**UNIVERSIDADE SANTA CECÍLIA**
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SUSTENTABILIDADE DE ECOSSISTEMAS COSTEIROS E MARINHOS**
**MESTRADO EM ECOLOGIA**

**LUIZ CARLOS LEITE**

# DESVIOS DE QUANTIFICAÇÃO E AVALIAÇÃO ECOTOXICOLÓGICA DE COMPOSTOS FENÓLICOS EM RELAÇÃO ÀS RESOLUÇÕES DO CONSELHO NACIONAL DE MEIO AMBIENTE (CONAMA)

**Santos/SP**
**2013**

**LUIZ CARLOS LEITE**

# DESVIOS DE QUANTIFICAÇÃO E AVALIAÇÃO ECOTOXICOLÓGICA DE COMPOSTOS FENÓLICOS EM RELAÇÃO ÀS RESOLUÇÕES DO CONSELHO NACIONAL DE MEIO AMBIENTE (CONAMA)

Dissertação apresentada à Universidade Santa Cecília como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre no Programa de Pós-graduação em Sustentabilidade de Ecossistemas Costeiros e Marinhos, sob a orientação do Prof. Dr. Camilo Dias Seabra Pereira e do Prof. Dr. Silvio José Valadão Vicente.

**Santos/SP**
**2013**

**DESVIOS DE QUANTIFICAÇÃO E AVALIAÇÃO ECOTOXICOLÓGICA DE COMPOSTOS FENÓLICOS EM RELAÇÃO ÀS RESOLUÇÕES DO CONSELHO NACIONAL DE MEIO AMBIENTE (CONAMA)**

**Dissertação apresentada à Universidade Santa Cecília como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre no Programa de Pós-graduação em Sustentabilidade de Ecossistemas Costeiros e Marinhos**

Data da aprovação: ____/____/____

Banca Examinadora

_____

Prof. Dr. Camilo Dias Seabra Pereira
Orientador

_____

Prof. Dr. Silvio José Valadão Vicente
Co-Orientador

_____

Profa. Dra. Rocio Pilar Antón Martín

_____

Prof. Dr.Aldo Ramos Santos

Autorizo a reprodução parcial ou total deste trabalho, por qualquer que seja o processo, exclusivamente para fins acadêmicos e científicos.

Leite, Luiz Carlos.
Desvios de quantificação e avaliação ecotoxicológica de Compostos fenólicos em relação às resoluções do conselho nacional de meio ambiente (CONAMA)/Luiz Carlos Leite.2013.
51p.

Orientador: Camilo Dias Seabra Pereira
Coorientador: Silvio José Valadão Vicente

Dissertação de Mestrado - Universidade Santa Cecília,
Programa de Pós-Graduação em Sustentabilidade de
Ecossistemas Costeiros E Marinhos
Mestrado Em Ecologia, Santos,SP, 2013.

1. Ecotoxicologia. 2. fenóis. 3. riscos ecológicos.
4. Resoluções CONAMA.
I. Pereira, Camilo Seabra, orient. II. Vicente, Silvio José Valadão, coorient. III. Título.

Elaborada pelo SIBi – Sistema Integrado de Bibliotecas - Unisanta

## DEDICATÓRIA

*Ao meu pai, Cícero dos Anjos Leite, paisagista e ecologista por prática e conhecimento, que sempre esteve presente incentivando os meus estudos e acreditando em mim, e fazendo-me acreditar, ensinando-me a lutar, mesmo nos momentos mais difíceis das nossas vidas, fazendo-me entender sua filosofia de um vencedor, e respeitar a vida e ser participativo.*

*À minha mãe, Lídia Figueiredo Leite,*
*socióloga na prática e humanista no viver por que me transmitiu seus conhecimentos, atitudes, se dedicou a minha vida, proporcionou-me ter os estudos, dando-me educação, o carinho de uma família, ensinou-me amar, respeitar as pessoas a compreender e preservar o meio ambiente.*

## AGRADECIMENTOS

Aos meus orientadores Prof. Dr. Camilo Dias Seabra Pereira e Prof. Dr. Silvio José Valadão Vicente pela confiança, conhecimentos, a amizade , o carinho, o apoio, incentivo e dedicação nos momentos importantes e necessários no desenvolvimento deste trabalho.

Aos Professores MSc. Fernando Sanzi Cortez e Fábio Pusceddu pelas importantes orientações, conhecimentos, acompanhamento e orientação no laboratório de Ecotoxicologia, colaborando para o desenvolvimento e a qualidade final dos trabalhos práticos e sugerindo algumas pesquisas desenvolvidas.

À minha esposa, Professora Márcia Martins, pelo incentivo, carinho, participação nas pesquisas, colaborando no desenvolvimento e na formatação gráfica deste trabalho.

*“A distância que nos separar nos caminhos da vida é o aprender e o ensinar. O ensinar nos faz mestres e o aprender nos transforma em sábios.”*

Lidia Figueiredo Leite

## RESUMO

Compostos fenólicos são substâncias de difícil degradação natural, o que os torna persistentes no ambiente e, consequentemente, passíveis de bioacumulação e efeito adverso na biota exposta. A legislação vigente estipula o limite de 0,5 mg/L para os compostos fenólicos, mas este valor não diferencia compostos de baixa e alta toxicidade. Adicionalmente, o método quantitativo preconizado utiliza o fenol como padrão único, o que pode resultar em erros analíticos significativos, dependendo do composto fenólico avaliado. Nesse contexto, este trabalho teve como objetivo avaliar comparativamente a toxicidade de alguns compostos fenólicos e verificar os desvios nas suas determinações quantitativas, em situações não previstas nas Resoluções do CONAMA. Ensaios de laboratório utilizando o ácido gálico, ácido cafêico, fenol, para-cresol e Triclosan mostraram que os desvios analíticos podem chegar a 440 % ,muito além do aceitável para ensaios ambientais. Ao mesmo tempo, os testes de toxicidade utilizando embriões de ouriço-do-mar conforme a norma NBR 15.350 demonstraram efeitos adversos em concentrações menores que 0,5 mg/L e diferenças significativas na toxicidade dos compostos avaliados. A comparação da toxicidade dos compostos avaliados e a verificação dos desvios nas suas determinações quantitativas, em situações não previstas nas Resoluções CONAMA, demonstram o atual risco ecológico desses compostos em ecossistemas aquáticos e sugerem a necessidade de revisão dos atuais limites de lançamentos, que poderiam regular individualmente os compostos fenólicos com concentrações de efeitos tóxicas conhecidas.



**Palavras-chave:** Ecotoxicologia, fenóis, riscos ecológicos, Resoluções CONAMA.

## ABSTRACT

Phenolic compounds are substances that present long-time biodegradation, persisting in the environment and, consequently, able to accumulate and produce adverse effects in the exposed biota. According to the Brazilian legislation, the limit for phenolic compounds disposal is 0.5 mg/L, but this limit do not consider individual compounds with higher or lower toxicity. Additionally, the recommended analytic method indicates phenol as the unique standard and this can result in significant analytical errors, depending on the evaluated phenolic compound. In this context, this study aimed to evaluate the toxicity of different phenolic compounds and to verify the deviations in their quantitative determinations, facts no anticipated in the CONAMA Resolutions. Laboratory tests using gallic acid, caffeic acid, phenol, p-cresol and Triclosan showed that analytical deviation could be as high as 440 %, far above the acceptable limits for environmental assays. At the same time, toxicity tests using sea-urchins' embryos according to the procedure NBR 15.350 showed significant toxicity of the mentioned compounds in concentrations lower than 0,5 mg/L. A comparison of the compounds toxicity and the deviations in their quantitative determinations in situations not covered by CONAMA, demonstrate the current ecological risk of these compounds in aquatic ecosystems, and suggest the need to revise the limits of input, which could individually regulate phenolic compounds with known concentrations of toxic effects.



**Keywords:** Ecotoxicology, phenols, ecological risks, CONAMA Resolutions.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES


Fig. 1 - Distribuição das águas no planeta Terra 16

Fig. 2 – Rotas de entrada de compostos fenólicos para ecossistemas aquáticos. 18

Fig. 3 - Fórmula estrutural plana do fenol 19

Fig. 4 – Fórmula estrutural plana do ácido cafêico 21

Fig. 5 – Fórmula estrutural plana do ácido gálico 23

Fig. 6 – Fórmula estrutural plana do ácido para-cresol 25

Fig. 7 – Fórmula estrutural plana do ácido triclosan 27

Fig. 8 – Modelo geral no desenvolvimento de análises ecotoxicológicas 30

Fig. 9 - Reação química da 4-aminoantipirina na determinação dos compostos fenólicos. 38

Fig.10 -Exemplar adulto de ouriço-do-mar (*Lytechinus variegatus*) 38

Fig.11- Coleta de gametas masculinos (esquerda) e femininos (direita) de ouriços- do-mar. 39

Fig.12 -Larvas plúteos com desenvolvimento normal (a) e anômalo (b) e (c). 40

Fig. 13 Gráfico de absorbância versus concentração dos compostos de interesse, suas equações e respectivos coeficientes de explicação 42

## LISTA DE QUADROS


Q. 1 Algumas propriedades do fenol 20
Q. 2 Algumas propriedades do ácido cafeico 21
Q. 3 Algumas propriedades do ácido gálico 23
Q. 4 Algumas propriedades do para-cresol 25
Q. 5 Algumas propriedades do triclosan 27
Q. 6 Definições de alguns termos da Resolução CONAMA N° 430/2011 31
Q. 7 Limites para lançamentos de alguns compostos 32
Q. 8 Relação dos reagentes e seus fornecedores 34
Q. 9 Classificação dos compostos avaliados de acordo com a Diretiva 93/67/EEC 49


## LISTA DE TABELAS


TABELA 1 – Resultados de toxidade crônica para o ácido cafeico 45
TABELA 2 – Resultados de toxidade crônica para o ácido gálico 45
TABELA 3 – Resultados de toxidade crônica para o para-cresol 46
TABELA 4 – Resultados de toxidade crônica para o fenol 47
TABELA 5 – Resultados de toxidade crônica para o triclosan 47

## LISTA DE SIGLAS

| | |
|---|---|
| ABNT | Associação Brasileira de Normas Técnicas |
| CETESB | Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental |
| CONAMA | Conselho Nacional do Meio Ambiente |
| ISO | International Organizatin for Standardization |
| NBR | Norma Brasileira |

## LISTA DE ABREVIAÇÕES

| | |
|---|---|
| BHT | Butil-hidroxi-tolueno |
| CEO | Concentração de efeito observado |
| CENO | Concentração de efeito não observado |
| cm | Centímetro |
| DBO | Demanda bioquímica de oxigênio |
| mg/L | Miligramas por litro |
| mL | Mililitro |
| nm | Nanômetro |
| PET | Polietileno tereftalato |
| pH | Potencial hidrogeniônico |
| UA | Unidade de absorbância |

**SUMÁRIO**


**1. INTRODUÇÃO** 13
**2. REVISÃO DA LITERATURA** 16
2.1 A importância da água 16
2.2 Compostos fenólicos 17
2.2.1 Fenol 19
2.2.2 Ácido cafêico 21
2.2.3 Ácido gálico 22
2.2.4 Cresóis e para-cresol 24
2.2.5 Tricosan 26
2.3. Ensaios ecotoxicológicos 28
2.4 Resoluções CONAMA 31
2.5 Objetivos 33
2.5.1 Objetivo geral 33
2.5.2 Objetivos específicos 33
**3. MATERIAIS E MÉTODOS** 34
3.1 Materiais 34
3.2 Equipamentos 34
3.3 Preparação das soluções 35
3.3.1 Fenol 35
3.3.2 Ácido cafêico 35
3.3.3 Ácido gálico 35
3.3.4 para-Cresol 36
3.3.5 Triclosan 36
3.4. Procedimento para os ensaios de espectroscopia visível 37
3.5 Procedimento para os ensaios ecotoxicológicos 38
3.6 Tratamento estatístico 40
**4. RESULTADOS E DISCUSSÃO** 41
4.1 Desvios na quantificação de compostos fenólicos 41
4.2 Avaliação ecotoxicológica de compostos fenólicos 44
**5. CONCLUSÃO** 50
**6. REFERÊNCIAS** 51

## 1. INTRODUÇÃO

Compostos fenólicos são fartamente encontrados na natureza, sendo produzidos naturalmente ou lançados através das atividades humanas na forma de resíduos. A maioria deles apresenta de média a alta toxicidade, podendo causar perturbações significativas ao meio ambiente. Os despejos industriais devem ser rigorosamente controlados devido aos limites permitidos pela legislação vigente, devendo ser aplicados processos de tratamento para o enquadramento dos mesmos (PIVELI & KATO, 2005). Uma das possibilidades para estes tratamentos é o uso de bactérias heterotróficas que utilizam os compostos fenólicos como fontes energéticas. Caso as condições utilizadas para esta biodegradação não sejam as ideais, estes microorganismos podem não apresentar o rendimento desejado, resultando no aumento das concentrações dos compostos fenólicos no efluente tratado. (SOUZA, 2000) Para evitar esta situação indesejada, o controle analítico ao longo do tratamento se faz necessário para o acompanhamento do processo, de modo a não ocorrer o comprometimento ambiental (GRACIOSO, et al 2010).

É importante ressaltar que os compostos fenólicos são substâncias de difícil degradação biológica podendo, por este motivo, ocorrer sua bioacumulação, interferindo nas funções celulares do metabolismo, nas transferências intra e extracelulares de nutrientes, afetando os processos de absorção e digestão (OGA, 2008). A exposição continuada ao fenol e seus derivados podem causar efeitos adversos a biota e causar perturbações aos ecossistemas aquáticos, principalmente em algas, ouriços e peixes devido à disfunções orgânicas (ZAGATO & BARTOLETTI, 2008). Por outro lado, alguns compostos fenólicos são de grande importância para os organismos vivos pois atuam como poderosos antioxidantes que são importantes no combate aos radicais livres que podem estabelecer o estresse oxidativo ou atuando como agentes quelantes que limitam a atuação negativa de certos metais (VICENTE, 2009).

