



ÁDRIA CALOTO DE OLIVEIRA

**TOXICIDADE DE ELEMENTOS-TRAÇO PARA CONSUMIDORES
PRIMÁRIOS NA PRESENÇA DE EXOPOLISSACARÍDEOS PRODUZIDOS POR
ORGANISMOS FITOPLANCTÔNICOS (CHLOROPHYCEAE E
CIANOPHYCEAE).**

São Carlos – SP

2007

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

ÁDRIA CALOTO DE OLIVEIRA

**TOXICIDADE DE ELEMENTOS-TRAÇO PARA CONSUMIDORES
PRIMÁRIOS NA PRESENÇA DE EXOPOLISSACARÍDEOS PRODUZIDOS POR
ORGANISMOS FITOPLANCTÔNICOS (CHLOROPHYCEAE E
CIANOPHYCEAE).**

Dissertação apresentada à Escola de Engenharia de São Carlos, da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos necessários à obtenção do Título de Mestre em Ciências da Engenharia Ambiental.

Orientadora – Prof^a. Dr^a. Eneida Salati

São Carlos – SP

2007

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Ficha catalográfica preparada pela Seção de Tratamento
da Informação do Serviço de Biblioteca – EESC/USP

O48t Oliveira, Ádria Caloto de
Toxicidade de elementos-traço para consumidores primários na presença de exopolissacarídeos produzidos por organismo fitoplanctônicos (Chlorophyceae e Cyanophyceae) / Ádria Caloto de Oliveira ; orientadora Eneida Salati. — São Carlos, 2007.

Dissertação (Mestrado-Programa de Pós-Graduação e Área de Concentração em Ciências da Engenharia Ambiental) — Escola de Engenharia de São Carlos da Universidade de São Paulo, 2007.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Ádria Caloto de Oliveira

Toxicidade de elementos-traço para consumidores primários na presença de exopolissacarídeos produzidos por organismos fitoplanctônicos (Chlorophyceae e Cyanophyceae).

Dissertação apresentada à Escola de Engenharia de São Carlos, da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos necessários à obtenção do Título de Mestre em Ciências da Engenharia Ambiental.

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

Ao meu esposo Wagner, com amor, admiração e gratidão por sua compreensão, carinho, presença e apoio em todos os momentos.

Aos meus pais João Caloto e Luzia Claudete Bonin Caloto com muito carinho, amizade, gratidão e afeto, pela presença e pelas palavras de conforto que sempre me ajudaram a não desistir.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer a todos que contribuíram de alguma forma para a finalização de mais esta etapa:

Ao Prof. Dr. Abílio Lopes de Oliveira Neto, pela orientação, incentivo, pelos ensinamentos, amizade, por não poupar esforços para que este trabalho se concretizasse e acima de tudo pela oportunidade.

À Profa. Dra. Eneida Salati, pela orientação, por acreditar e investir em pessoas que no início são apenas alunos, mais tarde se transformam em amigos.

Ao Prof. Dr. Armando Augusto Henriques Vieira, Instituto de Botânica/UFSCAR/São Carlos, pela orientação, pela oportunidade e por seus ensinamentos.

À FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) pela participação no projeto temático “Destino da Matéria Orgânica Liberada por Cianobactérias em Reservatório Eutrofizado do Rio Tietê: Estudos de Processos” (processo número nº 2005/51263-5), dirigido pelo Prof. Dr. Armando A. H. Vieira, do Laboratório de Ficologia, no Departamento de Botânica, UFSCAR, São Carlos, São Paulo, no período de março de 2006 a fevereiro de 2007.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Engenharia Ambiental da Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, pela oportunidade de ampliar os conhecimentos e a convivência com funcionários e professores conceituados e altamente capacitados durante todo o mestrado.

À Profa. Dra. Odete Rocha - UFSCAR e a Profa. Dra Clarice Botta-Paschoal – USP pelas considerações e sugestões para melhoria deste trabalho.

À Profa. Dra. Cassiana Maria Reganhan Coneglian, ex-coordenadora do Departamento de Saneamento Ambiental do Centro Superior de Educação Tecnológica – CESET/UNICAMP/Limeira, pelo apoio, sugestões, incentivo e amizade.

Aos diretores do Centro Superior de Educação Tecnológica – CESET /UNICAMP / Limeira, que permitiram ausentar-me das atividades no Laboratório de Saneamento Ambiental para buscar novos conhecimentos e aprimoramento profissional.

Ao Centro Superior de Educação Tecnológica – CESET /UNICAMP / Limeira e ao Departamento de Botânica da Universidade Federal de São Carlos, pela infraestrutura necessária à realização deste trabalho.

Aos amigos do Laboratório Botânica – UFSCAR, ao técnico Luis Sartori, a Thais Bittar e Inessa pelo auxílio indispensável na realização dos cultivos e extrações.

Aos amigos do Laboratório CESET/UNICAMP - Gilberto de Almeida, Geraldo Dragoni, Josiane S. Vendemiatti e Anjaina F. Albuquerque, pela paciência, pelo incentivo e acima de tudo pela amizade.

A todos os bolsistas, alunos e amigos, que de alguma forma contribuíram para realização deste trabalho.

À minha família: João, Claudete, Olívia, Adieli, Emanuella, Gustavo, Juma, Thomy, Thaisa, Bruno, Norma, José Francisco, João Guilherme, Priscila, Victória, Willian, Vitória Cecília, Miguel, pelos momentos de alegria, pela amizade e pelo apoio.

Ao meu marido Wagner de Oliveira, pela compreensão, apoio incondicional e pela ajuda hoje e sempre.

A Deus, pela vida.

UM GRANDE HOMEM NÃO DESISTE DE SEUS SONHOS ...

Ádria Caloto de Oliveira

RESUMO

CALOTO-OLIVEIRA, A. - Toxicidade de elementos-traço para consumidores primários na presença de exopolissacarídeos produzidos por organismos fitoplanctônicos (Chlorophyceae e Cyanophyceae). 2007. 106f. Dissertação (Mestrado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2007.

O impacto causado pelo aumento da quantidade de substâncias químicas descartadas no meio ambiente está presente na maioria dos ecossistemas. Poluentes industriais contendo metais são frequentemente transportados para a água, o solo e o ar, podendo-se acumular nas cadeias tróficas e apresentar toxicidade para a biota. Em ambientes aquáticos, a biodisponibilidade e destino dessas substâncias xenobióticas podem ser influenciadas por vários fatores, entre eles a matéria orgânica dissolvida e outros compostos quelantes, os quais tem capacidade de aprisionar ou liberar íons para o ambiente. Os exopolissacarídeos, substâncias excretadas pelo fitoplâncton, podem interagir com diversas substâncias, interferindo na toxicidade dos compostos para os organismos ou comunidades biológicas aquáticas e, conseqüentemente, subestimando o verdadeiro valor tóxico das substâncias. Este trabalho foi conduzido para determinar a influência dos exopolissacarídeos da Clorofícea *Pseudokirchneriella subcapitata*, e da Cianofícea *Anabaena spiroides* na toxicidade dos elementos traço cádmio e cromo em *Daphnia similis* (Cladocera). Os metais foram escolhidos

pela afinidade por quelantes orgânicos. Foram realizados testes ecotoxicológicos agudos para verificar a sensibilidade do cladóceros *Daphnia similis* em diferentes concentrações dos metais cádmio (cloreto de cádmio) e cromo (dicromato de potássio), adicionando algas e exopolissacarídeos. Nos testes com os exopolissacarídeos foram utilizadas diferentes frações (excretado total, <10000D e >10000D). Para obtenção das frações de exopolissacarídeos foram realizadas filtrações tangenciais em cartucho oco de celulose com bomba peristáltica. Nos testes com a adição das algas foram usados números conhecidos de células obtidas do concentrado de algas. Observou-se redução da toxicidade de 20 a 30% nos testes com a adição de excretado total, e reduções menores para as frações < e > 10KD para as clorofíceas e cianofíceas. Com os resultados deste trabalho, foi possível avaliar a capacidade dessas substâncias em quelar e indisponibilizar compostos tóxicos e avaliar a toxicidade das substâncias quando testadas nos organismos planctônicos.

Palavras chave: Exopolissacarídeos, cromo, cádmio, *Anabaena spiroides*, *Pseudokirchneriella subcapitata*, *Daphnia similis*.

ABSTRACT

CALOTO-OLIVEIRA, A. - Toxicity of element-trace for primary consumers in the presence of exopolysaccharides produced by phytoplankton organisms (Chlorophyceae and Cianophyceae). 2007. 106f. Dissertation (Master's) - School of Engineering of São Carlos, University of São Paulo, São Carlos, 2007.

