baixo fosfato. A maior concentração obtida foi de $1,38 \text{ pg/célula}$ no tratamento de $10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$ de fosfato e $5 \times 10^{-9} \text{ mol.L}^{-1}$ de Cu^{2+} .

Os resultados apresentados na figura 10 referem-se à fração lipídica dos triglicerídeos (TAG, fig. **10a**) e dos ácidos graxos livres (FFA, fig. **10b**). O aumento do estresse nas células de *Chlorella vulgaris* levaram a um aumento nos triglicerídeos que representaram 25% da concentração de lipídios totais. As concentrações mais altas de fosfato apresentaram os menores níveis de triglicerídios, o que leva a crer que o aumento na concentração de cobre foi fator mais importante no aumento do nível de TAG. Em geral, os níveis de ácidos graxos livres foram baixos. A concentração mais alta de FFA obtida foi de $0,08 \text{ pg/célula}$ na menor concentração de fosfato e na mais alta concentração de Cu^{2+} .

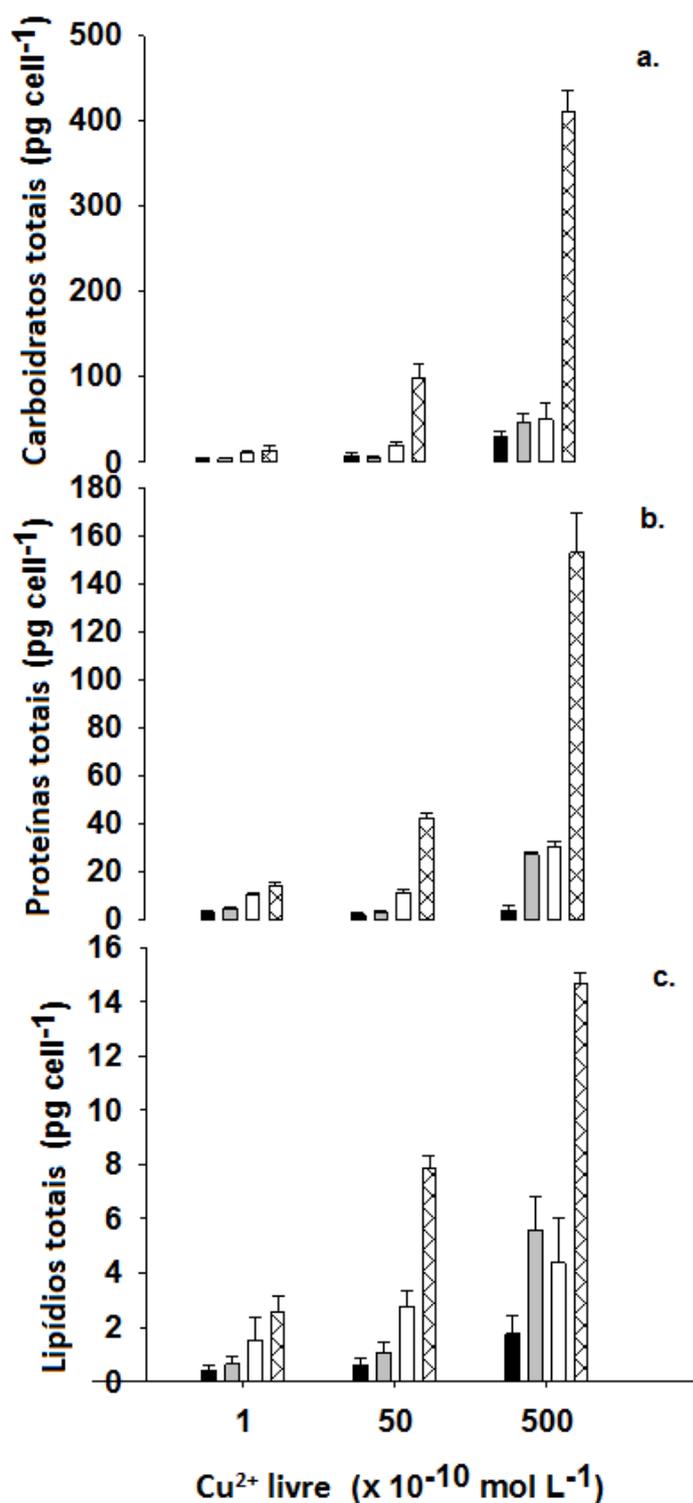


Fig. 7 Composição bioquímica (lipídios, proteínas e carboidratos) em células de *Chlorella vulgaris* como uma função das diferentes combinações de fósforo e concentrações de íons livre de cobre. A letra **a** representa os carboidratos totais, a letra **b** as proteínas totais e a letra **c** a concentração de lipídios totais. A coordenada x representa os tratamentos de cobre e as diferentes barras as diversas concentrações de fósforo. A barra preta representa 5×10^{-5} , a cinza $2,5 \times 10^{-5}$, a branca 5×10^{-6} e a branca com cruzes pretas, 1×10^{-6} mol.L⁻¹ de fósforo. A concentração das biomoléculas é apresentada em pg.célula⁻¹.

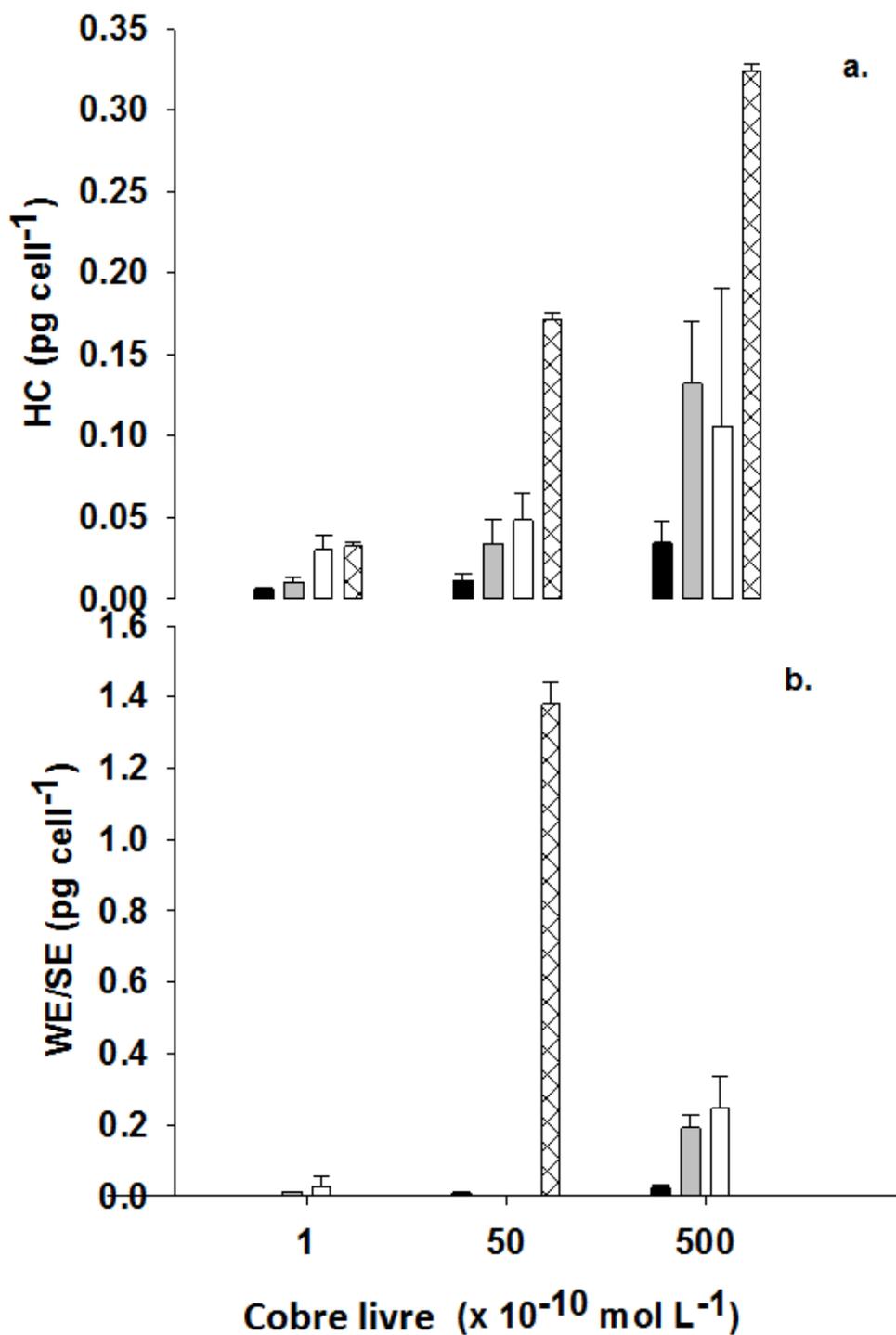


Fig.8. (a) Hidrocarboneto (HC) e (b) ésteres de cera (WE/SE) em células de *Chlorella vulgaris* como função das diferentes combinações de fósforo e concentrações de íons livres de cobre. A coordenada X representa os tratamentos de cobre e as diferentes barras representam diversas concentrações de fósforo. A barra preta representa 5×10^{-5} , a cinza $2,5 \times 10^{-5}$, a branca 5×10^{-6} e a branca com cruzes pretas, 1×10^{-6} mol.L $^{-1}$ de fósforo. A concentração das biomoléculas está em pg.célula $^{-1}$.