Não comum à natureza, frequentemente são encontrados compostos como o nonilfenol que é um plastificante utilizado em plásticos como o poliestireno e o polietileno e o bisfenol-A, matéria prima utilizada na produção de diversos plásticos como os policarbonatos e o PET (polietileno tereftalato) assim como nas resinas

epóxi (EFSA, 2006, 2008, 2010). Produtos como detergentes, cosméticos, medicamentos, tintas, herbicidas e pesticidas também apresentam compostos fenólicos em suas composições, os quais podem ser liberados nos ambientes aquáticos através do descarte inadequado. Agentes tenso-ativos utilizados para remoção de gordura na produção industrial do couro também apresentam compostos fenólicos em sua composição e, sendo à base de nonilfenol etoxilados (solúveis em água), aumentam as concentrações nos corpos receptores. Estes alquilfenóis alteram o comportamento de várias espécies de peixes, feminilizando os machos e alterando seus metabolismos. Os mesmos compostos alteram a qualidade do sêmem humano, diminuindo a fertilidade masculina além de aumentar a incidência de cancro testicular, criptorquia e câncer de mama (AZEVEDO, et al., 2001).

Observando dados históricos do monitoramento da qualidade de águas interiores do estado de São Paulo, realizado pela agência ambiental (CETESB), nota-se que amostras analisadas no período de 2003 a 2007 apresentaram concentrações de fenóis totais variando entre 0,05 e 3,62 mg/L (CESTESB, 2009), as quais ultrapassaram o limite máximo permitido naquela época de 0,003 mg/L (CONAMA 357/2005). Estes resultados foram considerados como potencial gerador de efeitos adversos e poderiam causar distúrbios em quaisquer sistemas biológicos e até a mortalidade (MESQUITA, 2011).

Atualmente, segundo a Portaria CONAMA nº 430 de 2011, a disposição de compostos fenólicos em corpos receptores é limitada a 0,5 mg/L, com algumas exceções para compostos específicos (CONAMA, 2011). Assim, o descarte de uma substância não perigosa como o butil-hidroxi-tolueno (BHT) é enquadrada da mesma forma que o pentaclorofenato de sódio (pó da China) que é uma substância altamente tóxica e carcinogênica. Este fato pode gerar discrepâncias ecotoxicológicas, uma vez que diferentes compostos fenólicos apresentam toxicidades bastante distintas (US-EPA, 1991). Ainda deve ser considerado que a Legislação Brasileira indica, para quantificar os compostos fenólicos, o método por espectroscopia visível da 4-aminoantipirina, utilizando como padrão de quantificação o fenol (CONAMA, 2011), o que acaba causando desvios nos resultados para vários compostos fenólicos.

Para este estudo, foi proposta a avaliação ecotoxicológica comparativa de diferentes compostos fenólicos comumente encontrados em efluentes industriais e domésticos, assim como o estudo dos desvios quantitativos causados pelo uso de uma única substância como padrão.

# 2. REVISÃO DA LITERATURA

## 2.1 A importância da água

Como é de conhecimento generalizado, a água é imprescindível à vida e a mesma vem se tornando cada vez mais escassa tanto em qualidade quanto em quantidade. Apesar de ser um recurso renovável, esta possibilidade está se tornando cada vez mais limitada. O planeta Terra tem cerca de 70 % de sua superfície recoberta por água e, por este motivo, também é chamado planeta Água. Todavia, a maior parte deste recurso natural (cerca de 97,0 %) não é disponível para uso por se tratar de água salgada. Considerando os 3,0 % restantes que poderiam ser utilizados sem a dessalinização, 2,3 % estão armazenados nas calotas polares e apenas 0,7 % estão realmente disponíveis para consumo humano, como visto na Figura 1 (OMTA, 2010; SOUZA, 2009).

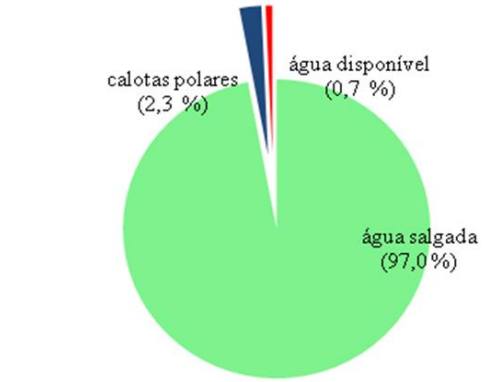



**Figura 1. Distribuição das águas no planeta Terra (adaptado de SOUZA, 2009).**

A partir da Revolução Industrial que se iniciou no final do século XVIII, o crescimento da população humana passou a demandar cada vez mais dos recursos naturais, incluindo a água. Adicionalmente, a demanda industrial crescente passou a agredir o meio ambiente com quantidades superiores a sua capacidade de autodepuração, contaminando as águas cada vez mais escassas (SHELDON, 2008).

Considerando apenas a água disponível, verifica-se que 77 % do total citado acima se encontram congelado em locais frios como nos topos nas montanhas, 22 % estão dispostos na forma de lençóis subterrâneos de grandes profundidades e

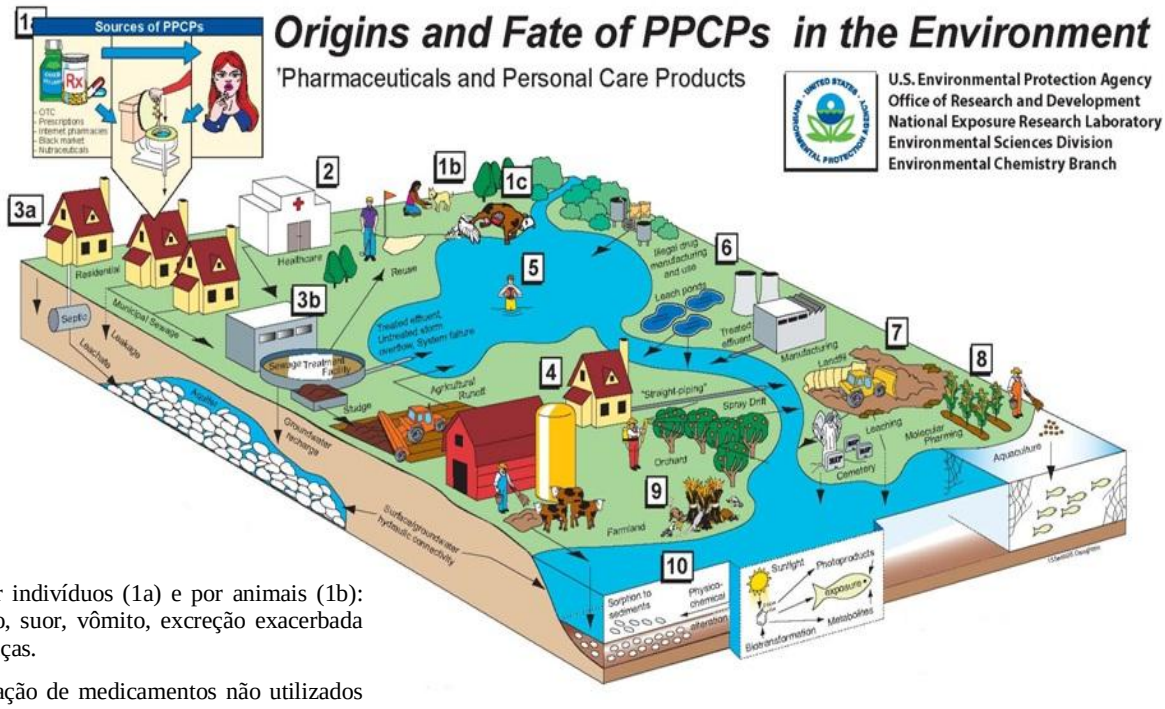
apenas 1 % refere-se a águas superficiais de pronta utilização. Devido ao baixo volume disponível, qualquer contaminação das águas amplia a tendência já diagnosticada do seu esgotamento, com a possibilidade de perdas irreparáveis à biodiversidade e risco a própria sobrevivência do homem (PIMENTEL, 1999).

Um dos primeiros alertas versando sobre o consumo irresponsável da água pela sociedade humana ocorreu no começo da década de 1970 através da publicação do livro “Limits to growth”. Este trabalho destacou a disponibilidade finita e freqüentemente não renovável dos recursos naturais, apresentando cenários alternativos para a sustentabilidade global. Foram utilizados modelos de computador simulando as interações entre a população, os alimentos, a produção industrial, a poluição e os recursos naturais não renováveis, apresentando conclusões sobre a importância de se proteger a natureza a nível global (MEADOWS, 1972).

## 2.2 Compostos fenólicos

Compostos fenólicos são substâncias orgânicas que apresentam em suas estruturas moleculares pelo menos um grupo hidroxila ligadas diretamente a um anel aromático. Seu representante mais simples é o fenol, sendo que a substituição de um ou mais átomos de hidrogênio ligados ao anel aromático por diferentes grupos substituintes forma os derivados fenólicos (MORRISON & BOYD, 2002). São metabólitos secundários formados através de mecanismos de defesa dos vegetais a condições de estresse (PERRON, 2009). São encontrados nos vegetais podendo ser citados o próprio fenol, os flavonoides, as cumarinas, os tocoferóis (vitamina E), os ácidos orgânicos multifuncionais e os derivados de ácidos cinâmicos, dentre outros (NACZK & SHAHIDI, 2004; DECKER, 1995). Geralmente encontram-se na forma de ésteres solúveis em água e em solventes orgânicos polares. São importantes para os vegetais, sendo acumulados na estrutura vacuolar e no apoplasto (TAKAHAMA, 2004), agindo na defesa durante as mudanças ambientais físicas, químicas e bioquímicas (RHODES,1994). Combinam-se facilmente com outros compostos como carboidratos, aminas, alcaloides, terpenos e ácidos orgânicos (RHODES, 1994). Em pH extremos e principalmente em meio alcalino, dão origem a mistura de isômeros de posição, visto que normalmente apresentam

isômeros cis e trans. Geralmente são instáveis a altas temperatura e tem o capacidade de absorver radiação ultravioleta (BOUDET, 2007). Auxiliam os vegetais a se defender contra o ataque de agentes patogênicos e predadores, formando uma relação simbiótica com micro-organismos do solo na fixação do nitrogênio do ar atmosférico para a produção de nitratos (WILDMAN, 2001). Por apresentarem alto potencial redox, atuam como antioxidantes e têm a capacidade de atuarem como quelantes de metais de transição (TSAO & DENG, 2004). Compostos fenólicos são introduzidos no ambiente aquático como subproduto de processos industriais ou via efluentes domésticos (Figura 2).




1) Uso por indivíduos (1a) e por animais (1b): Excreção, suor, vômito, excreção exacerbada por doenças.

- Eliminação de medicamentos não utilizados na rede de esgoto, vazamento na rede de esgoto.
- Disposição de animais mortos/sacrificados que foram medicados e servem de alimento para animais nocrófagos (1c).

2) Lançamento de resíduos hospitalares tratados e não tratados na rede coletora de esgoto doméstico.

3) Lançamentos de resíduos em fossas (3a).

4) Utilização de esterco e de resíduos sólidos de ETE.

5) Introdução de resíduos através do contato primário.

6) Lançamentos indústrias via efluentes controlados e ilícitos.

7) Disposição em aterros de resíduos domésticos, hospitalares e de substâncias perigosas e lixiviação de aterros e cemitérios com problemas estruturais.

8) Utilização de ração com medicamentos na aqüicultura, excretas dos animais cultivados.

9) Lançamento de medicamentos com dupla função.

10)Fototransformação, alterações físico-químicas, volatilização, degradação, mineralização, absorção pelas plantas.

Figura 2. Rotas de entrada de compostos fenólicos para ecossistemas aquáticos. Adaptado de USEPA (2010) http://www.epa.gov/ppcp/pdf/drawing.pdf.

Conforme a Resolução CONAMA N° 430 de 2011, o limite para o lançamento de compostos fenólicos em corpos receptores aquáticos é de 0,5 mg/L, independendo do composto considerado. A seguir, estão apresentadas algumas informações sobre o fenol e alguns de seus derivados.

### 2.2.1 Fenol

Apresenta o nome oficial hidroxi-benzeno, sendo uma substância orgânica com característica ácida. É obtido pela hidroxilação do benzeno (adição de um grupo OH), possuindo, portanto um grupo hidroxila ligado diretamente ao anel aromático. O fenol tem ação fungicida e bactericida sendo por isto utilizado como desinfetante. Como matéria prima, o fenol é utilizado na fabricação de plásticos, corantes e resinas. Alguns de seus derivados possuem propriedades antioxidantes, sendo utilizados na indústria de cosméticos. Apresenta a fórmula estrutural plana vista na Figura. 3.

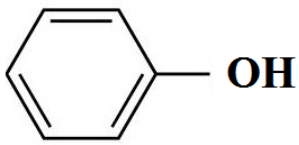



**Figura 3. Fórmula estrutural plana do fenol.**

Dentre outras, o fenol apresenta as propriedades físico-químicas relacionadas no Quadro 1.

**Quadro 1. Algumas propriedades do fenol (The Merck Index, 2001).**

| Propriedades | Características |
|---|---|
| Fórmula molecular | $C_6H_5OH$ |
| Massa molar | 94,11 g/mol |
| Densidade | 1,07 g/mL |
| Ponto de fusão | 41 °C |
| Ponto de ebulição | 182 °C |
| Aparência | sólido cristalino branco |
| Solubilidade em água | 8,4 g/100 mL a 20 $^0$C |

Esta substância é tóxica para diferentes animais, incluindo os marinhos. Se for ingerido, inalado ou absorvido pela pele ou membranas mucosas, pode apresentar alta corrosividade e irritabilidade aos tecidos. Mesmo em baixas concentrações pode causar queimaduras severas desde eritema até necrose e gangrena. Afeta o sistema nervoso central, o fígado e os rins, podendo levar a morte (SOUZA, 2008). Apresenta potencial letal para a vida, ocasionando fraqueza muscular, perda da coordenação motora, convulsões, respiração irregular, efeitos neurológicos, renais, hepáticos e até coma (Wagner, 2002).

Como todo composto fenólico apresenta a capacidade de doar um átomo de hidrogênio oriundo de sua hidroxila, atuando então como redutor que desativa diferentes radicais livres (LEMOS et al., 1999). As fontes exógenas geradoras de radicais livres incluem a poluição do ar, os solventes orgânicos, os pesticidas e as radiações. Radicais livres endógenos são gerados através de mecanismos metabólicos como a metabolização de carboidratos e ação de várias enzimas (AUGUSTO, 2006). Estes radicais livres podem causar alterações nos ácidos graxos poli-insaturados dos fosfolipídios das membranas celulares, que ficam muito vulneráveis (HALLIWELL, 1999). Esse processo é oxidativo e denominado peroxidação lipídica e, uma vez instalado, afetam a integridade estrutural e funcional da membrana celular, alterando sua fluidez e permeabilidade (RICE-EVANS et al., 1995).