Chemical substances have been exerting increasing impact on ecosystems. Industrial pollutants containing metals frequently reach water bodies, soil, and air, wherein they may accumulate on the trophic chain, resulting in toxicity to the biota. In aquatic environments, the bioavailability and the destination of these xenobiotics are influenced by several factors, such as the amount of dissolved organic matter and other chelating compounds, since these substances can either bind or liberate ions to the environment. Exopolysaccharides, in particular, are excreted by phytoplankton and, once in water, can interact with several substances altering the toxicity of compounds to aquatic organisms and biological communities. As a consequence, the real toxic potential of these xenobiotics is underestimated. The aim of this work was to determine the influence of the exopolysaccharides produced by the Chloroficeae *Pseudokirchneriella subcapitata* and by the Cyanophyceae *Anabaena spiroides* on the toxicity of the trace-elements cadmium and chromium over the primary consumer *Daphnia similis*. These metals were chosen due to their high affinity towards organic chelators. Tests for acute ecotoxicity were performed to verify the sensitivity of the Cladocera *Daphnia similis* exposed to different cadmium (cadmium chloride) and chromium (potassium

dichromate) concentrations, with and without algae and/or exopolysaccharides. Three fractions of exopolysaccharides were tested (total excreted, < 1000D, and > 1000D), which were obtained by tangencial filtration through a cellulosis membrane using a peristaltical pump. On tests using algae, a fixed number of cells were obtained from an algae concentrate. The toxicity of *Daphnia similis* to the metals was 20-30% reduced when the total excreted from algae was added, while the reduction in toxicity was lower to the fraction < and > than 10KD. The results demonstrated that exopolysaccharides chelate toxic compounds rendering them unavailable for exerting their effects on planktonic organisms.

Keywords: Exopolysaccharides, chromium, cadmium, *Anabaena spiroides*, *Pseudokirchniriella subcapitata*, *Daphnia similis*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 01 – <i>Daphnia similis</i> .	37
Figura 02 – Câmara incubadora para cultivo de <i>Daphnia similis</i> .	39
Figura 03 – Água de cultivo ou de diluição (água mineral + adição de sais).	41
Figura 04 – Cultivo de <i>P.subcapitata</i> em meio WC.	45
Figura 05 – Clorofícea – <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i> – observação de células algais em microscópio óptico.	45
Figura 06 - Clorofícea – células de <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i> e a excreção dos polissacarídeos nas áreas esbranquiçadas no entorno das células	46
Figura 07 – Cultura de <i>Anabaena spiroides</i> em meio ASM-1 - TRIS	47
Figura 08 – Cianobactéria - <i>Anabaena spiroides</i>	48
Figura 09 – Cianobactéria – células de <i>A. spiroides</i> e a excreção dos polissacarídeos nas áreas esbranquiçadas no entorno das células	48
Figura 10 – Sistema de filtração tangencial	50
Figura 11 - Cultura de <i>P. subcapitata</i> e amostras extraídas na filtração tangencial: Concentrado de Algas e Fração de Polissacarídeo	51
Figura 12 - Cartucho de celulose usado na filtração tangencial	51
Figura 13 – Excretados fracionados armazenados em frascos	60

esterilizados

- Figura 14** – Ensaio ecotoxicológico no laboratório - LEAL 60
- Figura 15** – Valores de CE_{50} para os metais cádmio e cromo nos ensaios ecotoxicológicos realizados com as amostras de sensibilidade (metais), branco (metal+meio), exopolissacarídeos e concentrado de algas *P. subcapitata* cultivados em meio WC sem EDTA para *D. similis*. 65
- Figura 16** – Redução da Toxicidade de cádmio nos ensaios com amostras de *P. subcapitata* para concentrado de alga e exopolissacarídeos (excretado total, fração <10KD e fração >10KD) cultivados em meio WC sem EDTA para *D. similis*. 69
- Figura 17** – Redução da Toxicidade de cromo nos ensaios com amostras de *P. subcapitata* para concentrado de alga e exopolissacarídeos (excretado total, fração <10KD e fração >10KD) cultivados em meio WC sem EDTA para *D. similis*. 71
- Figura 18** – Valores de CE_{50} para os metais cádmio e cromo nos ensaios de sensibilidade (metais) e branco (metal+meio) com o meio ASM-1 com TRIS sem EDTA para *D. similis*. 74
- Figura 19** – Valores de CE_{50} para os metais cádmio e cromo dos ensaios ecotoxicológicos realizados com amostras de sensibilidade (metais), branco (metal+meio), exopolissacarídeos e concentrado de algas *P. subcapitata* cultivados em meio WC com EDTA para *D. similis*. 77

- Figura 20** – Estrutura química do complexante EDTA (BAIRD, 2002) 78
- Figura 21** – Redução da toxicidade de cádmio nos ensaios com as amostras de *P. subcaptata* para concentrado de alga e exopolissacarídeos (excretado total, fração <10KD e fração >10KD cultivados em meio WC com EDTA para *D. similis*. 82
- Figura 22** – Redução da toxicidade de cromo nos ensaios com as amostras de *P. subcaptata* para concentrado de alga e exopolissacarídeos (excretado total, fração <10KD e fração >10KD cultivados em meio WC com EDTA para *D. similis*. 84
- Figura 23** – Valores de CE₅₀ para os metais cádmio e cromo nos ensaios ecotoxicológicos realizados com as amostras de sensibilidade (metais), branco (metal+meio), exopolissacarídeos e concentrado de algas *A. spiroides* cultivados em meio ASM-1 com TRIS com EDTA para *D. similis*. 87
- Figura 24** – Redução da toxicidade de cádmio nos ensaios com as amostras de *A. spiroides* para concentrado de alga e exopolissacarídeos (excretado total, fração <10KD e fração >10KD) cultivados em meio ASM-1 + TRIS com EDTA para *D. similis*. 91
- Figura 25** – Redução da toxicidade de cromo nos ensaios com as amostras de *A. spiroides* para concentrado de alga e exopolissacarídeos (excretado total, fração <10KD e fração >10KD) cultivados em meio ASM-1 + TRIS com EDTA para *D. similis*. 93

LISTA DE TABELAS

Tabela 01 – Valores máximos permitidos do metal cromo nos corpos de água doce	15
Tabela 02 – Valores máximos permitidos do metal cádmio nos corpos de água doce	17
Tabela 03 – Padrões máximos permitidos de toxicidade nos corpos de água doce	32
Tabela 04 – Frações da cultura algal após filtração tangencial	50
Tabela 05 – Valores de CE_{50} ($mg.L^{-1}$) de cádmio em meio WC sem EDTA para o cladóceros <i>D. similis</i> .	64
Tabela 06 – Valores de CE_{50} ($mg.L^{-1}$) de cromo em meio WC sem EDTA para o cladóceros <i>D. similis</i> .	65
Tabela 07 – Correlação entre os valores de CE_{50} dos ensaios com cromo e cádmio com meio WC sem EDTA	68
Tabela 08 – Valores de CE_{50} ($mg.L^{-1}$) para ensaios com cádmio e cromo e meio ASM-1 com TRIS sem EDTA	73
Tabela 09 – Correlação dos valores de CE_{50} dos ensaios com cromo e cádmio, com meio ASM-1 com TRIS sem EDTA	74
Tabela 10 – Valores de CE_{50} em $mg.L^{-1}$ para ensaios com cádmio e meio WC com EDTA para <i>D. similis</i> .	76
Tabela 11 – Valores de CE_{50} em $mg.L^{-1}$ para ensaios com cromo e meio WC com EDTA para <i>D. similis</i> .	76

Tabela 12 – Correlação entre os valores de CE_{50} dos ensaios com cromo e cádmio com meio WC com EDTA	81
Tabela 13 – Valores de CE_{50} ($mg.L^{-1}$) de cádmio em meio ASM-1 com TRIS com EDTA para o cladóceros <i>D. similis</i> .	86
Tabela 14 – Valores de CE_{50} ($mg.L^{-1}$) de cromo em meio ASM-1 com TRIS com EDTA para o cladóceros <i>D. similis</i> .	86
Tabela 15 – Correlação entre os valores de CE_{50} dos ensaios com cromo e cádmio, com meio ASM-1 com TRIS com EDTA.	90
Tabela 16 – Valores de carbonos na cultura e no meio de cultivo WC com EDTA de <i>P. subcapitata</i> .	97
Tabela 17 – Valores de carbonos na cultura e no meio de cultivo WC sem EDTA de <i>P. subcapitata</i> .	98
Tabela 18 – Valores de carbonos na cultura e no meio de cultivo Asm-1 + TRIS com EDTA de <i>A. spiroides</i> .	100
Tabela 19 – Valores de carbonos na cultura e no meio de cultivo Asm-1 + TRIS sem EDTA de <i>A. spiroides</i> .	102
Tabela 20 – Análises de parâmetros físico-químicos e biológicos dos concentrados de algas usadas para alimentação dos testes.	103