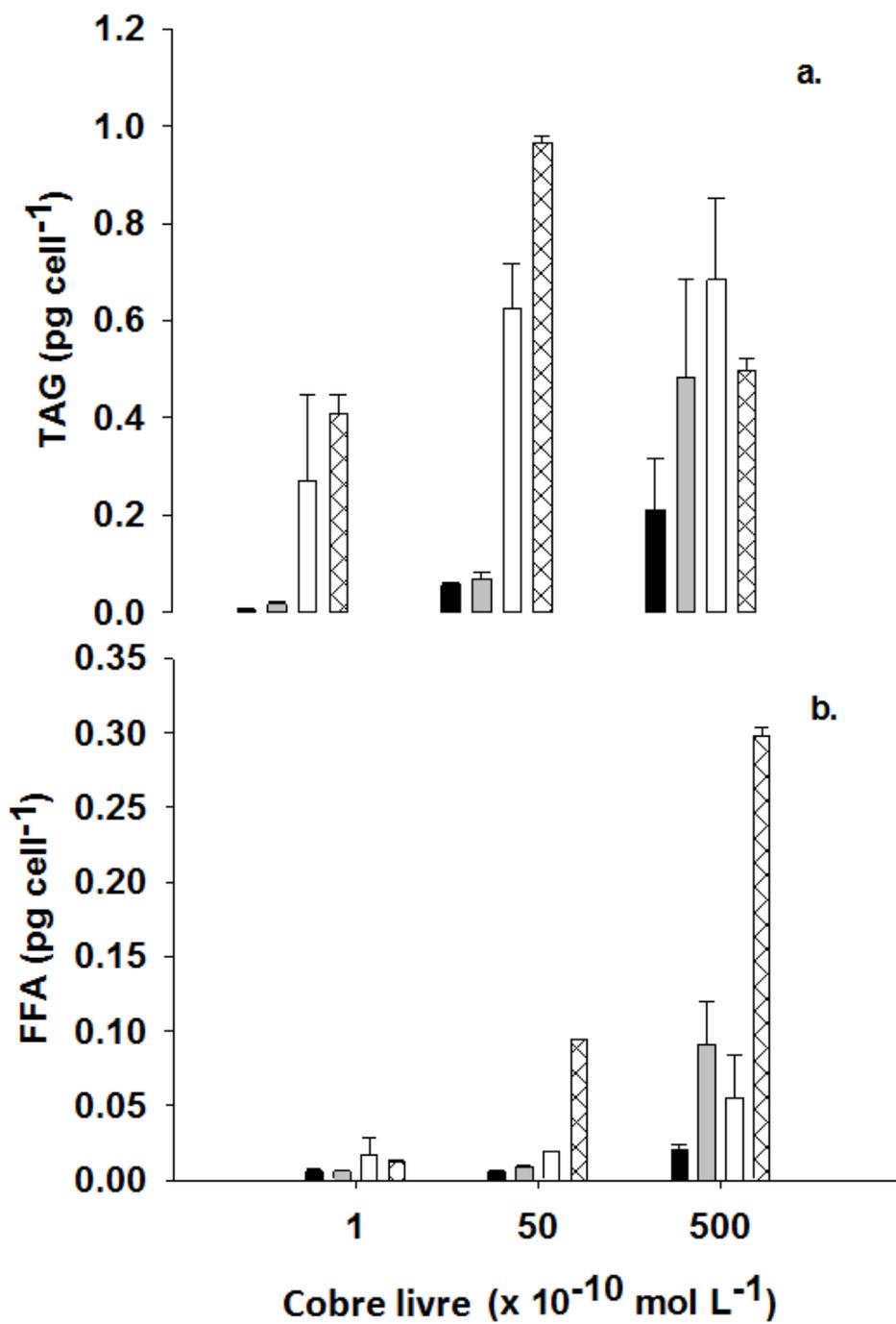


Fig.9. **(a)** Triglicerídeos (TAG) e **(b)** ácidos graxos livres (FFA) em células de *Chlorella vulgaris* como função das diferentes combinações de fósforo e concentrações de íons livres de cobre. A coordenada X representa os tratamentos de cobre e as diferentes barras as diversas concentrações de fósforo. A barra preta representa 5×10^{-5} , a cinza $2,5 \times 10^{-5}$, a branca 5×10^{-6} e a branca com cruzeiras pretas, 1×10^{-6} mol.L⁻¹ de fósforo. A concentração das biomoléculas estão em pg.célula⁻¹.

Na figura 11 estão apresentados os resultados obtidos para as concentrações das frações lipídicas álcool alifático livre (ALC, fig. **11a**) e esteróis (ST, fig. **11b**). Em alta concentração de fósforo as diversas concentrações de cobre não tiveram influência na concentração de ALC. As concentrações de ALC aumentam apenas em 5×10^{-9} mol.L⁻¹ e 5×10^{-8} mol.L⁻¹ de Cu livre, entretanto a concentração mais alta de álcool alifático livre (0,57 pg/célula) não ocorreu na na concentração mais alta de cobre, e sim na intermediária (5×10^{-9} mol.L⁻¹).

A quantidade de esteróis aumentou com o aumento de estresse por cobre nas células de *Chlorella vulgaris* e podemos ver que este aumento foi mais acentuado, considerando todas as concentrações de fósforo, nas concentração mais alta de cobre. Entretanto, o pico de ST (0,62 pg/célula) ocorreu na concentração de 5×10^{-9} mol.L⁻¹ de Cu livre e 1×10^{-6} mol.L⁻¹ de fósforo.

A figura 12 mostra os resultados obtidos para as concentrações das frações lipídicas de lipídios polares móveis em acetona (AMPL, fig. **12a**) e fosfolipídios (PL, fig. **12b**). Observou-se que a concentração de AMPL tendeu a aumentar com a diminuição de fósforo, e a maior concentração ocorreu na combinação maior cobre e menor fósforo. As concentrações de PL apresentaram um padrão similar ao de AMPL, onde a diminuição do fosfato e aumento da concentração de íons Cu²⁺ resultaram em níveis elevados dessa classe de lipídios por célula.

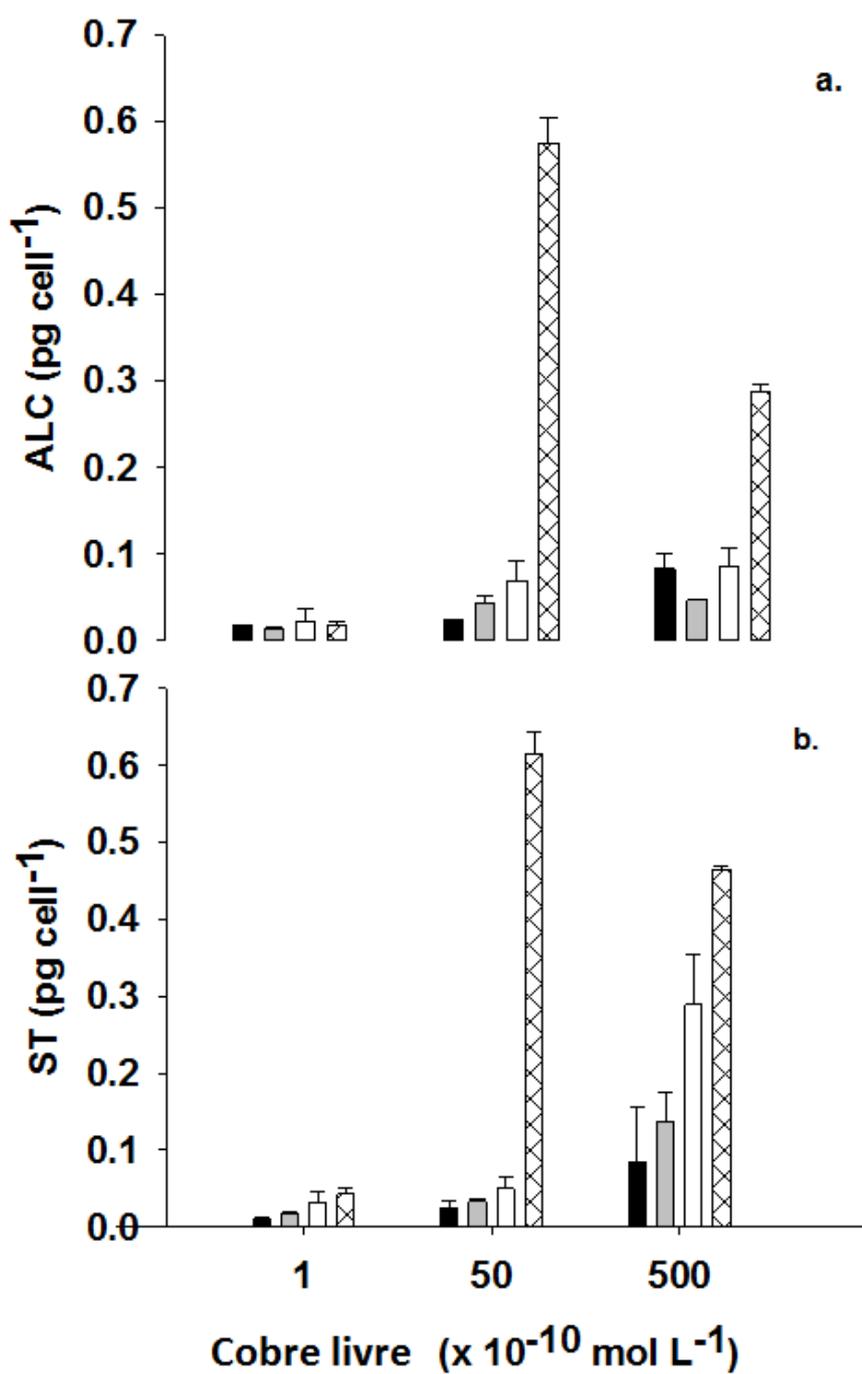


Fig.10. (a) Álcool alifático livre (ALC) e (b) esteróis (ST) em *Chlorella vulgaris* como função das diferentes combinações de fósforo e concentrações de íons livres de cobre. A coordenada X representa os tratamentos de cobre e as diferentes barras representam diversas concentrações de fósforo. A barra preta representa 5×10^{-5} , a cinza $2,5 \times 10^{-5}$, a branca 5×10^{-6} e a branca com cruzes pretas, 1×10^{-6} mol.L⁻¹ de fósforo. A concentração das biomoléculas está em pg.célula⁻¹.