### 2.2.2 Ácido cafêico

Apresenta o nome oficial ácido 3-(3,4-dihidroxi-fenil) propen-2-óico, sendo um composto dihidroxílico pertencente a família dos ácidos hidroxicinâmicos. É produzido nos vegetais a partir do ácido 4-hidroxicinâmico que é inicialmente transformado a ácido ferúlico, que sob ação enzimática é convertido em ácido cafêico (LI et al., 2009). Esse composto apresenta ação fungicida e alguns estudos mencionam que pode apresentar ação anticarcinogênica (OLTHOF, 2001; VICENTE, 2009). Apresenta ainda atividade antioxidante, imunomoduladora e anti-inflamatória, podendo agir na redução do estresse oxidativo (VICENTE, 2009). A ação deste ácido no solo reduz o crescimento de raízes, interferindo na absorção de minerais e balanço hídrico. (MATTOS, 2009). Apresenta a fórmula estrutural plana vista na Figura 4.

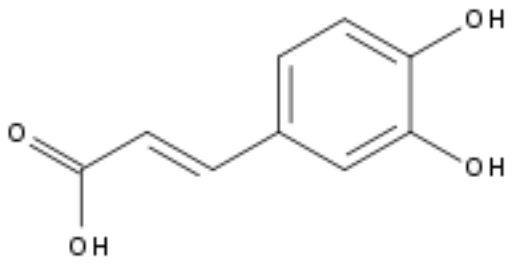



**Figura 4. Fórmula estrutural plana do ácido cafêico.**

Dentre outras, o ácido cafêico apresenta as propriedades físico-químicas relacionadas no Quadro 2.

**Quadro 2. Algumas propriedades do ácido cafêico (The Merck Index, 2001).**

| Propriedades | Características |
|---|---|
| Fórmula molecular | $C_9H_8O_4$ |
| Massa molar | 180,16 g/mol |
| Densidade | 1,478 g/cm$^3$ |
| Ponto de fusão | 223 a 225 ºC |
| Ponto de ebulição | 416,82 ºC (690 K) |
| Aspecto | cristais amarelados |
| Solubilidade em água | 54,1 g/L (25 ºC) |

Em baixas concentrações (0,05 %), este composto combate radicais livres e atua como quelante de metais de transição (STALMACH, 2006). Não é mutagênico (OMS, 1972) e pode atuar na regressão de hepatocarcinomas, diminuindo a metástase e a formação de tumores precedidos de hiperplasia, o que pode representar o principal mecanismo de ação anti-carcinogênica (CHUNG et al., 2004; TANAKA; MORI, 1995).

Possui ação hipoglicemiante aumentando a absorção da glicose pelas células e estimulando as enzimas fosfolipase e proteina C quinase que ativam os receptores de absorção de glicose através da fosfolipase C-proteína quinase C (LO & CHUNG, 1999).

Sua ação antioxidante é baseada no fornecimento do átomo de hidrogênio de seu grupo fenólico que neutraliza radicais hidroxilas (BENINCÁ, 2009 ). Esta ação é útil quando há um desequilibrio que resulta no aumento de radicais livres ou na redução do sistema antioxidante, levando ao estresse oxidaditvo que pode causar sérios danos a moléculas biológicas como DNA, RNA, proteínas, carboidratos etc. (MANACH; et al., 2005; TANG et al.,2000). Os radicais livres gerados no estresse também podem reagir com os fosfolipideos que revestem as células produzindo peroxidação dos ácidos graxos, oxidação das lipoproteinas e outras modificações celulares (LO & CHUNG, 1999). Vieira et al. (1998) avaliaram o potencial antioxidante dos ácidos cafêico e *p*-cumárico e do íon ascorbato na oxidação da LDL (lipoproteína de baixa densidade) promovida pela ferrilmioglobina, observando que atividades antioxidantes por parte dos dois ácidos foram superiores à apresentada pelo íon ascorbato. Além disso, estas substâncias demonstraram um efeito sinérgico, um fato de grande fisiológica (CHUNG et al., 2004).

Ação quelante em relação aos metais de transição está na captação molecular ionica por atração por eletropolaridade e fixação desses ions numa forma estável (STALMACH, 2006)

### 2.2.3 Ácido gálico

Esta substância apresenta o nome oficial ácido 3,4,5-triidroxibenzóico, sendo um composto que pertence a função dos ácidos monocarboxílicos com estrutura

fenólica trihidroxilada. É produzido por vegetais como noz-de-galha, hamamélis e folhas de chá (HODGSON, 2004), no carvalho e nas uvas (HOGAN, 2009). O ácido gálico e seus derivados podem se apresentar na forma esterificada com polissacarídeos hidrossolúvel de ocorrência natural, os quais apresentam diferentes ações biológicas. São encontrados na dieta e reduzem os riscos de doenças como a aterosclerose, câncer e outras de origem neurodegenerativas (LEE et al., 2000). Possuem propriedades adstringentes, precipitam várias proteínas e são usados em casos de intoxicações (PERRON, 2009). O ácido gálico apresenta a fórmula estrutural vista na Figura 5.

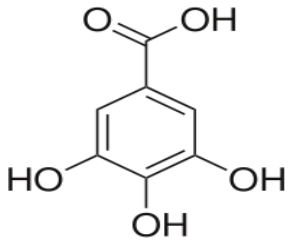



**Figura 5. Fórmula estrutural plana do ácido gálico.**

O ácido gálico descrito acima apresenta características físico-químicas sendo que algumas delas estão relacionadas no Quadro 3.

**Quadro 3. Algumas propriedades do ácido gálico (The Merck Index, 2001).**

| Propriedades | Características |
|---|---|
| Fórmula molecular | $C_7H_6O_5$ |
| Massa molar | 170,12 g/mol |
| Densidade | 1,7 g/cm$^3$ (anidro) |
| Ponto de fusão | 250 °C (523 K) |
| Ponto de ebulição | apresenta decomposição antes da ebulição |
| Aspecto | pó branco |
| Solubilidade em água | 1,1 g/100 mL em água a 20°C (anidro)<br>1,5 g/100 mL em água a 20°C (monoidrato) |

É considerado um fitoterápico de ação antibacteriana de baixa toxicidade em concentrações menores que 1,5 g/kg, porém em concentrações acima de 2,0 g/kg é considerado tóxico. Apresenta ação anti-inflamatória (KROES et al.,1992). Pode exercer ação sobre o ciclo celular que pode resultar em variações no crescimento

das células. É encontrado em altas concentrações na polpa da romã (SALUCCIi et al., 2002).

O ácido gálico tem a capacidade de inibir atividades miotóxicas (venenos de cobras que necrosam as fibras musculares), e neurotóxicas (venenos que agem no sistema nervoso provocando parada respiratória) formando um complexo inativo com as substâncias tóxicas, mesmo aquelas produzidas por animais peçonhentos (COSTA, 2010).

Assim como o ácido cafêico, apresenta forte ação antioxidante combatendo os radicais livres ao fornecer a estes o hidrogênio de algum dos seus grupos fenólicos. Esta reação neutraliza a ação de radicais livres como o hidroxila, formando moléculas mais estáveis que podem ser eliminadas dos organismos (INOUE et al., 1995). Por suas propriedades redutoras, desempenha função importante na prevenção do envelhecimento precoce e no desenvolvimento de doenças crônicas não transmissíveis (DCNT). Tem a capacidade de quelar metais de transição (REYNOLDS, 1991) e potencial propriedade anticâncer (FIUZA, et al., 2004).

Em solução aquosa apresenta característica fotossensível que é a possibilidade de apresentar reações com a participação da luz (visível ou não), sofrendo processo de oxidação. Esta característica é bastante comum nos antioxidantes. Nos organismos vivos pode inibir a peroxidação lipídica e a lipo-oxigenase (SCALBERT *et al*., 2005).

### 2.2.4 Os cresóis e o p-cresol

Cresóis são compostos fenólicos nos quais um dos hidrogênios aromáticos foi substituído por um grupo metila ($-CH_3$). Existem três isômeros de cresóis que são o orto-cresol (1-hidroxi-2-metilbenzeno, 2-metilfenol), o meta-cresol (1-hidroxi-3-metilbenzeno, 3-metilfenol) e o para-cresol (1-hidroxi-4-metilbenzeno, 4-metilfenol), todos com fórmula molecular $C_7H_8O$. Suas misturas são conhecidas como creolina ou lisol. São encontrados em diferentes alimentos, na madeira, no tabaco, no alcatrão da hulha, no óleo cru e em misturas obtidas ao aquecer o alcatrão da madeira. Podem ser utilizados na conservação da madeira mas sua maior utilização

está relacionada à fabricação de resinas sintéticas para esmaltes isolantes de fios de cobre utilizados em motores elétricos e geradores (SOUSA, 2008). Apresentam ponto de fusão entre 11 e 35 °C, ponto de ebulição entre 191 e 202 °C e solubilidade entre 2,3 e 2,6 g/100 mL de água a 25 °C, dependendo do isômero avaliado (MORRISON & BOYD, 2002). Destes isômeros, foi escolhido para este estudo o p-cresol.

O p-cresol apresenta a fórmula estrutural exibida na Figura 6. Pode ser produzido quando microorganismos degradam matéria orgânica e é utilizado na fabricação de fosfato de tricresilo, salicilaldeído, cumarina, e vários herbicidas. Serve como composto de desinfecção em lavagens têxteis, agente de fumigação, em reveladores fotográficos, para a fabricação de explosivos, para a síntese de insumos químicos agrícolas, para limpeza e na flotação de minério. São bons antissépticos, desinfetantes e parasiticidas na medicina veterinária (SOUZA, 2009; EMERY, 1970)

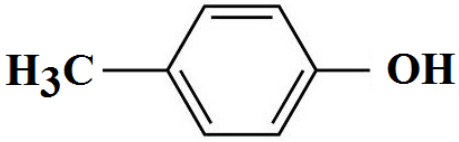



**Figura 6. Fórmula estrutural do para-cresol.**

Para o para-cresol, estão destacadas algumas de suas propriedades físico-químicas no Quadro 4.

**Quadro 4. Algumas propriedades do ácido para-cresol (The Merck Index, 2001)**

| Propriedades | Características |
|---|---|
| Fórmula molecular | $C_7H_8O$ |
| Massa molar | 108,13 g/mol |
| Densidade | 1,0347 g/mL |
| Ponto de fusão | 32 -34 °C |
| Ponto de ebulição | 202,5 |
| Aspecto | cristais âmbar |
| Solubilidade em água | 2,4 g/100 mL (40 ºC) |

Além de sua toxicidade e biodeposição, no ambiente aquático o p-cresol pode

sofrer uma série de transformações fotoquímicas ou bioquímicas, produzindo produtos muito tóxicos que podem alterar a percepção química, motora e reprodutiva dos peixes, causando inibição para desova, deformação de órgãos reprodutores, perda de membros, alterações respiratórias e até desenvolvimento de carcinomas. Os efeitos subletais podem levar a morte em exposições prolongadas. Mesmo em baixas concentrações, o para-cresol e seus produtos de degradação são letais ao meio ambiente aquático, causando a morte dos organismos ou alterações ecológicas que impediriam que os mesmos realizassem suas funções no ecossistema. Efeitos indiretos e subletais podem, a médio e longo prazo, causar a redução das populações das espécies expostas. A acumulação deste xenobiótico nos organismos através de exposições repetitivas pode atingir valores suficientes para causar danos vitais (MAGALHÃES & FERRÃO, 2008).

Pelas características do composto, a exposição ao para-cresol pode ocorrer através das vias digestórias, respiratória e dérmica. É um inibidor enzimático que altera o metabolismo de diversas enzimas e proteínas relacionadas à degradação e sínteses dos compostos. É bem absorvido em decorrência da alta lipossolubilidade desse composto. Em função de sua constituição lipoprotéica, as membranas biológicas são facilmente transpostas por esse composto (EMERY, 1970).

O para-cresol atravessa facilmente a barreira hematoencefálica podendo provocar manifestações neurológicas variadas. Adicionalmente, pode produzir efeitos carcinogênicos e teratogênicos, alterações no neurodesenvolvimento com diferentes e imprevisíveis consequências, na maturação neurológica, aumento da taxa de respiração e da frequência cardíaca, do fluxo sanguíneo para os tecidos e alterar fatores genéticos ou comportamentais (EMER, 1970)

### 2.2.5 Triclosan

O Triclosan ou triclosano apresenta o nome oficial 5-cloro-2-(2,4-diclorofenoxi) fenol. É um derivado fenólico triclorado e lipofílico, que tem sido utilizado em formulações de medicamentos, cremes dentais e faciais, shampoo e sabonetes, dentre outros. Pode ser adicionado a vários tipos de materiais como embalagens de alimentos, adesivos, brinquedos, polietileno, sapatos, selantes, tintas, colchões,

roupas, cortinas, pisos, toldos e argamassa (US-EPA, 1991). É utilização devido à sua grande eficácia antisséptica, sendo eficiente contra as bactérias dos tipos Gram-negativas e Gram-positivas, fungos e bolores. Apresenta a fórmula molecular $C_{12}H_7Cl_3O_2$ vista na Figura 7. O uso na pele e na cavidade bucal apresenta boa tolerância em baixas concentrações (CORTEZ, 2010). Já foi verificado que as águas superficiais que recebem produtos contendo Triclosan podem apresentar este composto em concentrações suficientes para gerar efeitos crônicos à biota (CRANE et al., 2006). Estudos realizados por Heath et al. (2001) demonstraram a capacidade desta substância de inibir a síntese de ácidos graxos e de fosfolipídeos nas membranas celulares, interferir nas funções mitocondriais e desestabilisar as membranas lisossômicas (CANESI, L et al., 2007).

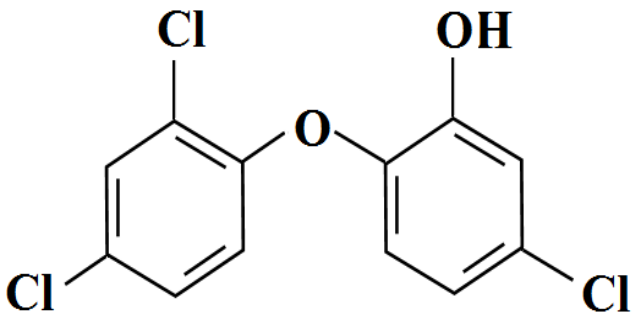



**Figura 7. Fórmula estrutural plana do Triclosan.**

O Triclosan, cujas propriedades estão descritas acima, apresenta as características físico-químicas relacionadas no Quadro 5.