LISTA DE SIGLAS

EPS	-	Polissacarídeos Extracelulares
TEP	-	Transparent Exopolymer Particles
EDTA	-	Ácido Etilenodiaminotetracético
CE₅₀		Concentração Efetiva Mediana
Cr		Cromo
Cu		Cobre
Fe		Ferro
Zn		Zinco
Cd		Cádmio
Hg		Mercúrio
Pb		Chumbo
CONAMA		Conselho Nacional do Meio Ambiente
PVC		Policloreto de vinila
CO₂		Gás Carbônico
ATP		Adenosina Tri-fosfato
P		Fósforo
N		Nitrogênio
C		Carbono
Ca		Cálcio
Mg		Magnésio
IBAMA		Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e Recursos Naturais Renováveis

CETESB	Companhia de Tecnologia e Saneamento Ambiental
OECD	Organization for Economic Cooperation and Development
USEPA	U.S. Environmental Protection Agency
APHA	American Public Health Association
ASTM	American Society for Testing and Materials
ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
NBR	Normas Brasileiras
BOD (DBO)	Demanda Bioquímica de Oxigênio
CRHEA	Centro de Recursos Hídricos e Ecologia Aplicada
CESET	Centro Superior de Educação Tecnológica
LEAL	Laboratório de Ecotoxicologia Aquática e Limnologia
D	Dalton (unidade referente ao tamanho de molécula)
KD	Kilo Dalton
WC	Meio de Cultura para <i>P. subcapitata</i>
ASM-1	Meio de Cultura para <i>A. spiroides</i>
TRIS	Tris(Hidroximetil)aminomethano
TOC	Carbono Orgânico Total
TC	Carbono Total
IC	Carbono Inorgânico
MOP	Matéria Orgânica Particulada
MOD	Matéria Orgânica Dissolvida
COD	Carbono Orgânico Dissolvido
COP	Carbono Orgânico Particulado

SUMÁRIO

Resumo	x
Abstract	xii
Lista de Figuras	xiv
Lista de Tabelas	xvii
Lista de Siglas	xix
Sumário	xxi
1 Introdução	1
2 Justificativa	7
3 Objetivos	9
3.1 Geral	9
3.2 Específicos	9
4 Revisão Bibliográfica	10
4.1 Presença de substâncias xenobióticas no ambiente aquático e sua toxicidade	10
4.1.1 O metal cromo	13
4.1.2 O metal cádmio	15
4.2 O fitoplancton	17
4.2.1 As clorofíceas	20
4.2.1.1 O gênero <i>Pseudokirchneriella</i>	22
4.2.2 As cianobactérias	23

4.2.2.1 <i>Anabaena spiroides</i>	26
4.3 Polissacarídeos excretados pelo fitoplancton	27
4.4 Testes ecotoxicológicos	31
5 Material e métodos	35
5.1 Zooplâncton	35
5.1.1 Escolha do organismo teste	35
5.1.2 Procedência dos organismos	37
5.1.3 Cultivo do organismo teste - Cladóceros	38
5.1.4 Água de diluição	40
5.1.5 Alimentação do Cladóceros	41
5.1.6 Testes de sensibilidade – <i>Daphnia similis</i>	41
5.1.7 Vidraria e material de cultivo	42
5.2 Fitoplâncton	43
5.2.1 Cultivo de algas para extração de polissacarídeos	43
5.2.1.1 Clorofíceas	43
5.2.1.2 Cianobactéria	46
5.3 Filtração tangencial	49
5.4 Contagem das células algais	52
5.5 Determinação do carbono orgânico total (TOC) nas culturas de <i>P. subcapitata</i> e de <i>A. spiroides</i> e nos polissacarídeos fracionados	53
5.6 Testes de toxicidade aguda – <i>Daphnia similis</i>	53
5.6.1 Testes ecotoxicológicos com metal cromo	55
5.6.1.1 Preparo da solução de dicromato de potássio	55

5.6.1.2 Solução de dicromato de potássio e polissacarídeos fracionados	55
5.6.1.3 Testes ecotoxicológicos	56
5.6.2 Testes ecotoxicológicos com metal cádmio	57
5.6.2.1 Preparo da solução de cloreto de cádmio	57
5.6.2.2 Solução de cloreto de cádmio e polissacarídeos fracionados	58
5.6.2.3 Testes ecotoxicológicos	58
5.7 Controle dos parâmetros físico-químicos nos testes de toxicidade	60
5.8 Tratamento estatístico	61
5.9 Cálculo para determinação da redução de toxicidade na presença de exopolissacarídeos	62
6 Resultados e discussão	64
6.1 Ensaio ecotoxicológico utilizando meio WC sem EDTA – <i>P. subcapitata</i>	64
6.1.1 Correlação entre os valores da substância-referência e os metais analisados	68
6.1.2 Redução da toxicidade de cádmio e cromo nas amostras de <i>P. subcapitata</i> sem EDTA	69
6.2 Ensaio ecotoxicológico utilizando meio ASM-1-TRIS sem EDTA – <i>A. spiroides</i>	73
6.3 Testes utilizando meio WC com EDTA e polissacarídeos de <i>P.</i>	75

subcapitata

6.3.1	Correlação entre os valores da substância-referência e os metais analisados	80
6.3.2	Redução da toxicidade de cádmio e cromo nas amostras de <i>P. subcapitata</i> com o meio contendo EDTA	82
6.4	Ensaio ecotoxicológico utilizando meio ASM-1-TRIS com EDTA e exopolissacarídeos extraídos de <i>A. spiroides</i>	85
6.4.1	Correlação entre os valores da substância-referência e os metais analisados	89
6.4.2	Redução da toxicidade de cádmio e cromo nas amostras de <i>A. spiroides</i> com EDTA	91
6.5	Carbono das culturas e dos meios	96
6.5.1	Carbono orgânico, inorgânico e total das culturas de <i>P. subcapitata</i> e meios de cultivo	96
6.5.2	Carbono orgânico, inorgânico e total das culturas de <i>A. spiroides</i> e meios de cultivo	99
6.6	Controle das amostras de concentrado de algas	102
7	Conclusões	105
8	Recomendações	107
9	Referências Bibliográficas	108
	Anexos	141

1 INTRODUÇÃO

Com o avanço da tecnologia produziu-se um conjunto de substâncias químicas que quando liberadas no meio ambiente podem ser potencialmente tóxicas às comunidades biológicas. A contaminação ambiental por estas substâncias é consequência da grande industrialização, da utilização crescente de veículos e de atividades agropecuárias e de mineração (MIYASHITA; NUVOLARI, 2003). O poluente, uma vez no ambiente, pode interagir e atingir diversos níveis na cadeia trófica por meio da bioacumulação e biomagnificação (FERNICOLA et al., 2003).

Dentre estas substâncias tóxicas podem-se classificar os ácidos, os metais pesados, os compostos orgânicos e a radioatividade. Os metais são tóxicos para a maioria das formas de vida. Estudos ecológicos revelam o movimento, transporte e a concentração desses poluentes através da cadeia alimentar, além da persistência e transformação desses elementos dentro dos ecossistemas (RICKLEFS, 1996).

Diversos metais têm papel essencial em várias etapas do metabolismo e do crescimento de plantas e animais. Entre esses metais encontra-se: cobalto, cromo, ferro, manganês, níquel, molibdênio, selênio, estanho e zinco (REZENDE; LACERDA, 1986). No entanto, a necessidade nutricional dos metais essenciais entre as espécies varia. Concentrações ideais encontram-se numa faixa estreita, a partir da qual já pode ser observado aumento significativo de mortalidade, em

razão da deficiência nutricional em casos de níveis baixos dos metais no meio ou por toxicidade associada ao excesso dessas substâncias. Alguns metais não essenciais, dentre eles o chumbo, o cádmio e o mercúrio, podem ser altamente tóxicos, mesmo em concentrações normalmente encontradas no ambiente (FERNICOLA et al., 2003).

A toxicidade de cada composto varia para cada espécie e dependerá das características de cada substância, como também da sua disponibilidade para incorporação biológica e de sua concentração química (REZENDE; LACERDA, 1986 ; CHAPMAN et al.,1996).