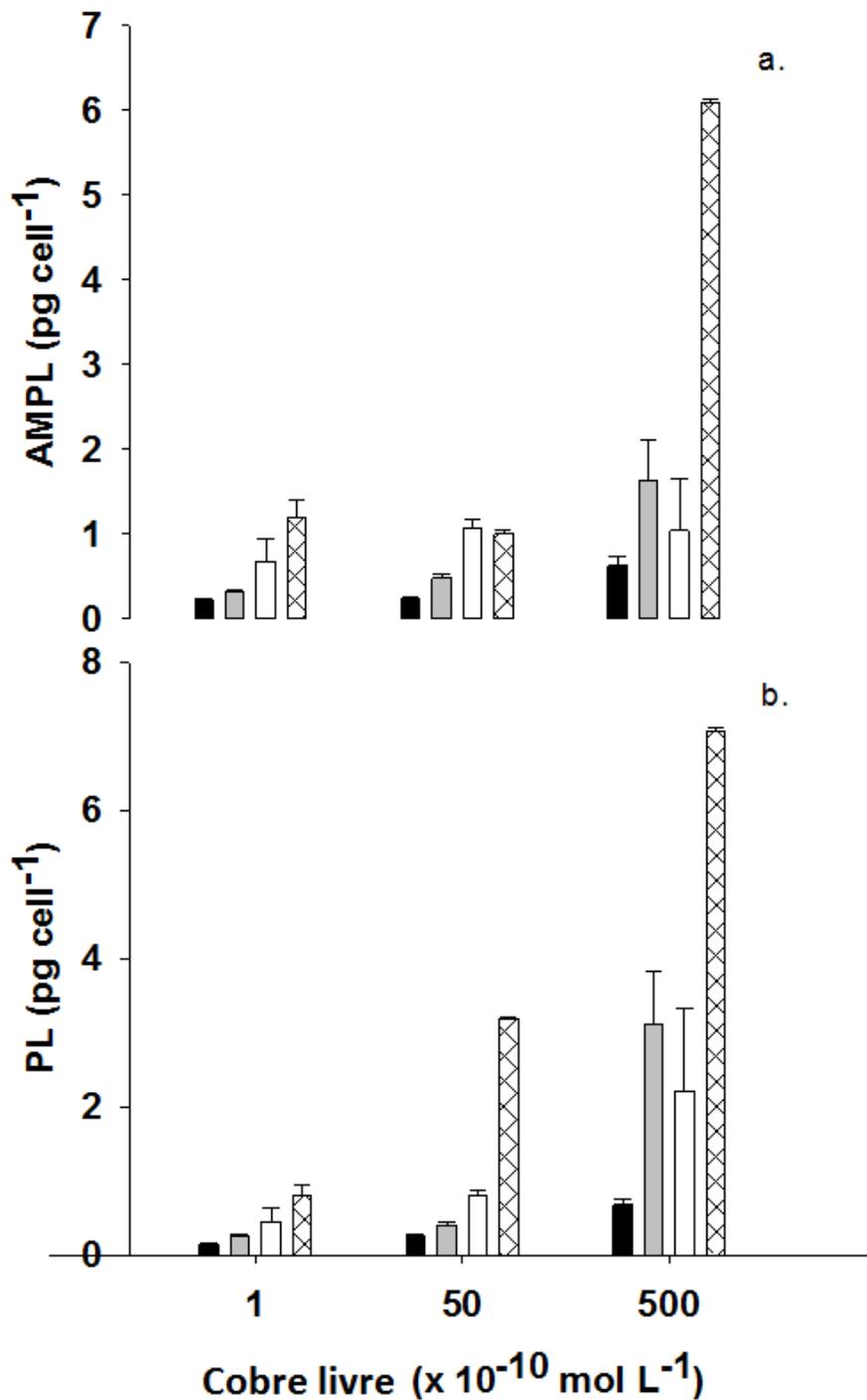


Fig.11. (a) Lipídios polares móveis em acetona (AMPL) e (b) fosfolipídios (PL) em *Chlorella vulgaris* como uma função das diferentes combinações de fósforo e concentrações de íons livres de cobre. A coordenada X representa os tratamentos de cobre e as diferentes barras as diversas concentrações de fósforo. A barra preta representa 5×10^{-5} , a cinza $2,5 \times 10^{-5}$, a branca 5×10^{-6} e a branca com cruzeiras pretas, 1×10^{-6} mol.L $^{-1}$ de fósforo. A concentração das biomoléculas estão em pg.célula $^{-1}$.

5. Discussão

5.1 Crescimento e toxicidade

O fósforo é um nutriente de grande importância para a célula algal (Serra et al. 2010), o que torna sua absorção relativamente elevada (Currie & Kalff, 1984) e, além disso, muitas microalgas são capazes de estocá-lo na forma de polifosfatos (Powell et al 2008). Por esse motivo, o primeiro passo para a realização dos experimentos foi a aclimatação da microalga. De acordo com Ji & Sherrell (2008), usualmente necessita-se de 4 ou 5 gerações para que o fósforo intracelular reflita, de fato, a concentração presente no meio de cultura. Neste trabalho, observamos que foram necessárias 4 gerações para *C. vulgaris* ter sua taxa de crescimento estabilizada para as concentrações de P testadas (Tabela 1). Considerando a concentração de Cu do controle, a taxa de crescimento, assim como a quantidade de clorofila-a e a biomassa seca mostram diferenças significativas (ANOVA, $P > 0.05$) para as diferentes concentrações de P, o que é corroborado por outros estudos (Babich & G. Stotzky, 1985; Ji & Sherrell, 2008). Quanto menor a concentração de fósforo dissolvido no meio, tanto menor foi a taxa de crescimento. Esses resultados estão de acordo com os apresentados em Lombardi & Wangersky (1991), onde os autores mostraram haver redução na taxa de crescimento em concentração de limitante de P.

Considerando a concentração de P do controle, as adições de cobre no meio de cultura causaram, em geral, uma diminuição nos parâmetros de biomassa (número de células por mL, biomassa seca e clorofila-a), enquanto para os parâmetros de composição bioquímica, as adições de cobre levaram a um aumento da concentração de carboidratos, lipídios e proteínas. Entretanto, observamos que a concentração de cobre adicionada não foi a mesma quantificada através do eletrodo ISE, apenas uma pequena quantidade do cobre total adicionado estava disponível para a alga na forma de íons Cu^{2+} livre. A causa dessa diferença de valores (Tabela 2) foi a adição de EDTA no meio de cultura. A adição de EDTA é importante para os meios de cultura enriquecidos, uma vez que o ligante impede a precipitação do ferro, e sua ausência poderia tornar o Fe indisponível para *C. vulgaris*. Estes resultados estão de acordo com outros da literatura, que mostram a complexação do cobre com ligantes orgânicos em meios de cultura de fitoplâncton (Lombardi et al, 2002; Lombardi et al, 2007; Andrade et al, 2010; Ytreberg et al, 2010). Se por um lado, o EDTA atua como agente solubilizador do Fe, ele também atua como agente sequestrador do Cu, diminuindo sua biodisponibilidade para a alga, resultando em menor concentração do cobre livre.

Para avaliar os efeitos da concentração de fosfato sobre a toxicidade do cobre na microalga, calculou-se o EC50 para cada tratamento. Qian et al (2009) obteve um valor de EC50 para o cobre em *C. vulgaris* de $2,63 \times 10^{-6}$ mol.L⁻¹ resultado maior do que aquele obtido neste estudo para a concentração do controle ($5,62 \times 10^{-9}$ mol.L⁻¹ de Cu²⁺), entretanto, o estudo citado utilizou-se das concentrações de cobre nominal, não as concentrações de cobre livre. Na presente pesquisa, observou-se para todos os casos, que os valores de EC50 aumentaram linearmente com o aumento de fosfato no meio, o que demonstra que em nossos experimentos, quanto mais saudáveis as células, melhor elas lidam com o efeito adverso/tóxico do cobre. O inverso também se aplica, ou seja, com uma menor concentração de fosfato, o efeito tóxico do cobre foi maior. Este resultado está de acordo com aqueles de Serra et al.(2010), que mostrou que altas concentrações de fósforo aumentaram a tolerância do cobre em células de *Nitzschia perminuta*. Outros trabalhos da literatura também corroboram nossos resultados e, entre eles, podemos citar Rijstenbil et al. (1998) e Wang & Dei (2006). Esses autores reportaram aumento na tolerância do cobre com o aumento do fósforo no meio de cultura. Em cianobactérias, Verma et al. (1993) apresentaram evidência de que a toxicidade de Cu em *Nostoc calcicola* ocorreu em resposta à falta de fosfato e que uma adição exógena do fosfato poderia antagonizar esse efeito.