**Quadro 5. Algumas propriedades do Triclosan (The Merck Index, 2001).**

| Propriedades | Características |
|---|---|
| Fórmula molecular | $C_{12}H_7Cl_3O_2$ |
| Massa molar | 289.54 g/mol |
| Densidade | 1,49 g/cm³ |
| Ponto de fusão | 55 °C a 57 °C |
| Ponto de ebulição | 120 °C (393 K) |
| Aspecto | pó branco |
| Solubilidade em água | pouco solúvel em água, parcialmente solúvel na maioria dos solventes orgânicos. |

O Triclosan é utilizado em veterinária medicina, saúde humana, práticas agrícolas e cosméticos. Após o uso de produtos contendo este composto, uma proporção significativa do mesmo é excretada sem ser metabolizado e alcança as estações de tratamento de águas (ETA) onde não é eliminado pelo tratamento com tecnologia convencional (MELO, 2010). Os seres humanos posuem boa tolerância para o Triclosan na pele e cavidade bucal em baixas concentrações. Porém no meio ambiente, o mesmo pode ser degradado por microrganismos e/ou luz solar formando compostos tóxicos como os clorofenois 2,8-diclorodibenzo-p-dioxina e 2,4-diclorofenol. Estes compostos têm sido detectados em ambientes aquáticos e sua superexposição pode causar efeitos indesejados para os organismos marinhos (CORTEZ, 2010). A introdução contínua de Triclosan nos ambientes aquáticos já tem apresentado toxicidade aguda e crônica de gametas e embriões de *Perna perna* em concentrações encontradas no ambiente. Tal abordagem está fornecendo uma alerta precoce de riscos ecológicos para os ecossistemas aquáticos, que devem ser considerados na futura legislação e as decisões de gestão deste composto (CORTEZ, 2010 ).

Ao se ligar com a acil enoil-redutase (proteína transportadora), o Triclosan diminui a afinidade da ligação com a nicotinamida adenina dinucleotídeo ($NAD^+$) resultando na formação de um complexo que impede o $NAD^+$ de participar na síntese dos ácidos graxos.

## 2.3 Ensaios ecotoxicológicos

Os compostos fenólicos podem interferir em vários processos biológicos e sua acumulação no ambiente pode persistir por muitos anos por serem pouco biodegradáveis, vindo a atingir concentrações tóxicas para os organismos. Muitos dos efluentes industriais podem apresentar estes compostos provenientes de descartes das etapas produtivas, dos esgotos sanitários e de derramamentos acidentais (PIVELI & KATO, 2005). Efeitos de xenobióticos podem ainda se manifestar através de alterações fisiológicas como diminuição na capacidade de reprodução e alguns trabalhos têm utilizado ensaios de fecundação e desenvolvimento embrionário para avaliar os efeitos da contaminação (PEREIRA,

2008). A viabilidade dos gametas, bem como a capacidade de desenvolvimento larval podem refletir as condições de organismos expostos a contaminantes e sua capacidade de reproduzir-se, com reduções no percentual de fecundação e de larvas bem desenvolvidas sendo observadas em organismos expostos a contaminantes. Os danos causados por xenobióticos em organelas e a integridade reprodutiva têm sido utilizadas como biomarcadores de estresse químico (HODGSON, 2004). Os ensaios de avaliação foram feitos em vários níveis de concentrações para cada substância. O fator reprodutivo tem sido utilizado como biomarcador do estresse químico (PEREIRA, 2008).

Níveis de concentrações inferiores a 0,5 mg/L de compostos fenólicos totais avaliados pelo método da 4-aminoantipirina são permitidos nos despejos de efluentes (CONAMA, 2011) mas, dependendo do composto envolvido, sua toxicidade pode variar enormemente.

Para se contornar o problema da toxicidade diferenciada dos compostos fenólicos, podem ser utilizados os ensaios ecotoxicológicos. Um dos métodos mais utilizados para águas marinhas é o do desenvolvimento embrio-larval do ouriço-do-mar (*Lytechinus variegatus*, L), que verifica a toxicidade do efluente em estudo a estes embriões sem se preocupar com a natureza química do contaminante. Este ensaio é realizado conforme a norma NBR 15.350 (ABNT, 2012).

O termo ecotoxicologia foi primariamente sugerido na reunião do “Committee of the International Council of Scientific Unions” (ICSU), realizada em junho de 1969 em Estocolmo. Este termo seria aplicado aos estudos que avaliassem os efeitos das substâncias químicas naturais ou sintéticas sobre os organismos vivos incluindo os animais e vegetais, terrestres e aquáticos, que constituem a biosfera (ZAGATTO & BARTOLETTI, 2008).

Estas metodologias foram desenvolvidas para fornecer as ferramentas aos estudos de contaminações ou lançamentos de compostos tóxicos, sendo que uma das suas vantagens é poder prever de forma antecipada os efeitos na biota a partir da análise das curvas concentração-efeito e concentração-resposta de organismos vivos (MAGALHÃES & FERRÃO FILHO, 2008).

Uma limitação destes estudos é que muitas vezes os mesmos são incapazes de suprirem informações exatas para determinados agentes químicos, uma vez que

os mesmos se baseiam na observação de efeitos utilizando concentrações muito altas, o que acaba requerendo extrapolações questionáveis para doses inferiores. Adicionalmente, vários destes testes foram desenvolvidos nas décadas de 1950 a 1980, baseando-se em conhecimento muitas vezes já ultrapassado. Em contrapartida, novos ensaios baseados principalmente na biologia celular e molecular têm sido propostos para suprir estas deficiências (ANDERSEN & KREWSKI, 2009; HARTUNG, 2009).

A partir de 1975, a avaliação da qualidade da água através de testes ecotoxicológicos tem sido padronizada com a participação do Comitê Técnico de Qualidade das Águas da "International Organization for Standardization – ISO", da Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental do Estado de São Paulo - CETESB e da Associação Brasileira de Normas Técnicas - ABNT. Ensaios envolvendo determinações de toxicidade aguda e crônica já foram padronizados utilizando como indicadores diferentes algas, microcrustáceos, equinodermas e peixes (ZAGATTO & BERTOLETTI, 2008; MAGALHÃES & FERRÃO FILHO, 2008). De uma forma geral, os ensaios ecotoxicológicos seguem o roteiro genérico da Figura 8.

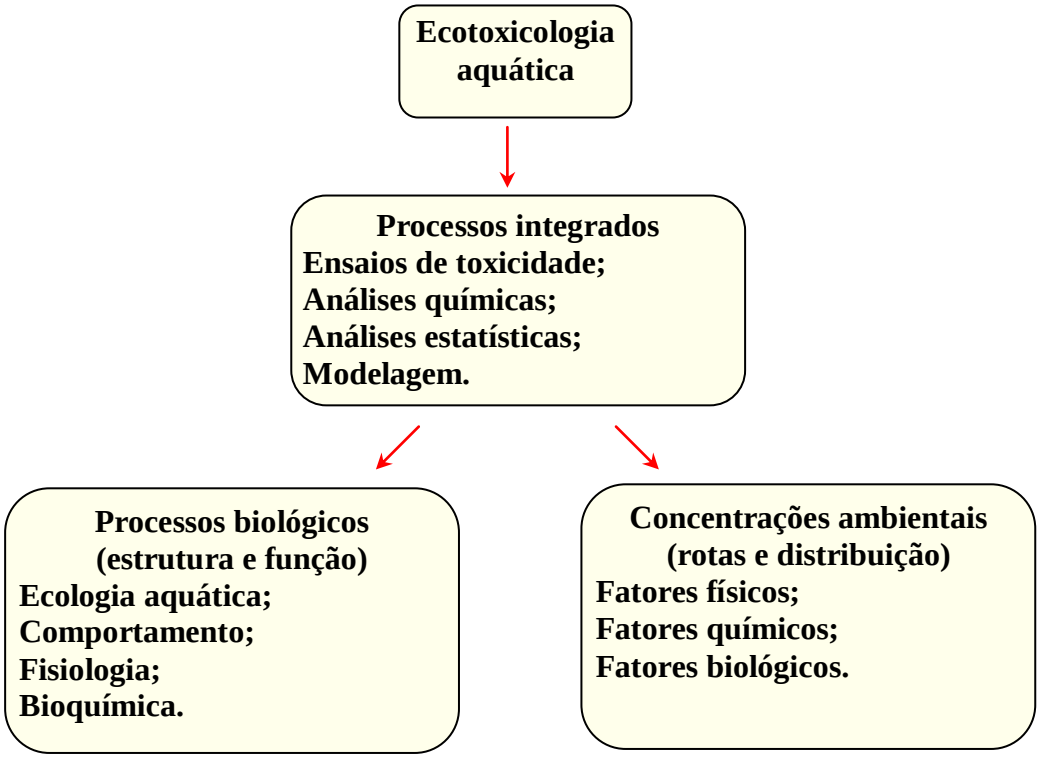



**Figura 8. Modelo geral no desenvolvimento de análises ecotoxicológicas (adaptado de (RAND; WELLS; McCARTY, 1995).**

## 2.4 Resoluções CONAMA

O Conselho Nacional do Meio Ambiente – CONAMA é a entidade encarregada de definir e implantar as diretrizes ambientais para o Território Nacional. Este órgão foi implantado em 1982 através da Lei N° 6.938/1981, sendo diretamente subordinado ao Ministério do Meio Ambiente - MMA. Uma das diretrizes mais conhecidas e utilizadas deste órgão é a Resolução CONAMA N° 357 sancionada em 17 de Março de 2005. Este documento dispõe sobre a classificação e diretrizes ambientais para o enquadramento dos corpos de água superficiais bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes (CONAMA N° 357, 2005).

Para complementar e alterar em alguns pontos a CONAMA N° 357, foi sancionada em 13 de Maio de 2011 a Resolução CONAMA N° 430 que dispõe sobre condições, parâmetros, padrões e diretrizes para a gestão de lançamentos de efluentes em corpos de água receptores. Sua emissão foi motivada para preencher certas lacunas existentes na CONAMA N° 357, sendo que um dos seus itens mais importantes foi a inclusão de parâmetros relacionados à capacidade de autodepuração dos corpos receptores, sendo definidos vários termos não especificados na anterior. Alguns deles estão citados no Quadro 6 a seguir (CONAMA N° 430, 2011).

**Quadro 6. Definições de alguns termos da Resolução CONAMA N° 430/2011.**

| Termo | Definição |
|---|---|
| Capacidade de suporte do corpo receptor. | Valor máximo que o corpo hídrico pode receber de um determinado poluente sem comprometer a qualidade da água e seus usos determinados pela classe de enquadramento. |
| Concentração de efeito não observado ou CENO. | Maior concentração do efluente que não causa efeito deletério estatisticamente significativo na sobrevivência e na reprodução dos organismos. |
| Concentração do efluente no corpo receptor ou CECR. | Fórmulas para o cálculo da concentração do efluente em corpos receptores confinados ou em áreas abertas. |
| Concentração letal mediana (CL-50) e concentração efetiva mediana (CE-50). | Concentração do efluente que causa efeito agudo de letalidade ou imobilidade a 50 % dos organismos. |
| Fator de toxicidade ou FT. | Menor diluição do efluente que não causa efeito deletério agudo aos organismos. |

A Resolução CONAMA 430 (2011) preconiza na sua Seção II - Artigo 16 que “Os efluentes de qualquer fonte poluidora somente poderão ser lançados diretamente no corpo receptor desde que obedeçam as condições e padrões previstos neste artigo, resguardadas outras exigências cabíveis”. Estas condições estão sumarizadas a seguir e no Quando 7.

I - condições de lançamento de efluentes:

a) pH entre 5 a 9;

b) temperatura: inferior a 40 °C, sendo que a variação de temperatura do corpo receptor não deverá exceder a 3 °C no limite da zona de mistura;

c) materiais sedimentáveis: até 1 mL/L em teste de 1 hora em cone Inmhoff. Para o lançamento em lagos e lagoas, cuja velocidade de circulação seja praticamente nula, os materiais sedimentáveis deverão estar virtualmente ausentes;

d) regime de lançamento com vazão máxima de até 1,5 vez a vazão média do período de atividade do agente poluidor, exceto nos casos permitidos pela autoridade competente;

e) óleos e graxas:

óleos minerais: até 20 mg/L; óleos vegetais e gorduras animais: até 50 mg/L; ausência de materiais flutuantes;

g) demanda bioquímica de oxigênio (DBO): remoção mínima de 60 % de DBO, sendo que este limite só poderá ser reduzido no caso de existência de estudo de autodepuração do corpo hídrico que comprove atendimento às metas do enquadramento do corpo receptor.

**Quadro 7. Limites para lançamentos de alguns compostos (CONAMA Nº 430/2011).**

| Substância | Limite (mg/L) |
|---|---|
| Benzeno e tolueno | 1,2 |
| Clorofórmio | 1,0 |
| Dicloroeteno (1,1 + 1,2 cis + 1,2 trans) | 1,0 |
| Etilbenzeno | 0,84 |
| Fenóis totais (reativos com 4-aminoantipirina) | 0,5 |
| Tetracloreto de carbono | 1,0 |
| Xileno | 1,6 |

## 2.5. Objetivos

### 2.5.1 Objetivo Geral

Avaliar o potencial de impacto ambiental de alguns compostos fenólicos (ácido gálico, ácido cafêico, para-cresol, Triclosan e fenol), e verificar os desvios nas suas determinações quantitativas, em situações não previstas nas Resoluções CONAMA.

### 2.5.2 Objetivos Específicos

a) Construir as curvas padrão por espectroscopia visível dos compostos de interesse e verificar os desvios quantitativos nas suas determinações ambientais;
b) Avaliar a toxicidade crônica através de efeitos adversos no desenvolvimento embriolarval de *Lytechinus variegatus* expostos a ácido cafêico, ácido gálico, para-cresol, fenol e Triclosan;
c) Avaliar o risco ecológico desses compostos em ecossistemas aquáticos a partir da comparação das concentrações de efeito observado e as concentrações permitidas pelas Resoluções CONAMA;
d) Gerar subsídios para futuras revisões da legislação ambiental vigente, no que diz respeito aos padrões de lançamento de compostos fenólicos em efluentes industriais e domésticos.