Os efeitos tóxicos são resultantes de interações bioquímicas entre os agentes tóxicos e algumas estruturas do organismo. A natureza dos efeitos pode variar de organismo para organismo (LU,1985).

Alguns metais associados possuem uma relativa facilidade de penetrar e permanecer nas cadeias tróficas por longos períodos, apresentando altos índices de toxicidade para os organismos mesmo em baixas concentrações. Por isso torna-se necessário monitorar e preservar os ecossistemas aquáticos da poluição ambiental antropogênica por metais pesados por meio do conhecimento de seus níveis de base (FERREIRA et al., 2000).

Entende-se por toxicidade a propriedade inerente de um agente químico produzir efeitos deletérios (agudos, subletais, letais ou crônicos) sobre um organismo (GOES,1998). A toxicidade é função da concentração, composição e propriedades, como também do tempo de exposição (LARINI; CECCHINI, 1997). Algumas substâncias em vez de se dispersarem tornam-se cada vez mais

concentradas à medida que passam entre os elos da cadeia alimentar (ODUM, 1988).

A presença dos elementos-traço cádmio e cromo ao longo do tempo representa uma ameaça para os ambientes aquáticos, podendo haver acúmulo ao longo da cadeia trófica (MASUTTI et al., 2000) destes elementos potencialmente tóxicos.

Poluentes como os metais tendem a se complexar com a matéria orgânica, inclusive os polissacarídeos, anulando ou diminuindo sua disponibilidade tóxica para os organismos presentes na coluna d'água (VIEIRA et al., 1994). Os polissacarídeos excretados pelo fitoplâncton podem interagir com metais e diminuir a toxicidade efetiva da concentração do metal.

Segundo Tien et al (2002) a ocorrência da eutrofização, como vem ocorrendo em muitos dos nossos ambientes aquáticos nos últimos anos, tende a aumentar o florescimento de muitas espécies de algas, como as cianobactérias e as clorofíceas e, conseqüentemente, a quantidade de polissacarídeos dissolvidos neste meio.

Os "blooms" fitoplanctônicos por sua natureza de curta permanência (dias ou semanas), podem ser determinantes para a composição do açúcar (monossacarídeo) dos polissacarídeos liberados (MEON; KIRCHMAN, 2001; GIROLDO; VIEIRA, 2002) através da fisiologia do fitoplâncton durante estes "blooms".

Soares (1992) demonstrou que em ambientes eutrofizados as concentrações de diferentes monossacarídeos representam indícios de que a

comunidade fitoplanctônica foi a principal contribuinte para a concentração de carboidratos dissolvidos no ambiente.

Os produtos da excreção por estas florações podem contribuir significativamente para o “pool” de carbono orgânico dissolvido (GOUVEIA et al., 2005) e ser uma fonte de polissacarídeo extracelular (EPS) para o sistema (DELLAMANO-OLIVEIRA, 2006).

Os polissacarídeos uma vez produzidos e liberados pelas células algais, participam da formação dos TEP (“Transparent Exopolymer Particles”), partículas mucilaginosas amorfas de tamanho variado que, por sua vez, por meio de choque e agregação, podem formar os agregados gelatinosos (“lake snow”) (ALLDREDGE et al., 1990), os quais são importantes na liberação e reciclagem de matéria orgânica (GROSSART; SIMON, 1993), no fluxo de carbono através da cadeia trófica e para o sedimento dos sistemas lacustres.

Os polissacarídeos extracelulares (EPS) podem ser usados como substratos pelas bactérias (FREIRE-NORDI; VIEIRA, 1998; COLOMBO et al., 2004), e passam a realizar um importante papel na possível associação específica bactéria/alga (GROSSART et al., 2003)

Uma das características da excreção algal de Matéria Orgânica Dissolvida é que os carboidratos são invariavelmente predominantes na composição do excretado. Estes carboidratos encontrados em corpos d’água naturais são constituídos por açúcares livres (monossacarídeos e dissacarídeos) e por carboidratos poliméricos hidrolisáveis, açúcares combinados como os polissacarídeos e oligossacarídeos (GREMM,1997). Os açúcares livres e combinados são liberados para o meio como resultado de excreção e morte das

células (MOPPER et al., 1992). A matéria orgânica dissolvida excretada pelo fitoplâncton pode ser considerada a base da cadeia alimentar do zooplâncton nos sistemas lacustres.

A presença no meio de certos carboidratos pode interferir na disponibilidade de íons metálicos que atuam como quelantes, diminuindo o efeito tóxico (DULCINI, 1996).

Para conduzir testes toxicológicos agudo de água comumente são utilizados organismos invertebrados, como as espécies de pulgas d'água, os cladóceros *Daphnia* spp. (BITTON; DUTKA, 1986). Os cladóceros são encontrados em todos os tipos de água doce mas geralmente os lagos e reservatórios possuem maior densidade que nos rios (TAVARES; ROCHA, 2003).

A toxicidade aguda é um estudo comparativo no qual organismos submetidos a diferentes tratamentos são observados por período curto de tempo, geralmente não constituindo uma parte substancial do seu ciclo de vida (LARINI, 1979). Testes agudos geralmente utilizam a imobilidade ou a mortalidade como efeito medido.

Na determinação da toxicidade dos compostos cádmio e cromo foi utilizado o consumidor primário *Daphnia similis*. Para avaliar a influência dos exopolissacarídeos sobre a toxicidade, foram escolhidas duas espécies de produtores primários: a clorófitas - *Pseudokirchneriella subcapitata*, espécie largamente utilizada em testes de toxicidade e a cianobactéria - *Anabaena spiroides*, comum em reservatórios do Estado de São Paulo. Os ensaios com os produtores primários objetivaram observar as interferências dos polissacarídeos sobre a redução do efeito tóxico de cromo e cádmio, quando adicionada as algas

nos ensaios ecotoxicológicos. Os testes com os exopolissacarídeos de ambas as algas ajudaram a aprofundar o conhecimento da possível interferência de seus excretados fracionados sobre as concentrações dos metais no meio.

2 JUSTIFICATIVA

O efeito tóxico dos metais na presença de exopolissacarídeos

Agentes complexantes naturais presentes na água são hábeis para diminuir a toxicidade dos metais adicionados à água superficial. Entretanto, é bem estabelecido que o íon metálico livre apresenta a maior biodisponibilidade se comparado às diversas substâncias presentes.

Os exopolissacarídeos são liberados para o meio aquático como resultado de excreção e morte das células, e o produto da excreção algal - matéria orgânica dissolvida (MOD), é composta por carboidratos. As concentrações de exopolissacarídeos liberadas no ambiente variam em função das espécies de algas abundantes.

Devido a importância ecológica dos exopolissacarídeos nos ecossistemas aquáticos, estudos com os polissacarídeos extracelulares (EPS) produzidos pelo fitoplâncton são realizados (GIROLDO; VIEIRA, 2005) e demonstram ser excelente indicador de matéria orgânica particulada e dissolvida, e a matéria orgânica dissolvida (MOD) presente no meio pode ser considerada a base da cadeia alimentar do zooplâncton nos ecossistemas lacustres. Como constituintes de substâncias húmicas e fúlvicas, levam a um melhor entendimento dos mecanismos da gênese da matéria orgânica complexa e pela susceptibilidade de

complexar-se com metais traços, podendo controlar a disponibilidade destes no meio aquático (LOMBARDI et al., 2000; NOGUEIRA et al., 2005).

Os exopolissacarídeos participam da formação dos TEPs (Transparent Expolymer Particles) – partículas mucilaginosas de tamanhos variados e da formação de agregados gelatinosos (lake snow). Auxiliam no fluxo de carbono através da cadeia trófica e no sedimento de sistemas lacustres, e na reciclagem de matéria orgânica e podem ser usados como substratos pelas bactérias – associação específica - bactéria/alga.

Os poluentes como metais tendem a se complexar com exopolissacarídeos anulando ou diminuindo sua disponibilidade para os organismos, reduzindo a sua toxicidade. Para aprofundar a avaliação dos efeitos desses compostos sobre os metais cádmio e cromo foram realizados estudos para a compreensão da eficiência dos exopolissacarídeos na diminuição dos efeitos tóxicos destes elementos.

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

- Verificar a influência dos polissacarídeos excretados de algas sobre a toxicidade dos metais cádmio e cromo nos organismos zooplanctônicos.