Sabe-se que o fosfato faz parte da composição de fosfolipídios, que são lipídios cuja polaridade é dada pelo grupo fosfato (Lombardi 1990). Segundo Nalewajko & Olavenson (1994), a deficiência de fosfato em células de microalgas pode ocasionar redução na permeabilidade da membrana celular, facilitando a entrada de elementos tóxicos, no caso o cobre. Como obtido em nossos resultados, isso, de fato levou a um maior efeito tóxico do elemento cobre.

5.2 Composição Bioquímica

Em relação aos parâmetros bioquímicos, os resultados mostraram que a combinação de baixo fósforo e alto cobre em geral causaram um aumento da concentração desses parâmetros. É sabido da literatura que quando a célula algal não é capaz de se dividir, qualquer que seja o motivo (Guschina et al, 2006), há uma tendência da mesma em acumular produtos do metabolismo, tais como lipídios e carboidratos. Mutlu et al. (2011) obtiveram um aumento na concentração de lipídios em *C. vulgaris* com a deficiência de nitrogênio no meio de cultura. O nível mais alto de lipídios (35,6%) foi obtido em 100% de deficiência de nitrogênio em relação ao controle.

A concentração de carboidrato intracelular aumentou com o aumento na concentração do cobre no meio de cultura, mas não foi significativamente alterada pela concentração de fosfato no meio. Entretanto, na concentração de baixo fosfato (1×10^{-6} mol.L⁻¹) e cobre intermediário (5×10^{-9} mol.L⁻¹), os carboidratos sofreram aumento de mais de 15 vezes em relação ao controle. Mas, para a situação mais extrema (mais baixo P e mais alto Cu) foi obtida a maior concentração de carboidrato, cerca de 100 vezes maior do que o controle. Esses resultados estão de acordo com outros da literatura. Pistocchi et al (1997) mostrou que como consequência da toxicidade de cobre, *Cylindrotheca fusiformis* teve a síntese de carboidratos induzida, aumentando sua concentração intracelular e, em *C. vulgaris*, Afkar et al (2010) mostraram resultados similares, de alta concentração de carboidratos sob estresse de cobre. Esses autores usaram uma concentração de cobre que variou de 10^{-6} a 10^{-9} mol.L⁻¹ de cobre. Na concentração de 10^{-8} M de cobre houve o início do acúmulo de carboidratos e a concentração mais alta obtida foi na concentração mais alta utilizada de cobre, um resultados semelhante ao obtido para 5×10^{-8} mol.L⁻¹. Sob limitação de fosfato, Healey and Hendzel (1979) mostraram que o maior produto de estocagem produzido em células de *Synura uvella* foram os carboidratos. O estudo de Sultan et al (2006) com *Anabaena doliolum* concorda com nossos resultados de que o aumento de concentrações de Cu²⁺ aumentaram a concentração de carboidratos.

Apesar dos resultados deste estudo estarem de acordo com grande parte dos resultados da literatura, dois autores mostraram o inverso. Abd-El-Monem (1998) mostrou redução na concentração de carboidrato em células de *Scenedesmus spp.* em presença entre 1,0 e 2,0 mg.L⁻¹ de cobre e 1,0 e 10,0 mg.L⁻¹ de zinco. Tripathi and Gaur (2006) reportaram redução da concentração de proteínas, carboidratos e níveis de pigmentos fotossintéticos em *Scenedesmus sp* em relação ao início do experimento e à fase de recuperação. No entanto, e metodologia empregada pelos autores diferiu daquela usada neste trabalho, o que pode ter sido a responsável pela discrepância entre os resultados. Além disso, os autores não reportam os resultados da concentração de metal no forma do metal livre, dificultando ainda mais qualquer comparação, uma vez que a especiação do elemento é fundamental para a toxicidade de metais em microalgas.

A concentração de proteína por célula aumentou na concentração mais alta de cobre e mais baixa de fosfato, ou seja na situação extrema de nossos experimentos. Esses resultados estão de acordo com outros da literatura. Kilham et al (1997), mostrou haver aumento na concentração de proteína por célula em baixas concentrações de fosfato (de

$1,52 \times 10^{-5} \mu\text{g} \cdot \text{cel}^{-1}$ para $1,61 \times 10^{-5} \mu\text{g} \cdot \text{cel}^{-1}$). Einicker-Lamas et al. (2002), mostrou que elevadas concentrações de cobre ($0,22 \text{mM}$ de CuCl_2) resultaram em acúmulo de proteínas em *Euglena gracilis* em situações controle de fosfato. Alguns estudos, entretanto, mostraram diminuição no nível de proteínas como resultado do efeito tóxico de cobre e de outros metais em geral (Sultan et al. 2006; Tripathi and Gaur, 2009). Salientamos que os estudos citados e a grande maioria dos trabalhos da literatura utilizam concentrações de cobre mais altas (ordem de $10^{-9} \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ do metal total, já que a grande maioria não se refere à Cu^{2+} livre) do que as usadas nesta pesquisa (máximo de $5 \times 10^{-8} \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$). Esta diferença, entre a sub-letalidade e a letalidade pode ser a responsável pelos diferentes resultados.

Quanto à síntese de lipídios, é documentado na literatura que limitação por fosfato em células fitoplanctônicas resultam em aumento da síntese de lipídios. A provável explicação para este comportamento é a continuidade da síntese metabólica em situações de limitação do crescimento algal (Roessler, 1988; Lombardi and Wangersky, 1991; Van Mooy et al. 2009; Xin et al 2010; Deng et al 2011). No entanto, a produção de lipídios em situações de duplo estresse, por limitação de fosfato e excesso de cobre é pouco estudada. Nossos resultados mostraram um aumento de cerca de 300 vezes a concentração de lipídios totais por célula para a situação extrema analisada nesta pesquisa (mais baixo P e mais alto Cu) em relação à observada para células saudáveis em ambos os nutrientes. Einicker-Lamas et al. (2002) mostraram que a concentração total de lipídios por células aumentou cerca de 40% depois da exposição de *Euglena gracilis* à concentrações de Cu de $0,22 \text{mM}$ por 72 horas. Kilham et al. (1997), mostrou um aumento de 57% na síntese de lipídios totais em *Ankistrodesmus falcatus* submetida a $5 \mu\text{M}$ de fósforo.

Tripathi and Gaur (2006) reportaram que a quantidade total de lipídios em *Scenedesmus* sp. diminuiu com o aumento dos níveis de Cu. Gushina and Harwood (2006) reportaram que em situações saudáveis de crescimento, a adição de , Cu ou Pb foi responsável por uma redução na concentração total de lipídios em *Coccomyxa mucigena*.

Dentre as classes lipídicas analisadas, os hidrocarbonetos são compostos constituídos apenas por carbono e hidrogênio e são considerados, quando presentes na água do mar, um indicador de poluição. Entretanto, alguns organismos aquáticos são capazes de produzi-los em pequena quantidade (Qin, 2010). Nosso estudo mostrou que em situações estresse por fosfato ou estresse por cobre, houve um aumento da concentração de HC, mas de qualquer modo não ultrapassou os 3% do total de lipídios produzidos. Esses resultados estão de acordo com os de Lombardi e Wangersky (1991).

Os ésteres de cera (WE) não apresentaram tendência digna de nota para os vários tratamentos experimentais. Assim como os HC, a concentração de WE em geral manteve-se baixa, em torno dos 3% do total, chegando a um máximo de 16,2% do total de lipídios produzidos por *C. vulgaris*. Esses resultados estão de acordo com a maioria dos resultados da literatura para a produção de lipídios por microalgas (Goutx et al. 1990; Lombardi and Wangersky, 1991; Lombardi e Wangersky, 1995; Nelson et al. 2002a; Illias et al. 2009). Todos esses trabalhos mostram também que HC e WE não constituem classes de lipídios importantes quantitativamente nas microalgas. O aumento de WE, de cerca de 3% para 16.2% ocorreu no tratamento extremo, de menor P e maior Cu.

Os triglicerídeos são compostos formados por triésteres de glicerol (um álcool) e três longas cadeias de ácidos carboxílicos. Eles possuem diversas funções nos organismos, como isolantes térmicos, controladores de flutuação e ainda reserva energética. Em células de *C. vulgaris* saudáveis, a concentração de TAG ficou em torno de 1%, aumentando para 25% do total de lipídios produzidos quando a alga foi mantida sob condição de deficiência de fosfato. Sabe-se que a produção e estocagem de lipídios por células do fitoplâncton é regulada por fatores ambientais, como o estresse por nutrientes (Morris *et al.*, 1983; Parrish and Wangersky, 1987; Lombardi e Wangersky, 1991; 1995). Aumento da síntese de lipídios em situações de estresse em fosfato também foi obtido por Healey e Hendzel (1975) em células de *Scenedesmus quadricauda* sob severa limitação do nutriente e, por Lombardi e Wangersky (1991) que demonstraram um aumento significativo no TAG em *Chaetoceros gracilis* sob limitação de fosfato. Khozin-Goldberg e Cohen (2006) reportaram que na ausência de fosfato, a proporção de TAG aumentou de 6,5 para 39,3% em *Monodus subterraneus*.