# 3. MATERIAIS E MÉTODOS

## 3.1 Materiais

Os reagentes utilizados neste estudo foram adquiridos conforme o Quadro 8.

**Quadro 8. Relação dos reagentes e seus fornecedores.**

| Reagente | Fornecedor |
|---|---|
| Ácido cafêico | Merck Schuchardt. Germany |
| Ácido gálico | Sigma-Aldrich Co. USA |
| Fenol | Vetec Química Fina Ltda., Brasil |
| 4-aminoantipirina | Vetec Química Fina Ltda., Brasil |
| para-cresol | Sigma Aldrich Co, USA |
| Triclosan | CalBiochem, USA |
| ferricianeto de potássio | Lafan Química Fina Ltda., Brasil |
| fosfato dibásico de potássio | Cromato Produtos Químicos Ltda., Brasil |
| fosfato monobásico de potássio | Cinética Ltda., Brasil |
| hidróxido de amônio | Neon Produtos Químicos, Brasil |
| etanal (formol) | Labsnth Produtos para Laboratório Ltda. |

## 3.2 Equipamentos

Para as determinações espectrofotométricas na faixa visível foi utilizado espectrofotômetro modelo Spectronic 20 fabricado pela Milton Roy Company – USA com cubeta de vidro óptico de 10 mm. Os ajustes de pH para os testes foram feitos através de pHmetro produzido pela Qumis S/A equipado com eletrodo de vidro combinado. Para a contagem dos embriões de ouriços-do-mar, foi utilizado microscópio óptico marca Meiji Techno Co. Ltda – Japão equipado com célula de Sedgewick-Rafter.

## 3.3 Preparo das soluções

### 3.3.1 Fenol

Foram preparadas oito diluições entre 0,2 e 4,0 mg/L utilizando-se água marinha filtrada.Para os testes com os ouriços-do-mar, foi preparada uma solução estoque com concentração de 100 mg/L de fenol em água do mar. Para tanto, foram pesados 20 mg deste reagente com precisão de 0,1 mg em um béquer de 100 mL, esta massa foi dissolvida em água do mar filtrada e transferida quantitativamente para um balão de 200 mL, completando-se o volume com água do mar filtrada. A seguir, foram preparadas 8 diluições entre 0,2 e 4,0 mg/L utilizando-se água marinha filtrada. Para os testes de espectrofotometria visível, foi preparada outra solução estoque utilizando procedimento exatamente equivalente, apenas substituindo a água do mar por água destilada. Desta, foram preparadas cinco diluições entre 0,1 e 4,0 mg/L utilizando-se água destilada.

### 3.3.2 Ácido cafêico

Foram preparadas oito diluições entre 0,2 e 4,0 mg/L utilizando-se água marinha filtrada.Para os testes com os ouriços-do-mar, foi preparada uma solução estoque com concentração de 100 mg/L de fenol em água do mar. Para tanto, foram pesados 20 mg deste reagente com precisão de 0,1 mg em um béquer de 100 mL, esta massa foi dissolvida em água do mar filtrada e transferida quantitativamente para um balão de 200 mL, completando-se o volume com água do mar filtrada. A seguir, foram preparadas 8 diluições entre 0,2 e 4,0 mg/L utilizando-se água marinha filtrada. Para os testes de espectrofotometria visível, foi preparada outra solução estoque utilizando procedimento exatamente equivalente, apenas substituindo a água do mar por água destilada. Desta, foram preparadas cinco diluições entre 0,1 e 4,0 mg/L utilizando-se água destilada.

### 3.3.3 Ácido gálico

Foram preparadas oito diluições entre 0,2 e 4,0 mg/L utilizando-se água marinha filtrada.Para os testes com os ouriços-do-mar, foi preparada uma solução estoque com concentração de 100 mg/L de fenol em água do mar. Para tanto, foram

pesados 20 mg deste reagente com precisão de 0,1 mg em um béquer de 100 mL, esta massa foi dissolvida em água do mar filtrada e transferida quantitativamente para um balão de 200 mL, completando-se o volume com água do mar filtrada. A seguir, foram preparadas 8 diluições entre 0,2 e 4,0 mg/L utilizando-se água marinha filtrada. Para os testes de espectrofotometria visível, foi preparada outra solução estoque utilizando procedimento exatamente equivalente, apenas substituindo a água do mar por água destilada. Desta, foram preparadas cinco diluições entre 0,1 e 4,0 mg/L utilizando-se água destilada.

### 3.3.4 para-Cresol

Foram preparadas oito diluições entre 0,2 e 4,0 mg/L utilizando-se água marinha filtrada.Para os testes com os ouriços-do-mar, foi preparada uma solução estoque com concentração de 100 mg/L de para-cresol em água do mar. Para tanto, foram pesados 20 mg deste reagente com precisão de 0,1 mg em um béquer de 100 mL, esta massa foi dissolvida em água do mar filtrada e transferida quantitativamente para um balão de 200 mL, completando-se o volume com água do mar filtrada. A seguir, foram preparadas dois testes com 9 diluições entre 0,2 e 8,0 mg/L, e um último teste preparou-se seis diluições entre 2,0 e 64,0 mg/L utilizando-se água marinha filtrada. Para os testes de espectrofotometria visível, foi preparada outra solução estoque utilizando procedimento exatamente equivalente, apenas substituindo a água do mar por água destilada. Desta, foram preparadas cinco diluições entre 0,1 e 4,0 mg/L utilizando-se água destilada.

### 3.3.5 Triclosan

Foram preparadas oito diluições entre 0,2 e 4,0 mg/L utilizando-se água marinha filtrada. Para este fármaco bem menos solúvel que os compostos anteriores, foi preparada uma solução estoque com 20 mg/L. Para tanto, foram pesados 20 mg deste produto em um béquer de 100 mL e adicionada a quantidade mínima de sulfóxido de dimetila (DMSO) para solubilizar o material. A seguir, foi adicionada água do mar filtrada, transferiu-se quantitativamente a solução obtida para um balão volumétrico de 1000 mL e completou-se para um litro com água do mar filtrada. Desta solução, foram preparadas oito diluições entre 0,2 e 4,0 mg/L

utilizando-se água do mar filtrada. Para os testes de espectrofotometria, foi utilizado o mesmo procedimento na preparação da solução estoque de 20 mg/L substituindo-se a água do mar por água destilada. Desta, foram preparadas cinco diluições entre 0,2 e 1,0 mg/L utilizando-se água destilada.

### 3.4 Procedimentos para os ensaios de espectrofotometria visível

Para os testes de espectrofotometria visível, foi preparada outra solução estoque utilizando procedimento exatamente equivalente, apenas substituindo a água do mar por água destilada. Desta, foram preparadas cinco diluições entre 0,1 e 4,0 mg/L utilizando-se água destilada. Para este composto, também foram preparadas duas soluções sendo uma em água do mar e outra em água destilada, conforme o mesmo procedimento descrito acima. Destas soluções estoque, foram preparadas as mesmas diluições já citadas em água do mar e água destilada.

O procedimento para os testes de espectroscopia visível foram realizados conforme o método 5530-D descrito no “Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater” (APHA, 1998). Basicamente, 100 mL de padrões de contendo de 0,1 a 0,5 mg/L de fenol são transferidos para béqueres de 250 mL assim como um branco de água destilada. Adicionar 2,5 mL de solução de $NH_4OH$ 0,5 N e imediatamente ajustar o pH para 7,9 ± 0,1 com tampão fosfato. Cerca de 2,0 mL de tampão fosfato são necessários. Transferir para um funil de separação de 500 mL, adicionar 1,0 mL de solução de 4-aminoantipirina, homogeneizar, adicionar 1,0 mL de solução de $K_3[Fe(CN)_6]$ e homogeneizar. Após 15 minutos, transferir para uma cubeta e ler a absorbância dos padrões contra o branco em 500 nm. Preparar um gráfico de absorbância versus concentração de fenol 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1,0, 1,2 e 1,4 em mg/L. Seguir o mesmo procedimento para as amostras utilizando o gráfico para a determinação de suas concentrações. O procedimento baseia-se na reação da substância 4-aminoantipirina na oxidação de compostos fenólicos, em meio básico, hidróxido de amônio, e na presença de ferrocianeto de potássio, respectivamente, formando um complexo de cor marrom avermelhado que é medido em 500 nm (Figura 9).

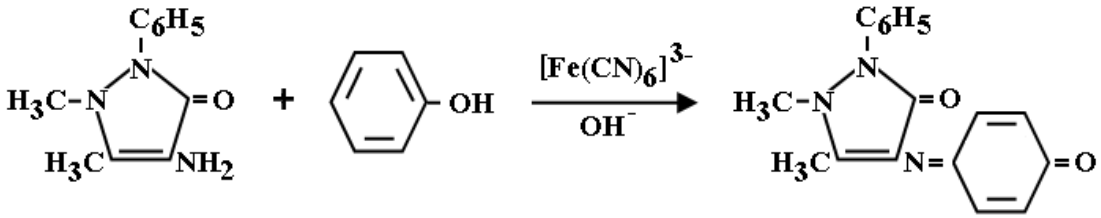



**Figura 9. Reação química da 4-aminoantipirina na determinação dos compostos fenólicos.**

## 3.5 Procedimentos para os ensaios ecotoxicológicos

Os ensaios ecotoxicológicos com ouriços-do-mar foram realizados de acordo com a norma preconizada pela Associação Brasileira de Normas Técnicas ABNT-NBR 15.350 (2012) no Laboratório de Ecotoxicologia da Universidade Santa Cecília – UNISANTA. O método consiste na exposição de embriões de ouriço-do-mar *Lytechinus variegatus* (Figura 10) a diferentes concentrações da substância a ser testada, durante o período de desenvolvimento embrio-larval (de 24 a 28 h).

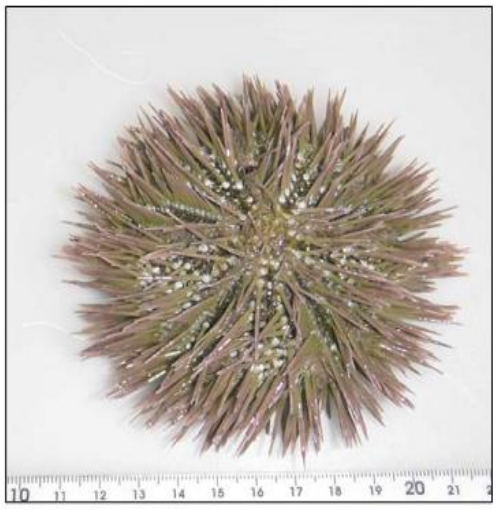


**Figura 10. Exemplar adulto de ouriço-do-mar (*Lytechinus variegatus*).**

Através da injeção abdominal da solução de cloreto de potássio 0,5 molar ou estímulo elétrico de 35 mV foi induzida a liberação dos gametas (Figura 11). No momento da fecundação, foi preparada uma solução salina de espermatozóide que

foi adicionada à solução dos gametas femininos. Esta solução foi agitada e a seguir ficou em repouso por 20 minutos, para ocorrer à fertilização. Aproximadamente 500 embriões recém-fertilizados foram adicionados às soluções de teste e aos controles.

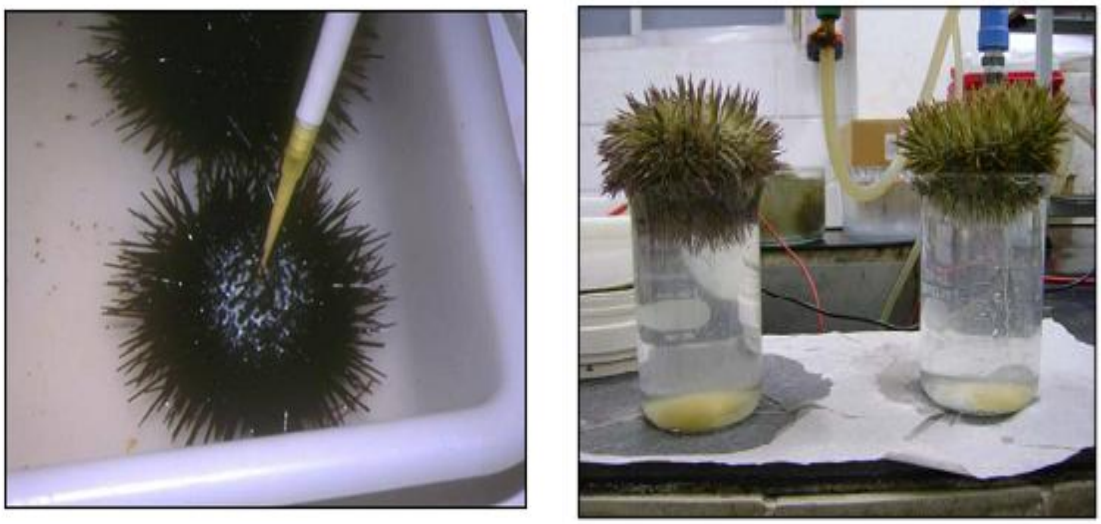


**Figura 11. Coleta de gametas masculinos (esquerda) e femininos (direita) de ouriços-do-mar.**

Após o período de 24 a 28 horas em câmara com temperatura entre 24 ± 2 ºC foi retirada uma alíquota do controle para verificar se pelo menos 80 % das larvas atingiram o estágio de pluteus que é o critério de aceitabilidade do ensaio. A leitura dos resultados foi realizada em câmara de Sedgwick-Rafter utilizando-se microscópio óptico com aumento de 400x, sendo analisado o número de embriões normais nos 100 primeiros organismos visualizados em cada réplica. A Figura 12 demonstra a diferença entre larvas normais e anômalas. A partir dos resultados foram estabelecidas as concentrações mais altas nas quais não foram detectados efeitos adversos (CENO - concentração de efeito não observado) e as concentrações mais baixas nas quais se observou efeito adverso (CEO-concentração de efeito observado) e empregou-se o software TOXSTAT 3.5 para identificação dessas concentrações.