3.2 Específicos

- Determinar, através de testes ecotoxicológicos, a CE_{50} dos metais-traço cádmio e cromo para *Daphnia similis* na presença de diferentes frações de exopolissacarídeos produzidos por *P. subcapitata* e *A. spiroides*;
- Determinar, através de testes ecotoxicológicos, a CE_{50} dos metais-traço cádmio e cromo para *Daphnia similis* na presença de células de *P. subcapitata* e *A. spiroides*;
- Determinar, através de testes ecotoxicológicos, a influência do EDTA presente no meio de cultivo das espécies fitoplanctônicas estudadas na alteração da toxicidade de cádmio e cromo para *Daphnia similis*;

4 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

4.1 Presença de substâncias xenobióticas no ambiente aquático e sua toxicidade

Desde a Revolução Industrial, com o progressivo crescimento populacional e econômico, muitas foram às interferências antropogênicas nos recursos naturais (ESPÍNDOLA et al., 2000), seja para extrair os recursos necessários ao crescimento, seja para lançar detritos e as sobras resultantes das atividades. Assim, o solo, o ar e a água foram progressivamente contaminados pela poluição e os recursos minerais foram extraídos sem nenhum cuidado com a conservação do meio (MIYASHITA; NUVOLARI, 2003).

Processos influenciados por essas atividades antropogênicas podem contribuir para o aumento de concentrações de poluentes no solo e água. Entre eles estão: o escoamento superficial em áreas urbanas e agrícolas (JERGENTZ et al., 2004); os processos de descarga de mineração, indústria e deságüe municipais; a deposição atmosférica (NIMMO, 1985; LELAND; KUWABARA, 1985); a percolação através do solo previamente contaminado (SINGH et al., 2000; PANG; LETEY, 1999); descargas acidentais (ORTIZ et al., 2003; TAYLOR et al., 1996); lavagem de equipamento de aplicação e manuseio inadequado de embalagens para descarte (HURTIG et al., 2003; FELSOT et al., 2003).

Com o avanço da tecnologia produziu-se um conjunto de substâncias químicas com efeitos adversos à comunidade aquática. Dentre essas substâncias tóxicas estão os ácidos, os metais pesados, os compostos orgânicos e a radioatividade. Os metais são potencialmente tóxicos para a maioria das formas de vida. Estudos ecológicos revelam o movimento e a concentração dos metais através da cadeia alimentar, bem como a persistência e transformação desses elementos dentro dos ecossistemas (RICKLEFS, 1996).

Os poluentes são distribuídos pela ação da água, podendo ou não permanecer em solução por longos períodos de tempo. Dependendo das características físico-químicas do composto, parte dele poderá volatilizar ou poderá se adsorvido ao material suspenso e ao sedimento. Ou ainda, poderá ingressar nos organismos aquáticos, nos quais poderá se acumular, sofrendo determinado grau de metabolização e excreção, exercendo eventualmente seu efeito tóxico (NIMMO, 1985).

Os metais são poluentes conservativos e o acúmulo destes elementos representa uma ameaça para os ambientes, podendo atravessar todo o ciclo ecológico envolvido no ecossistema (MASUTTI et al., 2000).

A toxicidade de cada metal é bastante variável e depende das características de cada elemento, de sua disponibilidade para incorporação biológica, de sua concentração e forma química, bem como de sua essencialidade em processos metabólicos ao longo da vida do organismo (REZENDE; LACERDA, 1986).

Alguns metais são componentes naturais dos organismos e a grande maioria é encontrado em concentrações traço. Estes elementos podem ser

classificados como essenciais e não-essenciais, devido a alguns deles possuírem funções biológicas.

Os elementos Cr, Cu, Fe e Zn são essenciais pois participam dos processos de compostos enzimáticos fazendo parte do sistema aceptor/doador de elétrons em muitos organismos (LACERDA et al., 1989). Elementos não-essenciais como o Cd, Hg e Pb, por não serem necessários às funções biológicas, podem apresentar efeitos tóxicos crônicos e agudos, mesmo quando em baixas concentrações, principalmente por meio de mecanismos de competição por sítios de ligação com os metais essenciais (FERNICOLA et al., 2003).

Os altos índices de toxicidade de alguns metais para os organismos, mesmo em baixas concentrações, associados a sua relativa facilidade de entrar e permanecer nas cadeias tróficas por longos períodos reforçam a importância de estudos que determinem suas concentrações em ambientes aquáticos (FERNICOLA et al., 2003).

A maior parte das águas naturais possui certa capacidade de reduzir a toxicidade dos metais adicionados a ela, devido à presença de ligantes que podem complexar os íons metálicos, diminuindo também a biodisponibilidade de metais para os organismos (VIEIRA et al., 1994). O comportamento de metais em sistemas aquáticos é altamente complexo devido ao grande número de possíveis interações com componentes particulados e dissolvidos fora das condições de equilíbrio.

4.1.1 O metal cromo

O cromo é um metal cinza-aço, com forma cristalina cúbica, sem odor e muito resistente à corrosão. O cromo é o sétimo mais abundante metal na Terra como um todo. O metal não é encontrado livre na natureza. Os estados de oxidação mais comuns do cromo são: +2, +3, +6. São mais estáveis as formas tri e hexavalente, além da forma elementar, aparecendo na composição de óxidos, sulfatos, cromatos, dicromatos, sais básicos e na forma elementar recobrando peças metálicas e plásticas (SILVA, 2003).

O cromo é encontrado naturalmente em rochas, animais, plantas, solo, poeiras e névoas vulcânicas. Somente as formas tri e hexavalente são importantes para saúde humana. A maior parte do cromo liberado na água deposita-se nos sedimentos. O cromo VI é acumulado pelos organismos aquáticos por difusão passiva (SILVA, 2003).

O cromo é um elemento geralmente abundante na crosta terrestre. Entre as fontes naturais de contaminação ambiental estão os incêndios florestais e as erupções vulcânicas. As fontes antropogênicas derivam das principais atividades humanas nas quais o cromo e seus compostos são liberados para o meio ambiente. Emissões decorrentes de fábricas de cimento, soldagem de ligas metálicas, fundições, manufatura de aço e ligas, indústria de galvanoplastia, lâmpadas, minas, lixos urbano e industrial, incineração do lixo, cinzas de carvão, curtumes, fertilizantes (SILVA, 2003), são algumas das atividades responsáveis pela disponibilização deste elemento no ambiente.

Os processos de transformação que as espécies de cromo sofrem na atmosfera, água e solo, dependem de vários fatores como pH, potencial redox, das espécies presentes aliada às condições aeróbicas e complexantes orgânicos presentes. O número de complexos e quelatos de cromo é elevado variando da forma hexavalente, ou complexos tetra-aquosos, para aquelas com ácidos orgânicos, vitaminas e aminoácidos (SILVA, 2003).

O cromo é um elemento traço essencial para os sistemas biológicos em determinados níveis de concentração, porém pode ser potencialmente tóxico quando estes níveis são ultrapassados.

Em algas, assim como em plantas, a toxicidade do cromo e de alguns metais está associada à inibição do transporte de elétrons na fotossíntese e da síntese de pigmentos fotossintéticos, destruição da membrana de cloroplastos e decréscimo intracelular das concentrações de Na^+ e K^+ (FATHI; EL-SHAED, 2000; RAI; RAI, 1997; CID et al., 1997).

Entretanto, a tolerância de algas e de outros organismos para o cromo tem sido demonstrada, propondo-se mecanismos para este fenômeno tais como: ligação do metal a constituintes da parede celular e complexação com ácidos orgânicos com conseqüente remoção para os vacúolos (WHO, 1998, MOENNE, 2001).

Diversos estudos sobre bioacumulação de metais foram realizados com organismos aquáticos, desde peixes de diversas espécies (KALAY et al., 1999; LIANG et al., 1999, WHO, 1988), algas, plantas aquáticas, moluscos (CAMPANELLA et al., 2001), ostras (FRIAS-ESPERICUETA et al, 1999), camarões sete-barbas (MANTELATTO et al., 1999) e também em nematódeos e

boto - mamífero aquático (SZEFER et al., 1998). Os resultados evidenciaram concentrações elevadas do metal cromo nas amostras observadas, sendo que quanto maior o nível trófico na cadeia alimentar, maior o poder de bioacumulação.

Segundo a resolução 357 - CONAMA (BRASIL, 2005), as concentrações máximas permissíveis para o cromo em corpos de águas doces que visam à proteção das comunidades aquáticas seguem na Tabela 01.

Tabela 01 – Valores máximos permitidos do metal cromo nos corpos de água doce

Padrões de Classificação		Cromo total
1	Classe 1 – águas doces	0,05 mg.L ⁻¹
2	Classe 2 – águas doces	0,05 mg.L ⁻¹
2	Classe 3 – águas doces	0,05 mg.L ⁻¹
3	Classe 4 – águas doces	----
4	Padrões de Emissão de Efluentes	0,5 mg.L ⁻¹ *

* Em concordância ao artigo 35 da Resolução 357 – Conama – 17/03/2005.