No entanto, a interação de fatores ambientais na produção de lipídios tem sido pouco investigada. Nossos experimentos mostraram que quando foi aplicado estresse de fosfato (10^{-6} mol.L⁻¹) e de cobre em concentração sub-letal de 5×10^{-8} mol.L⁻¹ simultaneamente, a produção de TAG aumentou 100 vezes. Isto equivale a cerca de 2,5 vezes mais TAG do que quando a célula estava apenas sob a deficiência de fosfato, que por sua vez produziu 40 vezes mais TAG do que o controle. Análise estatística (PCA) mostrou que a concentração de TAG correlacionou de modo significativo e positivamente com a concentração de cobre e negativamente com a concentração de fosfato. Isto mostra que simultaneamente ao aumento do cobre e diminuição do fosfato, as concentrações de TAG aumentaram. Esses resultados estão de acordo com outros da literatura, que mostram que, para concentrações variáveis de fosfato, o efeito do cobre no acúmulo de lipídios de reserva

energética (TAG) é tanto mais severo quanto maior a concentração do metal (Gurr et al. 2002, Gushina and Harwood, 2006). Segundo Gushina and Harwood (2006), em altas concentrações de cobre, há uma preferência para o uso de diacilglicerol na formação de TAG, ao invés da produção de lipídios estruturais, o que poderia ter acarretado o aumento inesperado da concentração de TAG intracelular.

As concentrações de ácidos graxos livres (FFA) e de álcool alifático livre observadas durante o estudo foram em geral baixas, nem sempre sendo detectadas em nossas amostras de *C. vulgaris*. Nossos resultados estão de acordo com os observados em Lombardi e Wangersky (1991), que reportaram aproximadamente 1 a 2% de níveis de ALC e FFA em células de da diatomácea marinha *Chaetoceros gracilis* deficientes e saudáveis em fosfato e silicato.

Para a classe lipídica esterol (ST), observou-se pequeno aumento conforme diminuiu-se a concentração de fosfato. Este aumento foi salientado conforme aumentou-se a concentração de cobre no meio nutritivo, o que demonstra que a situação extrema também leva ao aumento da síntese de ST em *C. vulgaris*.

Os níveis de FFA, ALC e ST constituíram as menores porcentagens dos lipídios totais, o que indica que eles não fazem parte da maioria dos componentes de lipídios neutros do metabolismo celular. Sob estresse na microalga, ao invés dessas classes lipídicas, TAGs foram preferencialmente sintetizados. Esses resultados estão de acordo com os de Smith et al. 1993; Nelson et al. 2002b; Gushina and Harwood, 2006; Goutx et al. 2009).

Fosfolipídios, principais constituintes das membranas celulares e AMPL (classe de lipídios da qual faz parte a clorofila-a) constituem importante componentes dos lipídios algais. Esses lipídios eram, em geral, mais de 60% do total dos lipídios. Os lipídios polares móveis em acetona tenderam a aumentar com a diminuição de fósforo, um padrão seguido pelas concentrações de PL, os quais tiveram níveis aumentados com decréscimo de fosfato e acréscimo de íons de Cu^{2+} . Entretanto, qualquer redução de AMPL o fez em combinação com o aumento do Cu^{2+} , enquanto que a concentração de PL não esteve, necessariamente, associada ao cobre. Observamos neste estudo que AMPL foi afetado pela limitação fósforo e toxicidade de cobre. É importante notar que não houve alteração no tamanho das células de *Chlorella vulgaris* quando do aumento de AMPL nas situações de estresse por fósforo. Resultado similar foi observado em Lombardi & Wangersky (1991; 1995).

Sabe-se que o AMPL geralmente está relacionado com clorofila, uma vez que cerca de 50% de sua composição é constituída por este pigmento fotossintético (Parrish, 1986). Portanto, era esperado que houvesse diminuição na concentração desta fração lipídica, uma vez que houve redução na quantidade de clorofila. Entretanto, esse não foi o resultado obtido neste trabalho, o que sugere que a fração AMPL dos lipídios possui outros compostos além da clorofila.

Como esperado, a redução na concentração de fosfolipídios pode ter acontecido parcialmente devido à inibição da tomada de fosfato na presença de concentrações sub-letais e tóxicas de Cu^{2+} e também pela própria limitação do P. Comportamento similar, de redução de PL em deficiência de P e aumento de sua produção em situações saudáveis foram reportadas para outras microalgas: *M. subterraneus* (Khozin-Goldberg and Cohen, 2006); *Chaetoceros gracilis* (Lombardi and Wangersky, 1991); e *Chlorella vulgaris* (Scarsella et al. 2010).

Scarsella et al (2010) mostraram que combinando mais de um fator de estresse, a concentração de lipídios polares de *C. vulgaris* foi reduzida de 60% para cerca de 20% utilizando-se tanto culturas heterotróficas como mixotróficas. Esses valores são bem mais baixos do que aqueles obtidos neste estudo, possivelmente pela natureza das culturas utilizadas, assim como a natureza do estresse aplicado, uma vez que a quantificação de lipídios para limitação de fósforo foi feita sempre em conjunto com uma limitação de nitrogênio.

Relações entre os diferentes parâmetros observados foram confirmados utilizando uma análise de componentes principais. O primeiro e o segundo componentes da PCA explicaram mais de 50% da variação total dos dados. As concentrações de fósforo foram correlacionadas negativamente com TAG ($p < 0,05$), proteínas e carboidratos por célula. O fósforo foi significativamente associado de modo positivo com clorofila-a, densidade de células, AMPL e biomassa seca. Os íons cobre livres foram positivamente correlacionados com TAG, carboidratos e SE/WE e negativamente correlacionados com todos os outros parâmetros determinados, todos com $p < 0,05$.

6. Conclusões

Este estudo mostrou que a concentração de fósforo no meio de cultura tem uma influência direta na toxicidade do cobre para *Chlorella vulgaris* e essa influência pode ser vista em diversos parâmetros, tanto de biomassa quanto de composição bioquímica. Quando a concentração de fósforo é baixa, a toxicidade do cobre aumenta e isto causa uma diminuição nesses parâmetros. Os resultados foram confirmados pelo EC50.

Além disso, mostramos que a determinação do Cu livre é importante para estudos ecotoxicológicos, uma vez que é a espécie responsável pelo efeito tóxico.

A síntese de lipídios em *C. vulgaris* foi grandemente estimulada em situações de limitação de P e sub-letalidade de cobre. Os lipídios totais tiveram um aumento de mais de 300% na situação de maior estresse, enquanto TAG aumentou em mais de 100% na mesma situação. As classes lipídicas HC, FFA, ALC, WE e ST possuíram baixo percentual em relação ao total de lipídios produzidos.

A síntese de proteínas e carboidratos foi em geral aumentada em situações de aumento da concentração de cobre, assim como diminuição de fósforo. As proteínas, na situação de mais alto cobre e mais baixo fosfato obtiveram um aumento de 150 vezes, enquanto nos carboidratos, esse aumento foi de 100 vezes.

O efeito desses dois fatores (fosfato e cobre) também interagem entre si ($p < 0,05$) de acordo com a análise fatorial de variância. Essas interações foram depois confirmadas multivariadamente usando PCA que mostrou que os dois parâmetros apresentam relações antagônicas entre si. Isso significa que na presença de concentrações repletas de fósforo, a toxicidade do cobre é diminuída significativamente ($p < 0,05$).

7. Referências Bibliográficas

- ABD-EL-MONEM H.M.; CORRADI M.G.; GORBI G. Toxicity of copper and zinc to two strains of *Scenedesmus acutus* having different sensitivity to chromium. **Environmental and Experimental Botany** v40, p.56-66, 1998.
- ANDRADE, S.; PULIDO, M.J.; CORREA, J.A.; The effect of organic ligands exuded by intertidal seaweeds on copper complexation. **Chemosphere**, v.78, p.397-401, 2010.
- BRASIL. Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA). Resolução nº003, 1990.
- BRADFORD M. A rapid and sensitive method for the quantization of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 243-254 1976.
- BABICH H.; STOTZKY G. Heavy metal toxicity to microbe-mediated ecologic processes: a review and potential application to regulatory policies. **Environmental Research**, v. 36, número1, p. 111-137, 1985.
- BRULAND, K.W.; DONAT, J.R; HUTCHINS D.A. Interactive influences of bioactive trace metals on biological production in oceanic waters. **Limnol. Oceanogr.**, v. 36, número 8, p.1555-1577, 1991.
- BUFFLE, J.; DE VITRE, R.R., 1993. **Chemical and Biological Regulation of Aquatic Systems**. CRC Press, Inc., Boca Raton, pp. 43–88.
- CASIRAGHI, M.P.; LUPORINI, S.; SILVA, E.M. Uptake of cadmium by *Pseudokirchneriella supracapitata*. **Braz. arch. biol. technol.**, vol. 48, número 6, p.1027-1034, 2005.
- CEMBELLA, A. D.; ANTIA, N. J.; HARRISON, P. J. The utilization of inorganic and organic phosphorus compounds as nutrients by eukaryotic microalgae: A multidisciplinary perspective. Part 1. **Crit. Rev. Microbiol.**, v. 10, p. 317–391, 1984.
- CHAKRABORTY, P.; BABU, P.V.R.; ACHARYYA, T.; BANDYOPADHYAY, D. Stress and toxicity of biologically important transition metals (Co, Ni, Cu and Zn) on phytoplankton in a tropical freshwater system: An investigation with pigment analysis by HPLC. **Chemosphere**, v. 80, p. 548-553, 2010.
- CETESB. **Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental**. www.cetesb.sp.gov.br
- CURRIE, D.J.;KALFF, J. The relative importance of bacterioplankton and phytoplankton in phosphorus uptake in freshwater. **Limnol. Oceanogr.**, v. 29, p. 311-321, 1984.
- EINICKER-LAMAS M.; MEZIAN G.A.; FERNANDES T.B.; SILVA F.L.S.; GUERRA F.; MIRANDA K.; ATTIAS M.; OLIVEIRA M.M. *Euglena gracilis* as a model for the study of Cu²⁺ and Zn²⁺ toxicity and accumulation in eukaryotic cells. **Environmental Pollution** v. 120, p. 779-786, 2002.