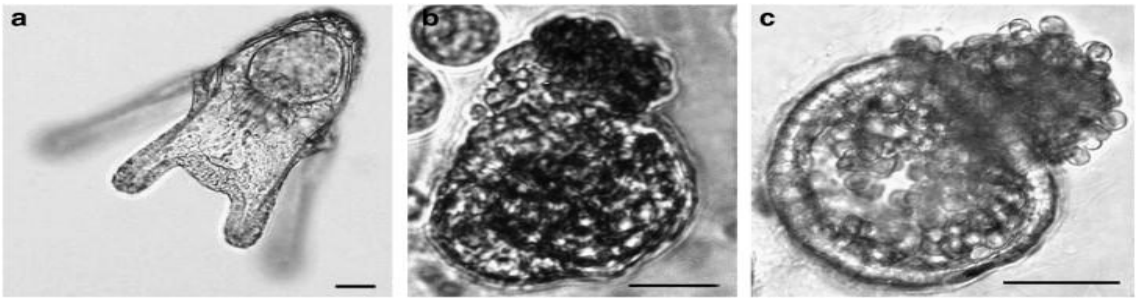



**Figura 12. Larvas plúteos com desenvolvimento normal (a) e anômalo (b) e (c).**

### 3.6 Tratamento estatístico

Os gráficos de absorbância versus concentração dos compostos fenólicos e a determinação dos coeficientes de explicação ($R^2$) foram obtidos utilizando-se o programa Microsoft Excel® for Windows® versão 2007.

Para os ensaios ecotoxicológicos, os dados foram analisados quanto à normalidade e homogeneidade de variância através dos métodos do Chi-quadrado ($\chi^2$) e Teste-F, respectivamente. Após passarem nestes pré-requisitos os resultados foram analisados pelo Teste T por bioequivalência a fim de identificar as concentrações que foram estatística e biologicamente diferentes do controle. Utilizou-se uma constante de proporcionalidade R = 0,86 conforme proposto por CETESB (2013) para efluentes ou substâncias químicas empregando *L. variegatus.* Adotou-se um $p < 0,05$ para todas as análises. Os ensaios de ecotoxicidade foram realizados em quadraplicata. Onde adequado, os resultados foram expressos como média ± desvio padrão.

Ainda como resultado dos ensaios ecotoxicológicos foram calculadas as Concentrações de Inibição a 50% dos organismos expostos (CI50) através do software ICPin.

# 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

## 4.1 Desvios na quantificação de compostos fenólicos

O primeiro objetivo deste estudo foi o de demonstrar experimentalmente que a metodologia analítica recomendada pelas Resoluções CONAMA N° 357 e CONAMA N° 430 é falha na missão de quantificar os compostos fenólicos presentes em um lançamento ou em um corpo receptor. O motivo desta deficiência é a recomendação do uso de uma curva padrão obtida utilizando-se o fenol para a quantificação de todos os outros compostos fenólicos.

Como a técnica indicada é a espectroscopia visível, a equação básica para a mesma é a Lei de Lambert-Beer cuja forma mais comum é representada pela equação ($A = \varepsilon . c . \ell$), onde A é a absorbância da amostra (UA), $\boldsymbol{\varepsilon}$ é o coeficiente de absorção ou absorbtividade da substância na unidade de concentração desejada (UA/cm.mg/L neste estudo), c é a concentração da substância na unidade desejada (mg/L neste estudo) e $\ell$ é a espessura do compartimento da amostra percorrido pela luz , o que leva a desvios muitas vezes inaceitáveis para o método analítico indicado. Deve ser notado que este parâmetro é igual ao coeficiente angular da equação que representa graficamente a lei de Lambert-Beer, geralmente calculado pelo programa Excel através da equação linear da linha de tendência (SILVERSTEIN, et al. 1994).

Para demonstrar as consequências do uso do fenol como padrão para outras substâncias, inicialmente foram construídas as curvas padrão das substâncias escolhidas para o estudo (ácido cafêico, ácido gálico, fenol, p-cresol e Triclosan). Todos os resultados obtidos podem ser vistos na Figura 13. Para estes compostos, foram preparados padrões com concentrações entre 0,2; 0,4 0,6; 0,8; e 1,0 mg/L, estas soluções foram analisadas em quadripicata e as médias com os respectivos desvios-padrão foram incluídas no gráfico. Observa-se nesta figura que o fenol apresentou uma curva com valores mais elevados de absorbâncias devido a possuir um coeficiente de absorção maior ($\boldsymbol{\varepsilon}$ = 0,1258 UA/cm.mg/L), o triclosan apresentou valores intermediários de absorbância devido ao seu coeficiente de absorção ser mediano ($\varepsilon$ = 0,0872 UA/cm.mg/L) enquanto que o para-cresol

apresentou os menores valores de absorção devido ao seu coeficiente de absorção ser inferior aos demais compostos fenólicos avaliados (ε = 0,0436 UA/cm.mg/L).

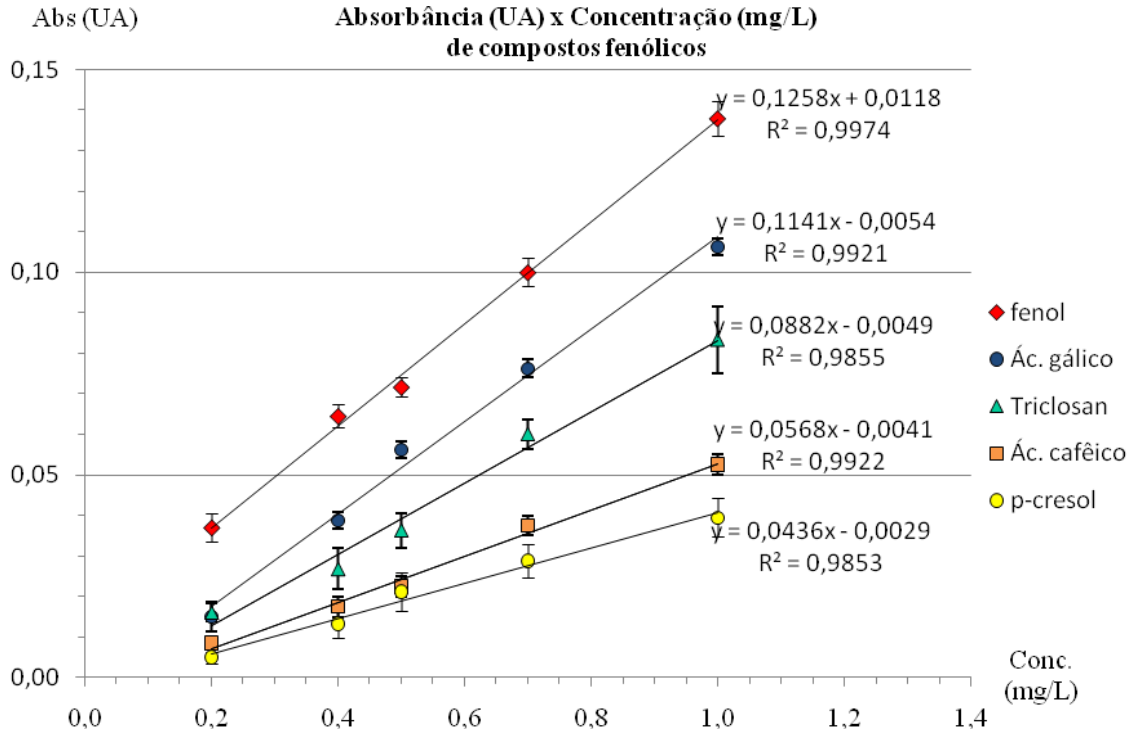



**Figura 13. Gráfico de absorbância versus concentração dos compostos de interesse, suas equações e respectivos coeficiente de explicação.**

As medidas estatísticas mais usadas que fornecem informações são o coeficiente de correlação (R), coeficiente de determinação ($R^2$), coeficiente angular e coeficiente linear.

O coeficiente de correlação linear (R) mede a grandeza da correlação linear entre variáveis e varia entre +1 e -1, enquanto que $R^2$ mais próximo de 1, maior a eficiência das concentrações dos compostos, indicando modelos eficientes Uma correlação próxima a zero indica que não há correlação entre as duas variáveis. Uma correlação positiva indica que as duas variáveis movem-se juntas, ou seja, quando uma cresce a outra também cresce e a relação é forte quanto mais o valor do coeficiente de correlação se aproxima de +1. Uma correlação negativa indica que as duas variáveis movem-se em direções opostas, ou seja, quando uma variável aumenta, a outra diminui e que a relação também fica mais forte quanto mais

próxima de -1. Os coeficientes de correlação próximos a 1, mostram a forte correlação entre os dados da análise espectrofotométrica e os dados das concentrações e indica que as variáveis dependentes e independentes estão perfeitamente correlacionadas positivamente movendo-se essencialmente em perfeita proporção na mesma direção. O coeficiente de determinação ($R^2$) indica o grau de ajuste da reta aos dados. Utiliza-se o símbolo $R^2$ porque é o quadrado do coeficiente de correlação linear. Os valores dos coeficientes lineares indicam a ocorrência de erros determinados pelos modelos. Quanto mais próximo de zero os valores dos coeficientes lineares menores são os erros determinados pelas dosagens das amostras (ARAÚJO, 2011).

Os dados obtidos consistem em resultados de verificação entre substâncias cuja relação de variáveis dependem da preparação das amostras, dos métodos e técnicas utilizadas com uma interpretação teórica de conjunto de dados univariados obtidos por instrumentos como pHmetro, e multivariados através de refratômetro, espectrofotômetro gerando um conjunto de variáveis para cada amostra (BARROS NETO et al., 2002). A utilização de programas específicos de computação gráfica na elaboração de programas bioestatísticos pode trazer uma sofisticação para coleta de dados e elaboração dos resultados mais precisos. Esta quimiometria e a biometria aperfeiçoaram os resultados pelos métodos estatísticos comparativo para cada amostra onde foram mantidas as mesmas variáveis de concentrações das soluções, temperatura, e a mesma salinidade e pH para os solventes. (SENA *et al.*, 2000)

As análises dos dados fornecem o máximo de informações química e biológicas muito relevantes, além de fornecer conhecimentos sobre sistemas e adversidades ambienteis das substâncias para o meio ambiente (SENA et al.,2000)

Com estas informações, fica fácil perceber o erro analítico intrínseco do método recomendado. Supondo-se que uma amostra represente um efluente a ser descartado. Para a determinação dos compostos fenólicos totais, amostras de cada substância foram analisadas pelo método da 4-aminoantipirina, resultando em análise um valor de absorbância igual a 0,040 UA. Através da curva do fenol da Figura 11, chega-se a conclusão que o teor de compostos fenólicos desta amostra seria de 0,224 mg/L, ou seja 40 % do limite estipulado pela lei. Porém se esta amostra contiver para-cresol, o correto, analiticamente falando, seria utilizar a curva

padrão deste composto, o que resultaria em uma concentração de 0,984 mg/L. Desta forma, utilizando-se a curva padrão do fenol, o efluente poderia ser lançado em corpos receptores (inferior a 0,5 mg/L) mas na verdade este efluente estaria com teor de compostos fenólicos duas vezes mais alto que o permitido na Resolução CONAMA N° 430/2011 e, portanto, impedido de ser descartado.

A exposição continuada a fenóis e seus derivados, tanto nas formas moleculares, iônicas, metiladas, combinadas ou não, em determinadas concentrações, podem apresentar efeitos adversos a animais e causar grandes variações aos ecossistemas aquáticos, principalmente em algas e peixes devido a disfunções orgânicas.

Concentrações de lançamentos em corpos receptores inferiores a 0,5 mg/L, medidos pelo método da 4-aminoantipirina, são permitidos conforme a Resolução CONAMA N° 430/2011, mas o presente estudo indicou que a partir de 0,25 mg/L, já são esperados efeitos tóxicos crônicos.

Segundo a CONAMA nº 430/2011, a disposição de compostos fenólicos em corpos receptores é limitada a 0,5 mg/L com exceção de alguns compostos específicos. Desta forma, o descarte de uma substância não perigosa como o butil hidroxi tolueno (BHT) é tratada da mesma forma que o de outras substâncias altamente tóxicas como o pentacloro fenato de sódio.

### 4.2 Avaliação ecotoxicológica de compostos fenólicos

Os compostos, ácido cafêico, ácido gálico, para-cresol, fenol, e triclosan apresentaram toxicidade crônica para embriões de ouriço-do-mar. Os resultados obtidos para estes compostos estão apresentados nas Tabelas 4, 5, 6, 7 e 8.

O ácido cafeico apresentou toxicidade crônica a partir da concentração 0,20 mg/L. A CEO média para o composto foi de 2,73 mg/L, enquanto a concentração média de inibição do desenvolvimento embriolarval foi de 2,66 mg/L (Tabela 1).

**Tabela 1. Resultados de toxicidade crônica para o ácido cafêico.**

| Ensaio | CENO $mg.L^{-1}$ | CEO $mg.L^{-1}$ | CI50 $mg.L^{-1}$ |
|---|---|---|---|
| 1 | 2,00 | 4,00 | 3,61 (3,40 – 3,95) |
| 2 | 2,00 | 4,00 | 3,52 (3,37 - 3,70) |
| 3 | --- | 0,20 | 0,84 (0,83 – 0,86) |
| Média | 2,00 | 2,73 | 2,66 |
| DP | 0,00 | 2,19 | 1,57 |

( ) Intervalo de confiança

O ácido gálico apresentou toxicidade crônica a partir da concentração 0,20 mg/L. A CEO média para o composto foi de 0,37 mg/L, enquanto a concentração média de inibição do desenvolvimento embriolarval foi de 2,98 mg/L (Tabela 2).

**Tabela 2. Resultados de toxicidade crônica para o ácido gálico**

| Ensaio | CENO $mg.L^{-1}$ | CEO $mg.L^{-1}$ | CI50 $mg.L^{-1}$ |
|---|---|---|---|
| 1 | 0,20 | 0,40 | 3,90 |
| 2 | 0,40 | 0,50 | 3,93 |
| 3 | --- | 0,20 | 1,12 (1,06 – 1,20) |
| Média | 0,30 | 0,37 | 2,98 |
| DP | 0,14 | 0,15 | 1,61 |

( ) Intervalo de confiança

A ação antioxidante benéfica dos ácidos cafêico e gálico pode estar relacionada com as estruturas químicas dos grupos fenólicos que podem doar prótons ($H^+$) e formar radicais fenolatos relativamente estáveis, impedindo as reações de oxidação em cadeia nos compartimentos celulares dos organismos vivos, podendo inibir a peroxidação lipídica e a lipo-oxigenase, alterando assim o equilíbrio redox celular e o potencial de sinalização das espécies reativas de oxigênio. No entanto, não foram encontrados estudos com invertebrados que corroborem essa hipótese, que deve ser objeto de futuras investigações.

O para-cresol apresentou toxicidade crônica a partir da concentração 2,00 mg/L. A CEO média para o composto foi de 2,33 mg/L, enquanto a concentração média de inibição do desenvolvimento embriolarval foi de 8,47 mg/L (Tabela 3).