4.1.2 O metal cádmio

O cádmio pode ocorrer em processos relativos a fontes naturais através de rochas, incêndios em florestas e vulcões, mas é oriundo principalmente de atividades humanas como a queima de carvão mineral, recobrimento de aço e ferro, como estabilizador para PVC, pigmentos para plástico e vidro, fabricação de baterias níquel-cádmio e em ligas metálicas, resíduos indústrias e domésticos,

processos de mineração e refino de metais. A contaminação das águas se dá principalmente pela disposição inadequada dos resíduos e pode ocorrer possível derrame de resíduos e efluentes contaminados (CHASIN; CARDOSO, 2003; BAIRD, 2002).

Concentrações excessivas de cádmio em ecossistemas aquáticos podem causar toxicidade, inibir a mineralização do nitrogênio e fósforo e reduzir a diversidade de fungos (CHASIN; CARDOSO, 2003).

Em água doce o cádmio está presente na forma de cádmio (+2), hidróxido de cádmio e complexos de carbonato de cádmio. Em águas com teor elevado de matéria orgânica mais da metade está sob forma de complexos orgânicos. Compostos de cádmio como sulfito, carbonato e óxido, são praticamente insolúveis em água, porém na presença de ácidos, luz ou oxigênio, podem ser transformados em sais solúveis (CHASIN; CARDOSO, 2003).

O cádmio é acumulado por plantas aquáticas e terrestres e se concentra no fígado e rins dos animais que se alimentam destas plantas (BAIRD, 2002; WHO, 1992). Também são bioacumulados por anfípodos (CASINI; DEPLEDGE, 1997), ostras (BOU-OLAYAN et al., 1995), mexilhões (BELLOTTO; MIEKELEY, 2000), moluscos (FERREIRA et al., 2000), crustáceos (MASUTTI et al., 2000) e peixes (LIANG et al., 1999; DE CONTO CINIER et al., 1998). Proporcionalmente a concentração do metal se eleva quanto maior for o nível trófico do organismo.

O cádmio é considerado um poluente persistente, pois acumula-se na cadeia alimentar. Esse metal é visto como um poluente prioritário para o monitoramento, e foi incluído na lista de substâncias e processos considerados

potencialmente perigosos ao planeta, IRPTC (International Register of Potentially Toxic Chemical of United Nations Environment Program).

Segundo a resolução 357 - CONAMA (BRASIL, 2005), as concentrações máximas permissíveis para o cádmio em corpos de água doces que visam à proteção das comunidades aquáticas, seguem na Tabela 02.

Tabela 02 - Valores máximos permitidos do metal cádmio nos corpos de água doce

Padrões de Classificação		Cádmio total
1	Classe 1 – águas doces	0,001 mg.L ⁻¹
2	Classe 2 – águas doces	0,001 mg.L ⁻¹
2	Classe 3 – águas doces	0,01 mg.L ⁻¹
3	Classe 4 – águas doces	-----
4	Padrões de Emissão de Efluentes	0,2 mg.L ⁻¹ *

* Em concordância ao artigo 35 da Resolução 357 - Conama – 17/03/2005.

4.2 O fitoplâncton

No ambiente aquático pode-se encontrar representantes de todos os grupos de algas. Os principais grupos que apresentam relevância sanitária são as cianofíceas, clorofíceas, diatomáceas e fitoflagelados, sendo as cianofíceas consideradas as mais problemáticas devido ao potencial tóxico e riscos à saúde pública (ZAGATTO et al., 1997).

Do ponto de vista ecológico, as algas representam um grupo cosmopolita, ocorrendo na superfície de todos os tipos de solo tendo, porém, sua maior distribuição nas águas (BICUDO; BICUDO, 1970) onde constituem os principais produtores primários de compostos orgânicos de carbono. São, portanto, parte fundamental da cadeia alimentar nos ecossistemas aquáticos (ROUND, 1973).

Aproximadamente 70% da superfície do planeta está coberta por águas superficiais e a importância das algas nestes compartimentos ambientais reside nos processos de conversão de energia solar em energia química que circula através da cadeia alimentar, com liberação de oxigênio como importante subproduto (ROST, 1984).

O crescimento de algas é resultado do enriquecimento das águas com nutrientes (TUNDISI, 1998) e da integração de fatores físicos, químicos e bióticos (BRANCO, 1986). Luz e nutrientes são os principais fatores que alteram a produção fotossintética, e suas disponibilidades influenciam diretamente a densidade e a composição da comunidade fitoplanctônica (CALIJURI et al, 2006). Nestes ambientes eutrofizados é possível observar concentrações significativas de polissacarídeos provenientes da excreção de algas.

Devido a grande entrada de nutrientes nos ecossistemas aquáticos, algumas consequências podem ser apontadas como: aumento da biomassa e produção primária do fitoplâncton, diminuição da diversidade de espécies, consumo do oxigênio dissolvido em larga escala, diminuição da concentração de íons, aumento de fósforo total no sedimento e como consequência um aumento na proliferação de algas (TUNDISI, 1998), além de baixa transparência e uma proporção elevada de cianobactérias (VON SPERLING, 1996).

As algas muitas vezes podem encontrar condições favoráveis para o crescimento como elevada quantidade de nitrogênio e fósforo, e luminosidade, com isso, poderão atingir uma superpopulação (TUNDISI, 2001). O aumento da carga de nutrientes nos ambientes aquáticos resulta no transporte de poluentes pela biota afetando a cadeia alimentar e o ecossistema (SKEI et al., 2000). Um bioproduto das explosões de algas são as grandes concentrações de carbono orgânico dissolvido (TUNDISI, 1992).

Alta concentração de nutrientes, turbulência reduzida e elevadas temperaturas, como observado em mananciais brasileiros, tornam propícias as florações de algas, muitas vezes dominadas pelas cianobactérias (SANT'ANNA et al., 2006).

Os sintomas da eutrofização incluem espuma de algas e toxinas derivadas de seu florescimento, grandes infestações de plantas aquáticas, maior incidência de doenças hidricamente transmissíveis, águas turvas, odores fétidos, água com mal paladar, depleção do oxigênio dissolvido e mortandade de peixes (TUNDISI, 2001).

Estudos realizados por Lukak e Aegerter (1993) demonstram que o fitoplâncton utiliza alguns metais como elementos essenciais, mas em concentrações elevadas estes metais tornam-se tóxicos. As algas fitoplanctônicas apresentam afinidade por cátions polivalentes e promovem a remoção do metal da água, auxiliando na depuração do ambiente. Este fato resulta em aumento da disponibilidade do metal para o seu crescimento, mas através do grazing, ocorre transferência do seu conteúdo celular como alimento para organismos superiores.

Para este trabalho foram desenvolvidos experimentos com a clorofícea *Pseudokirchneriella subcaptata* e com a cianofícea *Anabaena spiroides*, as quais são descritas a seguir.

4.2.1 As Clorofíceas

As algas da classe Chlorophyceae, ou algas verdes, contêm os pigmentos clorofila a e b e o amido como reserva. A presença destes pigmentos sustenta a idéia de que as algas verdes tenham sido as ancestrais das plantas por serem estas possuidoras destes tipos de clorofila (VIDOTTI; ROLLEMBERG, 2004). As algas verdes diferem do resto dos outros eucariontes por formar seus compostos de reserva no cloroplasto, ao invés do citoplasma (LEE, 1989).

As classes de clorofíceas mais freqüentes no fitoplâncton são Chlorophyceae e Zygnemaphyceae. As Chlorophyceae possuem aproximadamente 8000 espécies conhecidas (ESTEVEZ, 1998).

As clorofíceas são fotoautotróficas embora algumas cresçam heterotroficamente. Através da fotossíntese, produzem oxigênio e utilizam o dióxido de carbono como única fonte de carbono. Os organismos autotróficos utilizam o ATP como fonte de energia para fixação do CO₂ (PELCZAR, et al., 1997).

Organismos fotossintetizantes, como as algas, possuem além das mitocôndrias, as organelas citoplasmáticas, geradora de energia conhecida como cloroplastos. Estes cloroplastos apresentam um tipo de clorofila denominada

clorofila-a, fundamental para a realização da fotossíntese. Esse pigmento ocorre em praticamente todos os organismos fotossintetizantes sendo as bactérias fotossintetizantes a exceção, pois possuem a bacterioclorofila (ALEXOPOULUS; BOLD, 1967).