FALKOWSKI P.G.; RAVEN J.A. in **Aquatic Photosynthesis**. Blackwell Science, Malden, MA. 1997.

FATTI A.A.; ZAKI F.T.; IBRAHEIM H.A.. Response of tolerant and wild type of strains of *Chlorella vulgaris* to copper with special references to copper uptake system. **Protistology**, v. 4, número1, p. 73-78, 2005.

FRANKLIN, M.N., STAUBER, J.L., MARKICH, S.J., LIM, R.P. pH-dependent toxicity of copper and uranium to a tropical freshwater alga (*Chlorella* sp.). **Aquatic Toxicology** v. 48, p. 275-289, 2000.

GUSCHINA, I.A., HARWOOD, J.L. Lipids and lipid metabolism in eukaryotic algae. **Progress in lipid research**, v.45, p. 160-186, 2006.

GOUTX M., GÉRIN C., BERTRAND J. C. An application of Iatroscan thin-layer chromatography with flame ionization detection – Lipids classes of microorganisms as biomarkers in the marine environment. **Organic Geochemistry** v.16, p. 1231-1237, 1990.

GOUTX M., GUIGUE C., ARITIO D., GHIGLIONE J., PUJO-PAY M., ANDERSEN V. Short term variability of dissolved lipid classes during summer to autumn transition in the Ligurian sea (NW Mediterranean). **Biogeosciences Discussions** v. 6, p. 27-69, 2009.

GUILLARD R.R.L.;LORENZEN C.J. Yellow-green algae with chlorophyllide *c*. **J. Phycology**, v. 8, p. 10-14, 1972.

GURR, M.I., HARWOOD, J.L., FRAYN, K.N. **Lipid Biochemistry: An Introduction**, fifth ed. Blackwells Scientific, Oxford , 2002.

GUSHINA I.A.; HARWOOD J.L. Lead and copper effects on lipid metabolism in cultured lichen photobionts with different phosphorus status. **Phytochemistry** v. 67 p.1731-1739, 2006.

HALL J.; HEALEY F.P.; ROBINSON G.G.C., The interaction of chronic copper toxicity with nutrient limitation in two chlorophytes in batch culture. **Aquat. Toxicol.**, v. 14, p. 1–14, 1989.

HEALEY, F. P.; HENDZEL, L. L. Fluorometric measurement of alkaline phosphatase activity in algae. **Freshwater Biology**, v. 9, p.429–439. 1979.

ILLIJAS M.I.; INDY J.R.; YASUI H.; ITABASHI Y. Lipid class and fatty acid composition of a little-known and rarely collected alga *Exophyllum wentii* Weber-van Bosse from Bali Island, Indonesia. **Journal of Oleo Science**. v. 58 número 3, p. 103-110, 2009.

JI Y.; SHERRELL R.M. Differential effects of phosphorus limitation on cellular metals in *Chlorella* and *Microcystis*. **Limnol. Oceanogr.**, v. 53 número 5, p. 1790-1804, 2008.

KHOZIN-GOLDBERG, I.; COHEN, Z. The effect of phosphate starvation on the lipid and fatty acid composition of the fresh water eustigmatophyte *Monodus subterraneus*. **Phytochemistry** v. 67, p. 696-701, 2006.

KILHAM S.S.; KREEGER D.A.; GOULDEN C.E.; LYNN S.G. Effects of nutrients limitation on biochemical constituents of *Ankistrodesmus falcatus*. **Freshwater Biology**, v. 38, p. 591-596, 1997.

KOLA, H.; WILKINSON, K.J. Cadmium uptake by a green alga can be predicted by equilibrium modeling. **Environmental Sci. Technol**, v.39, p. 3040-3047. 2005

KOVÁČIK, J.; KLEJDUS, B.; HEDBAVNY, J.; BACKOR, M. Effect of copper and salicylic acid on phenolic metabolites and free amino acids in *Scenedesmus quadricauda* (Chlorophyceae). **Plant Science**, v. 178, p. 307-311, 2010.

LIU, D.; WONG, P.T.S.; DUTKA, B.J. Determination of Carbohydrate in Lake Sediment by a modified Phenol-Sulfuric acid method. **Water Research**, v. 7, p. 741-46, 1973.

LOMBARDI, A.T.; WANGERSKY, P. Influence of phosphorus and silicon on lipid class production by the marine diatom *Chaetoceros gracilis* grown in turbidostat cage cultures. **Marine Ecology Prog. Ser.**, v. 77, p. 39-47, 1991.

LOMBARDI A.T.; WANGERSKY P. Particulate lipid class composition of three marine phytoplankters *Chaetoceros gracilis*, *Isochrysis galbana* (Tahiti) and *Dunaliella tertiolecta* grown in batch culture. **Hydrobiologia**, v. 306, p. 1-6, 1995.

LOMBARDI, A.T.; VIEIRA A.A.H.; SARTORI, L.A. Mucilaginous capsule adsorption and intracellular uptake of copper by *Kirchneriella aperta* (Chlorococcales). **J. Phycology**, v. 38, p. 332-337, 2002.

LOMBARDI, A.T.; HIDALGO, T.R.M.; VIEIRA A.A.H. Copper complexing properties of dissolved organic materials exuded by the freshwater microalgae *Scenedesmus acuminatus*. **Chemosphere**, v. 60, p. 453-459, 2005.

LOMBARDI A.T.; HIDALGO T.M.R.; VIEIRA A.A.H.; SARTORI A.L. Toxicity of ionic copper to the freshwater *Secenedesmus acuminatus* (Chlorophyceae, Chlorococcales). **Phycologia**, v. 46, número 1, p. 74-78, 2007.

MORRIS, R. J.; MCCARTNEY, M. J.; ROBINSON, G. A. Studies of a spring phytoplankton bloom in an enclosed experimental ecosystem. 1. Biochemical changes in relation to the nutrient chemistry of water. **J. exp. mar. Biol. Ecol.**, v. 70, p. 249-262, 1983.

MUTLU Y.B.; ISIK O.; USLU L.; KOÇ K.; DURMAZ Y. The effects of nitrogen and phosphorus deficiencies and nitrite addition on the lipid content of *Chlorella vulgaris* (Chlorophyceae). **African Journal of Biotechnology**, v.10, número 3, p. 453-456, 2011.

NALEWAJKO C.; OLAVESON M.M.. Differential responses of growth, photosynthesis, respiration, and phosphate uptake to copper in copper-tolerant and copper-intolerant strains of *Scenedesmus acutus* (Chlorophyceae). **Canadian J. Bot.**, v. 73, p. 1295-1303, 1994.

NELSON M.M.; PHLEGER C.F.; NICHOLS P.D. Seasonal lipid composition in macroalgae of the northeastern, **Pacific Ocean. Botanica Marina**, v. 45, p. 58-65, 2002a.

NELSON M.M.; LEIGHTON D.L.; PHLEGER C.F.; NICHOLS P.D. Comparison of growth and lipid composition in the green abalone, *Haliotis fulgens*, provided specific macroalgal diets. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B**, v. 131 p. 695-712, 2002b.

NOGUEIRA, P.F.M., MELÃO M.G.G., LOMBARDI A.T., NOGUEIRA, M.M., VIEIRA, A.A.H. The effects of *Anabaena spiroides* exopolysaccharides on copper accumulation in an aquatic food chain. **Aquatic Toxicology** 93, 125-130, 2009.

ODUM, E.P. in **Ecologia**. Guanabara Koogan, 1a ed., 437p, Rio de Janeiro. RJ. 1983.

PARRISH, C.C., **Dissolved and particulate lipid classes in the Aquatic Environment**. PhD Thesis. Dalhousie University, Halifax. Canada. 1986.

PARRISH, C.C., 1999. **Determination of total lipid, lipid classes, and fatty acids in aquatic samples**. In **Lipids in freshwater ecosystems** ed. M.T. Arts and B.C. Wainman, p. 4-20. New York: Springer-Verlag.

PARRISH, C. C.; WANGERSKY, P. J. Particulate and dissolved lipid classes in cultures of *Phaeodactylum tricoratum* grown in cage culture turbidostats with a range of nitrogen supply rates. **Mar. Ecol. Prog. Ser** v. 35 p. 119-128, 1987.