**Tabela 3. Resultados de toxicidade crônica para o para-cresol**

| Ensaio | CENO $mg.L^{-1}$ | CEO $mg.L^{-1}$ | CI50 $mg.L^{-1}$ |
|---|---|---|---|
| 1 | 2,00 | 4,00 | 3,33 (2,66 - 3,94) |
| 2 | 0,75 | 1,00 | 3,11 (2,64 - 3,71) |
| 3 | 1,00 | 2,00 | 18,96 (18,32 -19,95) |
| Média | 1,25 | 2,33 | 8,47 |
| DP | 0,66 | 1,53 | 9,09 |

( ) Intervalo de confiança

Bonfim (2005), ao analisar o 4-clorofenol, observou efeitos a partir de 4,58 mg/L. Emery (1970) avaliou a toxicidade aguda do Cresol para os crustáceos *Gammarus fasciatus* e *Asellus militaris*, e observou efeitos a partir de 8,6 mg/L após 48 horas de exposição, resultado este muito semelhante à CI50 média do para-cresol no presente estudo. Este autor estimou concentrações seguras do composto entre 0,525 a 0,700 mg/L.

Devillers (1988) observou efeito agudo (imobilidade) a *Daphnia magna* expostas a 12,434 mg/L de p-cresol, e ao comparar a toxicidade dos compostos fenólicos demonstrou que para *D. magna* cresóis são mais tóxicos que o feno l, enquanto que xilenóis não exibem toxicidade significativamente superior do que os cresóis, e que trimetilfenóis são menos tóxicos que os cresóis, e assim nenhuma relação direta foi encontrada entre o número e posição de grupos metila no núcleo fenólico e a toxicidade aguda para *D. magna*. Esse mesmo autor observou efeito agudo do fenol em D. magna em concentrações de 39,1 mg/L

No presente estudo o fenol apresentou toxicidade crônica a partir da concentração 0,50 mg/L. A CEO média para o composto foi de 0,58 mg/L, enquanto a concentração média de inibição do desenvolvimento embriolarval foi de 2,66 mg/L (Tabela 4).

**Tabela 4. Resultados de toxicidade crônica para o fenol.**

| Ensaio | CENO $mg.L^{-1}$ | CEO $mg.L^{-1}$ | CI50 $mg.L^{-1}$ |
|---|---|---|---|
| 1 | 0,40 | 0,50 | 3,61 |
| 2 | 0,70 | 0,75 | 0,85 (0,82 - 0,87) |
| 3 | 0,40 | 0,50 | 3,52 (3,22 – 3,64) |
| Média | 0,50 | 0,58 | 2,66 |
| DP | 0,17 | 0,14 | 1,57 |

( ) Intervalo de confiança

Nossos resultados demonstraram maior toxicidade crônica do fenol em relação ao para cresol para *L. variegatus*. Resultado semelhante foi observado por Bringmann et al. (1980 apud Devillers, 1988) que demonstraram que o-cresol, e m-cresol são menos tóxicos do que o fenol para a alga verde *Scenedesmus quadricauda*, para a cianobactérias *Microcystis aeruginosa*, e para o flagelado *Chilomonas paramaecium*.

Bonfim (2005), observou efeito crônico do fenol no desenvolvimento embriolarval do ouriço-do-mar *Echinomedtra lucunter* a partir de 36,63 mg/L. A sensibilidade de cada espécie pode justificar essa diferença nas concentrações de efeito observado.

O triclosan apresentou toxicidade crônica a partir da concentração 0,20 mg/L. A CEO média para o composto foi de 0,43 mg/L, enquanto a concentração média de inibição do desenvolvimento embriolarval foi de 0,54 mg/L (Tabela 5).

**Tabela 5. Resultados de toxicidade crônica para o Triclosan.**

| Ensaio | CENO $mg.L^{-1}$ | CEO $mg.L^{-1}$ | CI50 $mg.L^{-1}$ |
|---|---|---|---|
| 1 | 0,20 | 0,40 | 0,56 (0,54 - 0,58) |
| 2 | 0,50 | 0,70 | 0,71 (0,71 - 0,72) |
| 3 | --- | 0,20 | 0,36 (0,34 – 0,37) |
| Média | 0,35 | 0,43 | 0,54 |
| DP | 0,21 | 0,25 | 0,18 |

( ) Intervalo de confiança

No presente estudo, o Triclosan apresentou a menor concentração de efeito

(0,20 mg/L) e este resultado concordou com o estudo de Cortez (2010) que observou efeito tóxico em ouriços-do-mar e mexilhões a partir de 0,10 mg/L.

Outros estudos empregando organismos em estágios iniciais de vida foram realizados por Ishibashi et al. (2004), e a eclosão de ovos fertilizados expostos ao Triclosan por 14 dias diminuiu significativamente em relação ao controle com concentrações acima de 313 $\mu g.L^{-1}$. Neste mesmo estudo, as concentrações de Triclosan que causaram a mortalidade em larvas e embriões (menos de 24 horas de vida) do peixe *Oryzias latipes* em 96 horas de exposição foram de 602 $\mu g.L^{-1}$e 399 $\mu g.L^{-1}$, respectivamente. Já no estudo realizado por Oliveira et al. (2009), a concentração de efeito do Triclosan para larvas e embriões de peixe da espécie *Danio rerio* expostos pelo período de 96 horas foi de 420 $\mu g.L^{-1}$.

A fim de avaliar e controlar os riscos de compostos químicos à saúde humana e ambiental, a União Europeia colocou em prática o sistema REACH, um sistema integrado único de registro, avaliação, autorização e restrição de substâncias químicas, e criou a Agência Europeia de Substâncias Químicas.

Esta política (REACH) obriga as empresas que fabricam e importam substâncias químicas a avaliar os riscos decorrentes da utilização das mesmas e a tomar as medidas necessárias para gerir todos os riscos que identificarem.

No âmbito desta política que está em vigor desde 2006, classifica as substâncias de acordo com os resultados pontuais de toxicidade (valores de CE50 ou CI50), ou seja, substâncias com valores de CE50 < 0,1 $mg.L^{-1}$são classificadas como “extremamente tóxicas”; entre 0,1 e 1$mg.L^{-1}$ são classificadas como “muito tóxicas”; com valores entre 1 e 10 $mg.L^{-1}$são classificadas como “tóxicas”; valores entre 10 e 100 $mg.L^{-1}$ são classificadas como “perigosas” e acima de 100 $mg.L^{-1}$ “não tóxica” (CEC, 1996).

Considerando os valores estabelecidos pela Diretiva 93/67/EEC, o Quadro 9 classifica os compostos avaliados no presente estudo de acordo com a CI50 média.

**Quadro 9. Classificação dos compostos avaliados de acordo com a Diretiva 93/67/EEC.**

| *Composto* | *não tóxico* *>100 mg.L$^{-1}$* | *perigoso* *10-100 mg.L$^{-1}$* | *tóxico* *1-10 mg.L$^{-1}$* | *muito tóxico* *0,1-1 mg.L$^{-1}$* | *extremamente tóxico* *< 0,1 mg.L$^{-1}$* |
|---|---|---|---|---|---|
| *Acido cafeico* | | | | | |
| *Ácido galico* | | | | | |
| *Fenol* | | | | | |
| *Para-cresol* | | | | | |
| *Triclosan* | | | | | |

Os resultados obtidos neste trabalho demonstram que compostos fenólicos empregados com fins terapêuticos ou cosméticos (ácidos gálico, ácido cafêico e Triclosan), que foram tão ou mais tóxicos que o próprio fenol, podem ser considerados como poluentes emergentes em ecossistemas aquáticos, e devem ser objeto de futuros estudos de avaliação de risco ambiental.

## 5. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos no presente estudo demonstraram que o fenol pode apresentar efeitos tóxicos a partir da concentração de 0,5 mg/L, limite da Resolução CONAMA 430/2011 para fenóis totais. No entanto, quando outros compostos fenólicos são avaliados isoladamente, concentrações de efeito são observadas em concentrações inferiores ao permitido por lei. Considerando a composição de efluentes industriais e domésticos e a possibilidade da presença de diversos compostos fenólicos e derivados nessas misturas, pode-se inferir a ocorrência de toxicidade derivada de compostos fenólicos, ainda que a concentração final destes seja inferior ou igual a 0,5 mg/L.

A comparação da toxicidade dos compostos avaliados (ácido cafêico, ácido gálico, fenol, para-cresol e Triclosan) e a verificação dos desvios nas suas determinações quantitativas, em situações não previstas nas Resoluções CONAMA, demonstram o atual risco ecológico desses compostos em ecossistemas aquáticos e sugerem a necessidade de revisão dos atuais limites de lançamentos, que poderiam regular individualmente os compostos fenólicos com concentrações de efeitos tóxicas conhecidas.

## 6. REFERÊNCIAS

ABNT - Associação Brasileira de Normas Técnicas. NBR 15.350: **Ecotoxicologia aquática – toxicidade crônica de curta duração – método de ensaio com ouriços-do-mar.** Rio de Janeiro: ABNT, 2012.

ANDERSEN, M.E.; KREWSKI, D. **Toxicity testing in the 21st century: bringing the vision to life.** Toxicol Sci. 2009; 107(2): 324-30.

APHA – American Public Health Association. **Standard methods for the examination of water and wastewater.** 20005-2605: 20th ed. Washington USA: American Public Health Association, 1998.

ARAÚJO, E. M. P. **Técnicas espectroscópicas e quimiométricas como ferramentas na confirmação da estrutura de substancias isoladas de produtos naturais ou obtidas por sínteses.** Tese de doutorado em Química. Curso de Pós-graduação em Química da UFBA - Universidade Federal da Bahia Salvador – BA Agosto – 2011.

AUGUSTO, O. **Radicais livres: bons, maus e naturais.** Oficina de texto, São Paulo, 2006, 120p.

AZEVEDO, D.A.; LACORTE, S.; VIANA, P.; BARCELÓ, D. **Occurrence of nonylphenol and bisphenol-A in surface water from Portugal.** J Braz Chem Soc. 2001; 12(4): 532-537.

BARROS NETO, B.; PIMENTEL, M. F.; ARAUJO, M. C. U. **Recomendações para calibração em química analítica: parte I. Fundamentos e calibração com um componente (calibração univariada).** Química Nova. v.25, n.5, p. 856-65, 2002.

.

BENINCÁ, C. **Estabilidade do ácido 5-o-cafeoilquínico: relação entre a cinética química e o processamento de erva-mate.** Dissertação de mestrado. Curitiba/PA. Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos- PPGTA- Setor de tecnologia. Universidade Federal do Paraná, 2009.

BONFIM, C.L..L. **Efeitos do Fenol e 4-Clorofenol sobre o desenvolvimento embriolarval de *Echinometra Lucunter* (Linnaeus, 1758)**: Avaliação dessas substâncias como referência [dissertação de mestrado]. Salvador/BA. Instituto de Biologia Universidade Federal da Bahia. 2005.

BOUDET, A. M. **Evolution and current status of research in phenolic compounds.Phytochemistry.** v. 68, n. 22-24, 2007, p. 2722-2735

CANESI,L.; CIACCI, C.; LORUSSO, L.C.; BETTI, M.; GALLO, G.; POJANA, G.; MARCOMINI, A. **Effects of Triclosan on *Mytilus galloprovincialis* hemocyte function and digestive gland enzyme activities**: Possible modes of action on non target organism. Comp Biochem Physiol. 2007; 145: 464-472

CEC (COMMISSION OF THE EUROPEAN COMMUNITIES**). Technical guidance document in support of commission directive 93/67/EEC on risk assessment for new notified substances.Part II, environmental risk assessment. Luxembourg**: Office for official publication of the European Communities; 1996.

CETESB (Companhia Ambiental do Estado de São Paulo). **Relatório de Qualidade de Águas Interiores do Estado de São Paulo – São Paulo:** Relatório Técnico. 310 p. 2009.

_____ Divisão de Toxicologia, Genotoxicidade e Microbiologia Ambiental Janeiro de 2013.

CHUNG, T. W.; MOON, S. K.; CHANG, Y. C.; KO, J. H.; LEE, Y.C.; CHO, G.; KIM, S. H.; KIM, J. G.; KIM, C.H.; **Novel and therapeutic effect of caffeic acid and caffeic acid phenyl ester on hepatocarcinoma cells: complete regression of hepatoma**

**growth and metastasis by dual mechanism.** The FASEB Journal .v. 18, n. 14, p. 1670-1681, 2004

CONAMA N° 357. Ministério do Meio Ambiente - Conselho Nacional do Meio Ambiente. 2005. Disponível em: www.mma.gov.br/port/conama. Acessado em: Agosto/2012.

CONAMA N° 430. Ministério do Meio Ambiente - Conselho Nacional do Meio Ambiente. 2011. Disponível em www.mma.gov.br/port/conama. Acessado em: Agosto/2012.

CORTEZ, F.S**. Avaliação Ecotoxicológia do Fármaco Triclosan para Invertebrados Marinhos.** Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares da Universidade de São Paulo. Dissertação de Mestrado. IPEN. São Paulo 2010.

COSTA, T.R. **Avaliação da Atividade Antiofídica do Extrato Vegetal de *Anacardium humile*: Isolamento e Caracterização Fitoquímica do Ácido Gálico com Potencial Antimiotóxico.** 2010. 64f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo. Ribeirão Preto, 2010.

CRANE, M.; WATTS, C.; BOUCARD, T. **Chronic aquatic environmental risks from exposure to human pharmaceuticals.** Sci Total Environm. 2006; 367: 23-41

DECKER E. A. **The role of phenolics, conjugated linoleic acid, carnosine, and pyrrolquinoline quinone as nonessential dietary antioxidants.** Nutritional Review. v.53, n. 03, 1995, p. 49-58.

DEVILLERS, J. 1988. **Acute toxicity of cresols, xylenols, and trimethylphenols to *Daphnia magna* Straus 1820.** The Science of the Total Environment, 76: 79-83.

EFSA (European Food Safety Authority). **Opinion of the Scientific Panel on Food Additives, Flavourings, Processing Aids and Materials in Contact with Food on a request from the Commission related to 2,2-bis(4-hydroxyphenyl)propane (Bisphenol A).** The EFSA Journal 2006; 428: 1-75.

EFSA (European Food Safety Authority). **Scientific Opinion of the Panel on Food additives, Flavourings, Processing aids and Materials in Contact with Food (AFC) on a request from the Commission on the toxicokinetics of Bisphenol A.** The EFSA Journal 2008; 759: 1-10.