O produto da fotossíntese dos organismos clorofilados eucariontes podem ser armazenados nas células sob a forma de polissacarídeos de diversos tipos que variam de acordo com o grupo. Algumas algas armazenam o alimento sob forma de gotas de óleo que podem estar localizadas no interior dos plastos ou no citoplasma (LOPES, 1992).

A composição química do meio tem grande influência sobre a distribuição vertical do fitoplâncton. Dentre os compostos destacam-se nutrientes essenciais (P, N, C, Ca, Mg, etc), compostos derivados do metabolismo da própria comunidade fitoplanctônica (carboidratos, antibióticos, vitaminas e toxinas) e gases dissolvidos (oxigênio, metano e gás sulfídrico) (ESTEVES, 1998).

A reprodução pode ser realizada por bipartição (cissiparidade) ou por esporulação. Apenas as algas unicelulares, pertencentes a classe Chlorophyceae, como o gênero *Chlamydomonas*, reproduzem por bipartição.

A reprodução assexuada por esporulação ocorre tanto nas clorofíceas unicelulares como nas multicelulares. Os esporos podem ser móveis, sendo neste caso denominados zoósporos, ou imóveis, chamados de aplanósporos. Nas algas verdes existem espécies que produzem zoósporos e outras que produzem aplanósporos. Na reprodução sexuada das algas verdes unicelulares, os próprios indivíduos atuam como gametas, unindo-se dois a dois e dão origem a um zigoto (LOPES, 1992).

4.2.1.1 O gênero *Pseudokirchneriella*

Dentro do filo Chlorophyta, o gênero *Pseudokirchneriella* faz parte da classe Chlorophyceae na qual uma das características das células é possuir simetria externa radial ou próxima de radial (LEE, 1989).

O gênero *Selenastrum*, originalmente descrito, foi descoberto em 1867 pelo pesquisador Reinsch. Este gênero compreende 6 a 8 espécies distribuídas pelo mundo todo. Suas células são lunadas e aparecem isoladas ou em grupos de quatro, agregadas pela margem convexa, constituindo colônias múltiplas (BICUDO; BICUDO, 1970). Armazenam seu alimento como amido verdadeiro e têm parede celular rígida composta de celulose com substâncias pépticas incorporadas na estrutura da parede (PELCZAR-JR, 1997).

A espécie que mais tem sido citada na literatura dentro deste gênero é a *Selenastrum capricornutum*. Também são mencionadas outras espécies como *Selenastrum bibraianum*, *S. gracile* (PIERRE, 2001) e *S. minutum* (RIVOAL et al., 2002; THEODOROU et al., 1991). É importante destacar que nos últimos anos a espécie *S. capricornutum* foi também denominada por alguns autores como *Pseudokirchneriella subcapitata* (FIORENTINO et al., 2003; HEIJERICK et al., 2002) ou *Raphidocelis subcapitata* (MUYSSSEN; JANSSEN, 2001; EVANDRI et al., 2003).

Como todas as algas do filo Chlorophyta de água doce, estes organismos possuem uma distribuição cosmopolita em solos e corpos d'água (LEE, 1989 ; KEDDY, 1995), motivo pelo qual tem sido amplamente utilizada em estudos de ecotoxicidade de poluentes ambientais (KASAI; HATAKEYAMA, 1993; KONG et

al., 1998; JONSSON et al., 1993) e de ser recomendada no registro de agentes químicos e pesticidas por órgãos nacionais (CETESB, 1990 ; IBAMA, 1989; JONSSON; MAIA, 1999) e internacionais (OECD, 1981; U.S.E.P.A., 1994).

Desde o começo dos anos 70 as algas são utilizadas para avaliação da toxicidade aquática de compostos químicos e misturas químicas e para avaliar o aumento na eutrofização. Esses testes foram inicialmente designados para avaliar a adição de nutrientes, em especial nitrogênio e fósforo, para avaliar a eutrofização. O procedimento posteriormente adaptado para uso em testes toxicológicos e o resultado de testes com a alga verde de água doce *Pseudokirchneriella subcapitata* tornou-se o principal apoio para avaliar a toxicidade de compostos químicos e efluentes (WARD et al., 2002).

A espécie *P. subcapitata* mostrou ser excelente para a avaliação do efeito de poluentes no meio ambiente. Bossuyt e Janssen (2004) realizaram testes com *Pseudokirchneriella subcapitata* expondo-as à diferentes concentrações de cobre num período de 3 dias. Os efeitos avaliados do cobre demonstraram alterações no crescimento, na pigmentação, na biomassa e na tolerância da alga ao metal.

4.2.2 As cianobactérias

As cianobactérias, também chamadas de algas azuis, constituem um grupo de organismos que possuem características tanto de bactérias como de algas. Elas são informalmente consideradas algas pela presença de clorofila-a, liberação de oxigênio como resultado da fotossíntese e quebra da molécula da água durante

esta reação. As características básicas de bactérias é por serem procariontes e apresentarem parede celular sem celulose, constituída de polissacarídeos ligados a polipeptídios, membrana plasmática, cápsula ou bainha mucilagínosa, nucleóide, ribossomos, inclusões de fosfato, proteínas e lipídeos (não possuem amido, mas grânulos de cianoficina – composto de reserva que forma grânulos de poliglucanos, semelhante ao glicogênio), citoplasma e lamelas fotossintéticas (tilacóides) (CALIJURI et al., 2006). Podem apresentar-se sob diferentes formas: colônias esféricas, ovais ou tabulares e também em filamentos (GOODWIN, 1996). As cianobactérias estão classificadas como classe Cyanophyceae, composta de 150 gêneros e aproximadamente 2400 espécies (SKULBERG et al., 1993). De acordo com Sant`anna e Azevedo (2000), a espécie *Microcystis aeruginosa* apresenta a distribuição mais ampla no Brasil e a *Anabaena* é o gênero com maior número de espécies potencialmente tóxicas - *A. spiroides*, *A. circinalis*, *A. flos-aquae*, *A. planctonica* e *A. solitaria*.

Estes organismos recebem diferentes denominações como: cianobactérias - apresentam este nome pela semelhança com as bactérias e por não apresentarem núcleo e estruturas definidas; cianofíceas - por serem fotossintetizantes e produtores primários como as algas eucariontes e, cianoprocariontes porque são procariontes e não possuem núcleo verdadeiro. Não contém material celular diferenciado dentro de membranas formando estruturas como plastos e mitocôndrias (CHORUS; BARTRAM, 1999).

O nome popular desses organismos, algas azuis, vem da coloração verde azulada das células quando vistas ao microscópio. Isto ocorre porque suas células contêm pigmentos fotossintetizantes, como clorofila, que confere cor esverdeada e

a ficocianina que confere cor azulada, além da ficoeritrina responsável pela cor avermelhada (SOUZA, 2006). Esses pigmentos fotossintetizantes das cianobactérias estão localizados nos tilacóides, próximos das células periféricas dentro do falso citoplasma - protoplasma (CHORUS; BARTRAM, 1999).

As cianobactérias podem ser encontradas nos mais diversos tipos de ambientes, podendo ser terrestres, de água doce, salobra ou marinha além de habitats extremos como fontes termais, neve e deserto (PELCZAR, 1998).

As florações de cianobactérias podem causar danos à saúde pública (produção de toxinas) e são definidas em termos de concentração de células. Pode-se quantificar a densidade e biomassa de cianobactérias de diversas formas, seja diretamente pelo número de células ou do número de organismos, por estimativa de biomassa (biovolume) ou indiretamente pela medida de clorofila a. Alguns autores consideram floração quando da ocorrência de $>10\text{mg}\cdot\text{m}^{-3}$ de clorofila a, >20.000 células de cianobactérias. mL^{-1} ou $>2 \text{ mm}^3 \cdot \text{L}^{-1}$ (SOUZA, 2006).

Florações superficiais que formam natas e que podem mudar a coloração da água são compostas por cianobactérias que possuem aerótopos - vesículas gasosas - em suas células, possibilitando a sua flutuação e permanência na superfície (SOUZA, 2006).

Cianobactérias de vários gêneros e espécies que formam florações produzem toxinas. Essas toxinas são conhecidas como cianotoxinas por constituírem uma fonte de produtos naturais tóxicos produzidos por estes microrganismos. As causas da produção dessas toxinas, embora não estejam

devidamente esclarecidas, podem estar associadas a uma função protetora contra a herbivoria (CARMICHAEL, 1992).