PISTOCCHI, R.; GUERRINI, F.; BALBONI, V.; BONI, L. Copper toxicity and carbohydrate production in the microalgae *Cylindrotheca fusiformis* and *Gymnodinium* sp. **European Journal of Phycology**, v. 32, p. 125-132, 1997.

PISTOCCHI, R.; MORMILLE, M.A.; GUERRINI, F.; ISANI, G.; BONI, L. Increased production of extra and intracellular metal-ligands in phytoplankton exposed to copper and cadmium. **J. Appl. Phycol.**, v. 12, p. 469-477, 2000.

QIAN, H.; LI, J.; SUN, L.; CHEN, W.; SHENG, G.D.; LIU, W.; FU, Z. Combined effect of copper and cadmium on *Chlorella vulgaris* growth and photosynthesis-related gene transcription. **Aquatic Toxicology**, v. 94, p. 56-61, 2009.

QIN, J.G. in TIMMIS, K.N. **Handbook of hydrocarbon and lipid microbiology**. Springer Part 26. 2010.

RAUSCH, T. The estimation of micro-algal protein content and its meaning to the evaluation of algal biomass I. **Hidrobiologia** ,v. 78, p. 237-251, 1981.

RICKLEFS, R.E. in **A economia da natureza**. Guanabara Koogan, 1a ed., 327p, Rio de Janeiro. RJ. 2003.

RIJSTENBIL, J.W.; DEHAIRS, F.; EHRLICH, R.; WIJNHOLDS, J.A. Effect of the nitrogen status on copper accumulation and pools of metalbinding peptides in the planktonic diatom *Thalassiosira pseudonana*. **Aquat. Toxicol.**, v. 42, p. 187-209, 1998.

RITTER, A., GOULITQUER, S., SALAÜN, J.P., TONON, T., CORREA, J.A., POTIN, P. Copper stress induces biosynthesis of octadecanoid and ecosanoid oxygenated derivatives in the brown algal kelp *Laminaria digitata*. **New Phytologist**, v. 180, p. 809-821, 2008.

ROESSLER, P.G. Effects of silicon deficiency on lipid composition and metabolism in the diatom *Cyclotella cryptica*. **J. Phycol.**, v. 24, p. 394-400, 1988.

RODGHER, S.; LOMBARDI, A.T.; MELÃO, M.G.G.; Evaluation of the life cycle parameters of *Ceriodaphnia silvestrii* submitted to 36 days dietary copper exposure. **Ecotoxicol. Environ. Safety**, v.72, número 6, p. 1748-1753, 2009

RODGHER, S.; ESPÍNDOLA, E.L.G. The influence of algal densities on the toxicity of chromium for *Ceriodaphnia dubia* Richard (Cladocera, Crustacea). **Brazilian Journal of Biology**, v 68, número2, p. 341-348, 2008.

RODRIGUES, L.H.R.; ARENZON, A.; RAYA-RODRIGUEZ, M.T.; FONTOURA, N.F. Avaliação da sensibilidade de *Raphidocelis subcapitata* (Chlorococcales, Chlorophyta) ao sulfato de cobre e sulfato de zinco através de ensaios de toxicidade crônica. **Biociências**, v. 11 número 2, p. 137-144, 2008.

Companhia de Saneamento do Paraná. **SANEPAR**. www.site.sanepar.com.br

SCARSELLA M.; BELOTTI G.; DE FILIPPIS P.; BRAVI M. Study on the optimal growing conditions of *Chlorella vulgaris* in bubble column photobioreactors. **Chemical Engineering Transactions** v. 20, p. 85-91, 2010.

SCHINDLER, D.W.; HECKY, R.E.; FINDLAY, D.L.; STANTON, M.P.; PARKER, B.R.; PATERSON, M.J.; BEATY, K.G.; LYNG, M.; KASIAN S.E.M. Eutrophication of lakes cannot be controlled by reducing nitrogen input: Results of a 37-year whole-ecosystem experiment. **PNAS** v. 105, número 32, p 11254-11258, 2008.

SCHREIBER, U.; QUAYLE P.; SCHMIDT S.; ESCHER, B.I.; MUELLE, J. F. Methodology and evaluation of a highly sensitive algae toxicity test based on multiwell chlorophyll fluorescence imaging. **Biosensors and Bioelectronics** v. 22, número 11, p. 2554-2563, 2007.

SERRA, A.; GUASCH, H.; ADMIRAAL, W.; VAN BEUSEKOM, S.A.M.; VAN DER GEEST, H.G. Influence of phosphorus on copper sensitivity of fluvial periphyton : the role of chemical, physiological and community-related factors. **Ecotoxicology**, v. 19, p. 770-780, 2010.

SHOAF W.T.; LIUM B.W. Improved extraction of chlorophyll a and b from algae using dimethyl sulfoxide. **Limnol. Oceanogr.**, v. 21, p. 926-928, 1976.

SŁOWIK, J.; PAWLACZYK-SZPIŁOWA M. Interaction between *Scenedesmus obliquus* and the Heavy Metals Copper and Lead. **Acta hydrochimica et hydrobiologica.**, v. 7, número 5, p. 503-509, 1979.

SMITH R.E.H.; CAVALETTO J.F.; EADIE B.J.; GARDNER W.S. Growth and lipid composition of high Arctic ice algae during the spring bloom at Resolute, Northwest Territories, Canada. **Marine Ecology Progress Series** v. 97, p19-29, 1993.

SULTAN P.; SHAH M.I.; WILLIAMS P.; ARIF J.; AHMAD N. Biochemical basis of heavy metal induced stress tolerance in the N₂ fixing cyanobacterium *Anabaena doliolum*. **African Journal of Clinical and Experimental Microbiology** v. 8, número 1, p. 8-22, 2006.

TRIPATHI B.N.; GAUR J.P. Physiological behavior of *Scenedesmus* sp. during exposure to elevated levels of Cu and Zn and after withdrawal of metal stress. **Protoplasma** v. 229, p.1-9, 2006.

VAN MOOY, B.A.S.; FREDRICKS, H.L.; PEDLER, B.E.; DYHRMAN, S.T.; KARL, D.M.; KOBLÍEK, M.; LOMAS, M.W.; MINCER, T.J.; MOORE, L.R.; MOUTIN, T.; RAPPÉ, M.S.; WEBB, E.A. Phytoplankton in the ocean use non-phosphorus lipids in response to phosphorus scarcity. **Nature**, v. 458, p. 69-72, 2009.

VAUX, P. D.; PAULSON, L. J.; AXLER, R. P.; LEAVITT, S. The water quality implications of artificially fertilizing a large desert reservoir for fisheries enhancement. **Water Environ. Res.**, v. 67, número 2, p. 189-200, 1995.

VERMA S.K.; SINGH R.K.; SINGH S.P. Copper toxicity and phosphate utilization in the cyanobacterium *Nostoc calcicola*. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology** v. 50, p. 192–198, 1993.

WANG, W.X.; DEI, R.C.H. Metal stoichiometry in predicting Cd and Cu toxicity to a freshwater green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. **Environ. Pollut.**, v. 142, p. 303–312, 2006.

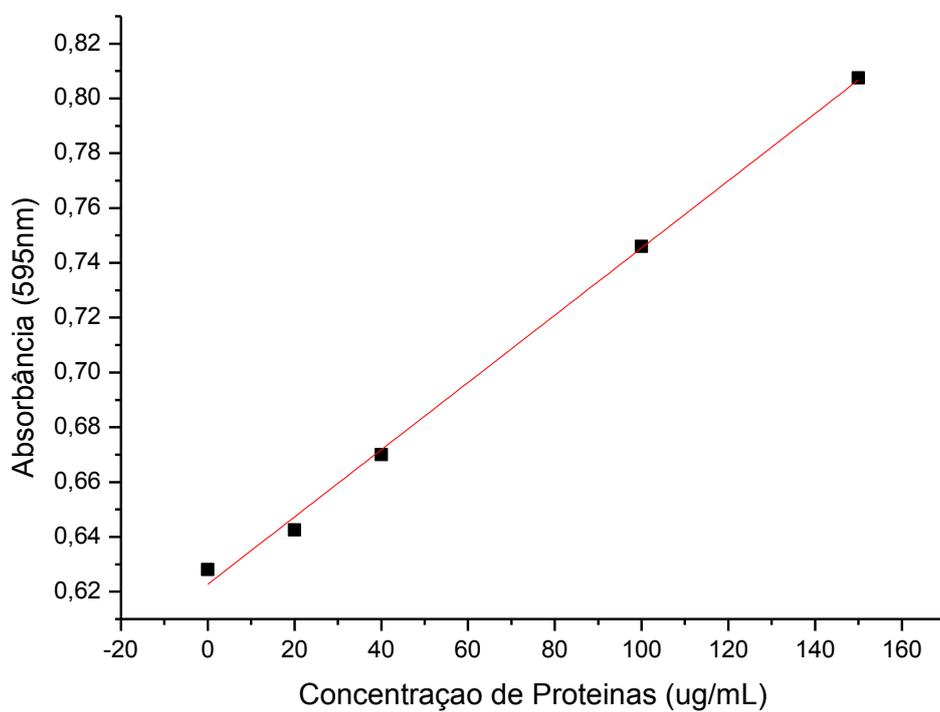
WETZEL, R.G. 2001. **Limnology: Lake and River Ecosystems**, 3rd ed. Academic Press

XIN, L.; KE, G.; YING-XUE, S. Effects of different nitrogen and phosphorus concentrations on the growth, nutrient uptake, and lipid accumulation of a freshwater microalga *Scenedesmus* sp. **Bioresource Techn.**, v. 101, número 14, 5494-5500, 2010.