EFSA (European Food Safety Authority). **Scientific Opinion on Bisphenol A: evaluation of a study investigating its neurodevelopmental toxicity, review of recent scientific literature on its toxicity and advice on the Danish risk assessment of Bisphenol A.** The EFSA Journal 2010; 8(9): 1829.

EMERY, R.M. 1970. **The comparative acute toxicity of cresol to two benthic crustaceans.** Water Research, 4: 485-491.

FIUZA, S. M.; GOMES, C.; TEIXEIRA, L. J.; GIRAO DA CRUZ, M.T.; CORDEIRO, M. N.; MILHAZES, N.; BORGES, F.; MARQUES, M. P. M. **Phenolic acid derivatives with potential anticancer properties—a structure-activity relationship study. Part 1: Methyl, propyl and octyl esters of caffeic and gallic acids.** Bioorganic & Medicinal Chemistry. v. 12, p. 3581–3589. 2004

GRACIOSO, L.H.; AVANZI, I.R.; PERPÉTUA, E.A. **Otimização do meio de cultivo do lodo biológico para a biodegradação do fenol.** Revista Ceciliana. 2010; 2(1): 7-10.

HALLIWELL B. , GUTTERIDGE J.M.C., In: **Free Radicals in Biology and Medicine**. 3ª.edition, Oxford University Press, Oxford, 1999.

HARTUNG, T. **Toxicology for the twenty-first century.** Nature. 2009; 460: 208-12.

HEATH, R.J.; WHITE, S.W.; ROCK, C.O. **Lipid biosynthesis as a target for antibacterial agents.** Prog Lipid Res. 2001; 40: 467-497.

HODGSON, J. M. et al. **Phenolic acid metabolites as biomarkers for tea- and coffee-derived polyphenol exposure in human subjects.** British Journal of Nutrition, v. 91, n. 2, p. 301-5, 2004.

HOGAN, S. et al. **Antioxidant properties and bioactive components of Norton (Vitis aestivalis) and Cabernet Franc (Vitis vinifera) wine grapes.** LWT - Food Science and Technology, v. 42, n. 7, p. 1269-74, 2009.

ISHIBASHI, H.; MATSUMURA, N.; HIRANO, M.; MATSUOKA, M.; SHIRATSUSHI, H.; ISHIBASHI, Y.; TAKAO, Y.; ARIZONO, K**. Effects of triclosan on the early life stages and reproduction of medaka Oryzias latipesand induction of hepatic vitellogenin.** Aquatic Toxicology. 67: p. 167-179, 2004.

INOUE, M.; SUZUKI, R.; SAKAGUCHII, N.; LI, Z.; TAKEDA, T.; OGIHARA, Y.; JIANG, B. Y.; CHEN, Y. **Selective induction of cell death in cancer cells by gallic acid.** Biological and Pharmaceutical Bulletin, v.18, n. 11, p.1526-1530, 1995

KROES, B. H.; BERGA,A. J. J. VAN DER; UFFORD, H. C. Q. VAN; DIJK, H. VAN; LABADIE, R. P. **Anti-inflammatory activity of gallic acid.** Planta Médica. v. 58, n. 6, p. 499-504, 1992.

LARANJINHA, J.A.N., ALMEIDA, L.M., MADEIRA, V.M.C. **Reactivity of dietary phenolic acids with peroxyl radicals: antioxidant activity upon LDL oxidation.** *Biochemical Pharmacology*, London, v.48, n.3, p.487-492, 1994.

LARANJINHA, J.A.N., VIEIRA, O., ALMEIDA, L.M., MADEIRA, V.M.C. **Inhibition of metmyoglobin/$H_2O_2$ dependent LDL lipid peroxidation by naturally occuring phenolic acids.** *Biochemical Pharmacology,* London, v.51, n.4, p.395-402, 1996

LEE, Y. J.; LIAO, P. H.; CHEN, W. K.; YANGG, C. Y. **Preferential cytotoxicity of caffeic acid phenethyl ester analogues on oral cancer cells.** Cancer Letters. v. 153, p. 51–56, 2000.

LEMOS, V.S; FREITAS, M.R.; MULLER. B; LINO, Y.D.; QUEIROGA, C.E.; CORTES, S.F: **Dioclein, a new nitric oxide- and endothelium-dependent vasodilator flavonoid.** European Journal of Pharmacolog*.* v.386, n. 1, p. 41-46, 1999.

LI, N. G.; SHI, Z.H.; TANG, Y. P.; LI, B. Q.; DUAN, J.A. **Highly Efficient Esterification of Ferulic Acid Under Microwave Irradiation.** Molecules. v. 14, p. 2118-2126, 2009.

LO, H. H.; CHUNG, J. G**. The effects of plant phenolics, caffeic acid, chlorogenic acid and ferulic acid on arylamine N-acetyltransferase activities in human gastrointestinal microflora.** Anticancer Research. v. 19, n. 1A, p. 133-139, 1999.

MAGALHÃES, D.P.; FERRÃO FILHO, A.S. **A ecotoxicologia como ferramenta no biomonitoramento de ecossistemas aquáticos.** Oecol Bras. 2008; 12(3): 355-81.

MANACH, C.; MAZUR, A. E SCALBERT, **A. Polyphenols and prevention of cardiovascular diseases.** Current Opinion in Lipidology. v.16, n. 1, p. 77-84, 2005.

MATTOS, T.C. **Mecanismo de ação antioxidante dos ácidos cafeico e tânico em sistemas contendo íons ferro.** Universidade da Brasília. Instituto de química. Programa de pó-graduação de mestrado em química. 2009.

MEADOWS, D.H.; MEADOWS, D.L.; RANDERS, J.; BEHRENS, W.W. **Limits to Growth.** New York: New American Library, 1972.

MELO, C.F. **Conversão do biocida triclosan catalisada por enzimas oxidativas e avaliação da remoção da atividade antibacteriana.** Universidade federal do Rio de Janeiro. Programa de Pós graduação de doutorado em Ciências em Engenharia Química. Rio de Janeiro, RJ Brasil. 2010.

MESQUITA,L.C. A., **Avaliação edotoxicológica e caracterização química em águas superficiais do Rio Cubatão, SP**. Dissertação de Mestrado em Ciências na Área Tecnologia Nuclear - INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES. Universidade de São Paulo, São Paulo 2011.

MORRISON, R.T.; BOYD R.N. **Organic Chemistry.** 6th ed. New Jersey: Pearson Education Inc., 2002.

NACZK, M.; SHAHIDI, F. Review: **Extraction and analysis of phenolics in food.Journal of Chromatography.** A. v. 1054, n. 1-2, 2004, p. 95-111.

OGA, S. **Fundamentos de Toxicologia.** São Paulo/SP. Editora Atheneu, 3ª edição, 2008.

OLIVEIRA, R; DOMINGUES, I; GRISOLIA, C. K; SOARES, A. M. V. M. **Effects of triclosan on zebrafish early-life stages and adults.** Environ. Sci. Pollut. Res. 16: 679–688, 2009.

OLTHOF MR, HOLLMAN PC, KATAN MB (Janeiro de 2001**). "O ácido clorogénico e ácido cafeico é absorvido em humanos ".***J. Nutr* **131** *(1):.* P. 66-7.

OMTA, A.W.; GOODWIN, P.; FOLLOWS, M.J. **Multiple regimes of air-sea carbon partitioning identified from constant-alkalinity buffer factors.** Global Biogeochem Cycles. 2010; 24:1-9.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, a Agência Internacional para Pesquisa sobre o Câncer, GENEBRA 1972-PRESENTE. (Obra de vários volumes). Disponível em: http://monographs.iarc.fr/index.php p. V56 127 (1993)]

PEREIRA C.D.S **Biomarcadores de exposição, efeito e bioacumulação de xenobióticos em mexilhões *Perna perna* (Linnaeus,1758) transplantados ao**

**longo do litoral de São Paulo.** Tese de doutorado em Ciências, área de Oceanografia Biológica. Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo. 2008.

PERRON NR, BRUMAGHIM JL. A **review of the antioxidant mechanisms of polyphenol compounds related to iron binding** . *Cell Biochem Biophys* 2009; 53 (2): 75-100

PIMENTEL, R**. Reserva de água no planeta. Bahia Análise & Dados.** 1999; 9(3): 118-122.

PIVELI, R.P.; KATO, M.T. **Qualidade da água e poluição: aspectos físico-químicos.** São Paulo: Associação Brasileira de Engenharia Sanitária e Ambiental. 2005. p. 247-265.

RAND,G.M.; WELLS,P.G.; MCCARTY,L.S. **Introduction to aquatic ecotoxicology. In: Fundamentals of Aquatic Toxicology: Effects, Environmental Fate and Risk Assessment. North Palm Beach, Florida:** Ecological Services Inc., 1995.

REYNOLDS, L.D AND WILSON, N.G **"Scribes and Scholars"** 3rd Ed. Oxford: 1991. pp 193–4.

RHODES, M. J. C. **Physiological roles for secondary metabolites in plants: some progress, many outstanding problems.** Plant Molecular Biology. v. 24, 1994, p. 1-20.

RICE-EVANS, C. A.; MILLER, N. J.; BOLWELL, P. G.; BRAMLEY, P. M.; PRIDHAM ,J. B. **The relative antioxidant activities of plant-derived polyphenolic flavonoids. Free Radical Research.** v. 22, n. 4, 1995, p. 5375-383.

SALUCCI, M.; STIVALA, L. A.; MAIANI, G.; BUGIANESI, R.; VANNINI, V.

**Flavonoids uptake and their effect on cell cycle of human colon adenocarcinoma cells (Caco 2).** British Journal of Cancer. v. 86, p. 1645- 1651, 2002

SCALBERT, A., MANACH, C., MORAND, C., REMESY, C., JIMENEZ, L. 2005. **Dietary polyphenols and the prevention of diseases.** C*ritical Reviews in Food Science and Nutrition*. 45:287-306.

SENA, M. M.; POPPI, R. J.; FRIGHETTO, R.T.S.; VALARINI, P.J. **Avaliação do uso de métodos quimiométricos em análises de solos.** Química Nova. v. 23, n. 4, p.547-556, 2000.

SHELDON, R.A. Why **green chemistry and sustainability of resources are essential to our future.** J Environ Monit. 2008; 10: 406-7.

SILVERSTEIN, R. M.; BASSLER, C.; MORRILL, M**.; Identificação espectrométrica de compostos orgânicos.** 5ª edição. Editora Guanabara Koogan S.A., Rio de Janeiro-RJ, 1994.

SOUZA, A. M. **Monitoração e ajuste de realimentação em processos produtivos multivariados.** Tese. Doutorado Engenharia de Produção – Universidade Federal de Santa Catarina, 2000.

SOUZA, R.M.G. **Utilização de materiais excedentários agrícolas de baixo custo para remoção de poluentes orgânicos**. [dissertação de mestrado]. Porto/Portugal: Universidade do Porto; 2008.

SOUZA, F.B. Remoção **de compostos fenólicos de efluentes petroquímicos com tratamento seqüenciais e simultâneos de ozonização e adsorção.** Universidade federal de Santa Catarina [Dissertação de Mestrado], 2009.

STALMACH, A.; MULLEN, W.; NAGAI, C.; CROZIER, A. **On-line HPLC analysis**

**ofthe antioxidant activity of phenolic compounds in brewed, paper-filtered coffee.Brazilian Journal of Plant Physiology.** v. 18, n. 1, 2006, p. 253-262.

TAKAHAMA, U. **Oxidation of vacuolar and apoplastic phenolic substrates by peroxidase: Physiological significance of the oxidation reactions.** Phytochemistry Reviews. v. 3, 2004, p. 207–219.

TANAKA, T.; MORI, H. **Prevention of experimental tumorigenesis in colon, liver and oral cavity by dietary chlorogenic and cafeic acids.** *Seizième Colloque Scientifique International sur le Café*, ASIC, Paris, p. 79-87, 1995.

TANG, L., ZHANG Y., QIAN Z.,SHEN X., **The mechanism of $Fe^{2+}$ initiated lipid peroxidation in liposomes: the dual function of ferrous ions, the roles of the pre-existing lipid peroxides and the lipid peroxyl radical.** Biochem. J. 352 (2000) 27-36.

THE MERCK INDEX. **Uma enciclopédia de produtos químicos, drogas e Biológicos.** 13 ª Edição, Whitehouse Station, NJ: Merck and Co., Inc., 2001, p.. 275

TSAO, R.; DENG, Z., **Separation procedures for naturally occurring antioxidant phytochemicals.** Journal of Chromatography B. v. 812, n. 1-2, 2004, p. 85–99

US-EPA – United State Environmental Protection Agency. EPA/600/4-91/003 – **Short-term methods for estimating the chronic toxicity of effluents and recliving waters to marine and estuarine organisms.** Cincinati: U.S. Environmental Protection Agency. 1991, p.579.

US-EPA – United State Environmental Protection Agency. **Short-term methods for estimating the chronic toxicity of effluents and recliving waters to marine and estuarine organisms.** Cincinati: U.S. Environmental Protection Agency. 2010. Disponível em: http://www.epa.gov/ppcp/pdf/drawing.pdf. Acesso em outubro de 2013.

VICENTE, S.J.V. **Caracterização antioxidante do café (*Coffea arábica*, L.) e efeitos da sua administração oral em ratos**. [tese de doutorado]. São Paulo: Faculdade de Saúde Publica da Universidade de São Paulo; 2009.

VIEIRA, O., LARANJINHA, J., MADEIRA, V., ALMEIDA, L. **Cholesteryl ester hydroperoxide formation in myoglobin-catalyzed low density lipoprotein oxidation: concerted antioxidant activity of caffeic and p-coumaric acids with ascorbate.** *Biochemical Pharmacology,* London, v.55, n.3, p.333-340, 1998

ZAGATTO, P.A.; BARTOLETTI, E. **Ecotoxicologia aquática: princípios e aplicações.** 2ª Ed. São Carlos, SP: Ed. Rima, 2008.

WAGNER , M ; NICELL, J.A. 2002 **"Detoxification of phenolic solution with horseradish peroxidase and hydrogen peroxide" Water Research.** v.36, n. 16, pp. 4041-4052.

WILDMAN, R. E. C. **Classifying nutraceuticals. In: Handbook of nutraceuticals and functional foods.** Boca Raton, FL: CRC Press. 2001, p. 13–30.