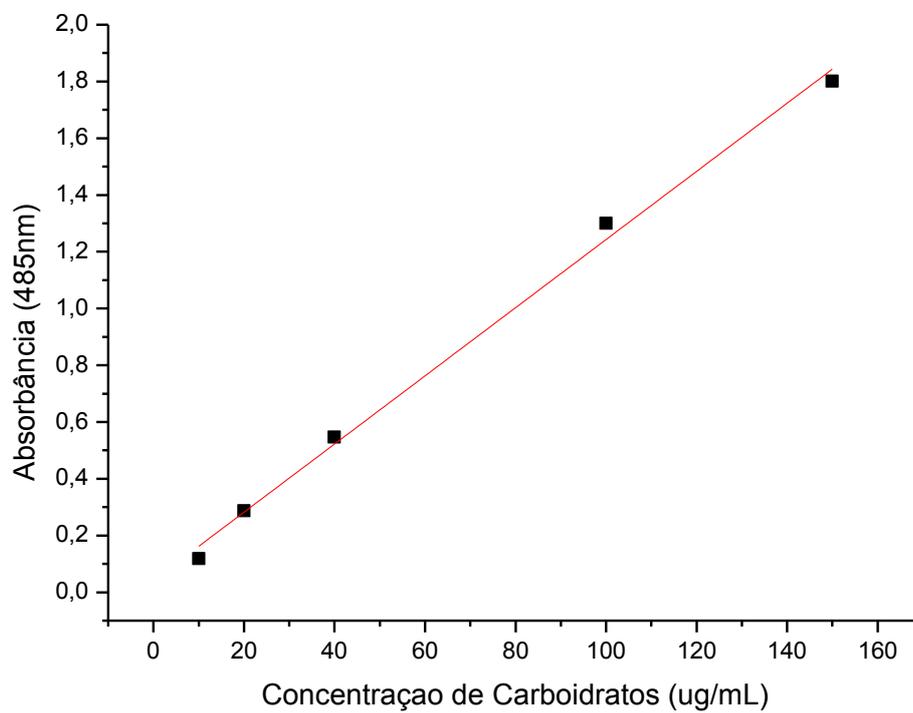
YTREBERG, E.; KARLSSON, J.; HOPPE, S.; EKLUND, B.; NDUNGU, K. Effect of Organic Complexation on Copper Accumulation and Toxicity to the Estuarine Red Macroalga *Ceramium tenuicorne*: A Test of the Free Ion Activity Model. **Environ. Sci. Tech.**, v. 45, p. 3145-3153, 2011.

ZAKI F.T. & FATHI A.A.. Impact of copper on some physiological aspects of *Nostoc muscorum* with special references to the detoxifying role of calcium. **Acta botanica hungarica**, v. 46, números 3 e 4, p. 423-433, 2004.

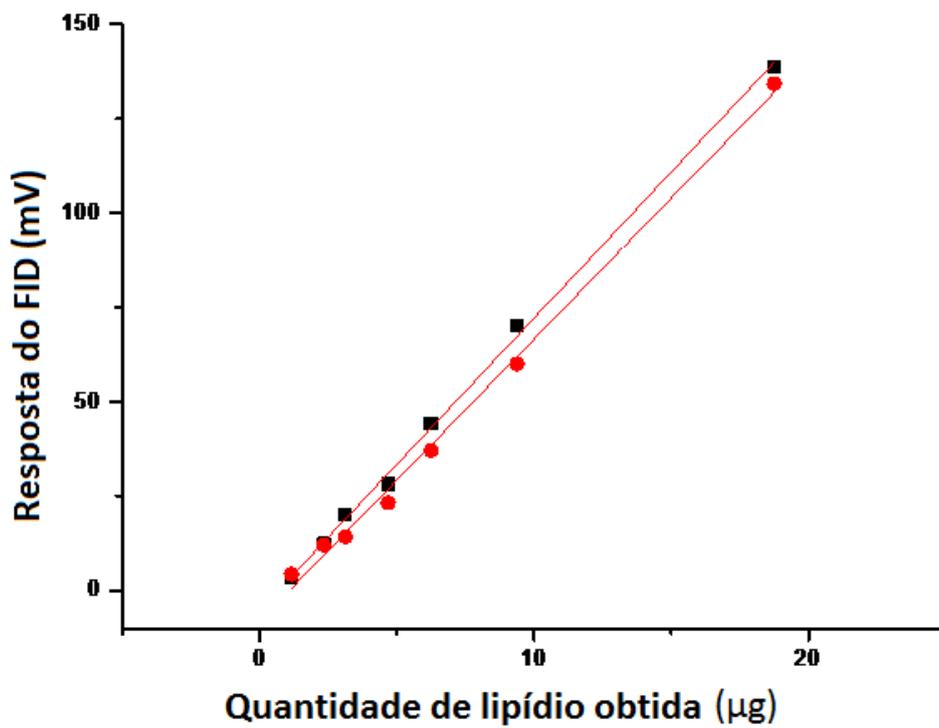
APÊNDICE A – Curva de calibração para concentração de proteínas ($\mu\text{g/L}$). A reta de regressão obtida foi: $y = 0,62 + 0,001x$. O ajuste (R^2) foi de 0,997.



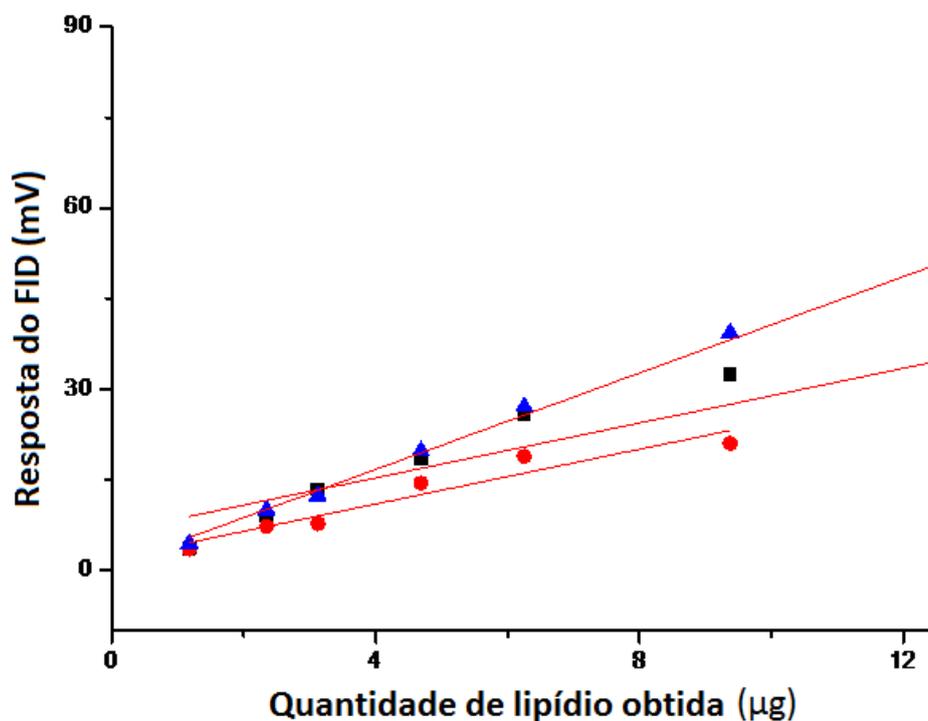
APÊNDICE B – Curva de calibração para concentração de carboidratos ($\mu\text{g/L}$). A reta de regressão obtida foi: $y = 0,042 + 0,012x$. O ajuste (R^2) foi de 0,995.



APÊNDICE C – Curvas de calibração para diferentes concentrações (μg) de ST e PL. ■ representa as concentrações de ST. A reta de regressão obtida foi: $y = -5,24 + 7,75x$. ● representa as concentrações de PL. A regra de regressão obtida foi: $y = -8,14 + 7,48x$. O ajuste (R^2) para ambas as curvas foi de 0,998 e 0,996, respectivamente.



APÊNDICE D – Curvas de calibração para diferentes concentrações (μg) de TG e FFA e AMPL. ■ representa as concentrações de TG. A reta de regressão obtida foi: $y = 6,23 + 2,27x$. ● representa as concentrações de FFA. A regra de regressão obtida foi: $y = 1,82 + 2,27x$. ▲ representa as concentrações de AMPL. A regra de regressão obtida foi: $y = 0,72 + 3,99x$. O ajuste (R^2) para as curvas foi de 0,895, 0,905 e 0,998 respectivamente.



APÊNDICE E – Curvas de calibração para diferentes concentrações (μg) de HC e WE e KET. ■ representa as concentrações de HC. A reta de regressão obtida foi: $y = -1,50 + 4,57x$. ● representa as concentrações de WE. A regra de regressão obtida foi: $y = -3,76 + 5,30x$. ▲ representa as concentrações de KET. A regra de regressão obtida foi: $y = -2,77 + 4,62x$. O ajuste (R^2) para as curvas foi de 0,998, 0,999 e 0,998 respectivamente.