Diversos fatores ambientais como luz, temperatura, concentração de nutrientes e pH podem influenciar na produção de toxinas, porém a toxicidade parece ser fator determinante da estrutura genética do florescimento. As toxinas presentes na água doce são produzidas quase que exclusivamente por cianobactérias. Os vários gêneros e espécies de cianobactérias produzem diferentes compostos tóxicos classificados como neurotoxinas, hepatotoxinas, citotoxinas e endotoxinas (TUNDISI, 2001).

4.2.2.1. *Anabaena spiroides*

As algas do gênero *Anabaena* possuem células em forma de contas, espiraladas, com conteúdo homogêneo ou granuloso e com ou sem pseudovacúolos, as quais estão dispostas em tricomas unisseriados e simples. Apresentam heterocistos intercalares, maiores que as células vegetativas. Os acinetos, encontrados em relação ou não com os heterocistos, são maiores que as outras células do filamento e com conteúdo mais denso e granuloso. Quando formam colônias, apresentam forma indefinida devido à inconsistência da mucilagem colonial (VAN DEN-HOECK et al., 1997).

Os heterocistos destas algas podem ser distinguidos das células vegetativas pela coloração amarelada e pela ausência de grânulos de reserva e vacúolos gasosos. Eles possuem a função de fixar o nitrogênio atmosférico.

Dentro do heterocisto forma-se um ambiente livre de oxigênio no qual o nitrogênio pode ser fixado. A produção de heterocisto é estimulada em situações nas quais existe deficiência de nitrogênio combinado no ambiente (VAN DEN- HOECK et al., 1997).

Anabaena spiroides é encontrada em reservatórios por todo país e em alguns reservatórios do Estado de São Paulo é encontrada em altas densidades (NOGUEIRA, 2002), sendo portanto, uma das grandes contribuintes para a matéria orgânica de origem algal neste ambiente. A concentração de matéria orgânica dissolvida no ambiente aquático influencia a disponibilidade de elementos-traço, além de servir como veículo para o transporte destes elementos através da coluna d'água e para a cadeia trófica, via ingestão dessa matéria orgânica contaminada (BREMER; LOUTIT, 1986).

4.3 Polissacarídeos excretados pelo fitoplâncton

A importância ecológica nos ecossistemas aquáticos é demonstrada por estudos com os polissacarídeos extracelulares (EPS) produzidos pelo fitoplâncton (GIROLDO; VIEIRA, 2005) e mostram ser excelente indicador de matéria orgânica particulada e dissolvida. Como constituintes de substâncias húmicas e fúlvicas, levam a um melhor entendimento dos mecanismos da gênese da matéria orgânica complexa e pela susceptibilidade de se complexarem com metais traços, podendo

controlar a disponibilidade destes no meio aquático (LOMBARDI et al., 2000; NOGUEIRA et al., 2005).

Poluentes como metais tendem a se complexar com a matéria orgânica, inclusive os polissacarídeos, anulando ou diminuindo sua disponibilidade tóxica para os organismos presentes na coluna d'água. Os polissacarídeos excretados pela cultura de algas podem interagir com metais e diminuir a toxicidade efetiva da concentração do metal (VIEIRA et al., 1994).

Os exopolissacarídeos apresentam propriedades quelantes a diversas substâncias e quando se complexam com os metais, os retiram das camadas superiores da coluna d'água (epilímno) podendo ocorrer acumulação desses poluentes na camada sedimentar (BERNI et al., 2003).

Nos cultivos de algas sob variadas concentrações de nitrato, a produção de carboidratos na fase de indução é alta e baixa na fase exponencial, sendo as maiores taxas de liberação de carboidratos observadas na fase estacionária de crescimento (LOMBARDI et al., 1998).

Estudos com algas cianofíceas realizados por Jardim e Pearson (1984), mostraram que na presença de concentrações estressantes de cobre, a alga têm capacidade de liberar substâncias extracelulares capazes de detoxificar e complexar metais, além de reduzir as concentrações de cobre disponíveis na água.

Jensen et al (1982) observaram que componentes intracelulares têm a capacidade de seqüestrar quantidades significativas de metais. Entre eles os polifosfatos atraem os metais devido à sua carga negativa de superfície e se ligam aos metais, enquanto os lipídeos podem se ligar aos metais mas não são

considerados os agentes de maior sítio de ligação e as proteínas aparentemente são os maiores quelantes de metais.

Os carboidratos se associam entre si formando oligo e polissacarídeos e também às proteínas formando glicoproteínas e aos lipídeos, formando glicolipídeos. Tais complexos macromoleculares desempenham importante papel funcional tanto atuando como reserva metabólica para as células como desempenhando papel estrutural e em muitos casos, participando ativamente de fenômenos de reconhecimento celular (LEHNINGER, 1990).

Uma das características da excreção algal de matéria orgânica dissolvida é que os carboidratos são invariavelmente predominantes na composição do excretado. Estes carboidratos encontrados em corpos d'água naturais são constituídos por açúcares livres (monossacarídeos e dissacarídeos) e por carboidratos poliméricos hidrolisáveis, açúcares combinados como os polissacarídeos e oligossacarídeos (GREMM,1997). Os açúcares livres e combinados constituem grande fração da maioria dos organismos e até 60% do peso seco de algumas algas (MOPPER et al., 1992) e são liberados para o meio como resultado de excreção e morte das células.

No caso de microalgas clorofíceas de água doce os carboidratos são geralmente heteropolissacarídeos complexos que são muito parecidos com as pectinas. A matéria orgânica dissolvida excretada pelo fitoplâncton pode ser considerada a base da cadeia alimentar do zooplâncton. Além disto, a presença no meio de certos carboidratos pode interferir na disponibilidade de íons metálicos, atuando como quelantes e diminuindo o efeito tóxico (DULCINI,1996).

Açúcares e amidos são carboidratos, a fonte primária de energia nas células. Alguns carboidratos também são encontrados nas paredes celulares microbianas enquanto outros servem como fonte de reserva nutritiva e atuam como precursores das proteínas, lipídeos e ácidos nucleicos. Os carboidratos tem fórmula geral $(CH_2O)_n$, onde n é qualquer número inteiro. (LEHNINGER, 1990). Eles apresentam estruturas simples ou contém um grande número de moléculas arranjadas de maneira complexa (LOPES, 1992).

Quando um grande número de monossacarídeos está ligado entre si, como na molécula de amido, o resultado é denominado polissacarídeo. Estes compostos geralmente não são solúveis em água mas são importantes na estrutura das células e no armazenamento de energia. São exemplos de polissacarídeos a dextrana, sintetizada por bactérias e a celulose, encontrada nas paredes celulares de plantas e da maioria das algas (PELCZAR et al., 1997).

Dellamano-Oliveira (2006) observou que os polissacarídeos foram os principais carboidratos extracelulares liberados pelo fitoplâncton no reservatório de Barra Bonita e que as concentrações destes carboidratos variaram em função da dinâmica das espécies abundantes. Estudos realizados por Colombo et al (2004) determinaram porcentagens de arabinose (22%) e de glicose (29%) em amostras de *Anabaena spiroides*, coletada no reservatório de Barra Bonita. Nicolaus et al (1999) encontraram grande quantidade de glicose e galactose em amostras de *Anabaena sp*, *Anabaena tortulosa* e *Phormidium sp*.

4.4 Testes ecotoxicológicos

O aumento constante na quantidade de poluentes nos ecossistemas exige o estabelecimento de uma nova ciência com base nos estudos dos efeitos ecológicos destas substâncias (BOUDOU; RIBEYRE, 1989).

Thuhaut (1978) define que a ecotoxicologia está relacionada aos efeitos tóxicos das substâncias químicas e dos agentes físicos sobre os organismos vivos, especialmente em populações e comunidades dentro de um ecossistema definido e inclui os caminhos de transferência desses agentes e sua interação com o ambiente. De acordo com Boudou e Ribeyre (op cit) o princípio fundamental da Ecotoxicologia é baseado na análise de processos de transferência de contaminantes nos ecossistemas e nos efeitos sobre sua estrutura e funcionamento.

A utilização de testes ecotoxicológicos tem se consolidado como importante ferramenta para compreensão dos impactos provocados por agentes químicos nas comunidades biológicas (CAIRNS; PRATT, 1990). Esses testes têm sido empregados no gerenciamento, manejo e monitoramento de ambientes aquáticos, planejamento de política ambiental, criação de legislação referente à emissão de efluentes, cálculo de riscos ambientais e geração de informações vitais para o setor de vigilância da saúde pública (OLIVEIRA-NETO; BOTTA-PASCHOAL, 2000; FERNICOLA et al., 2003).

Segundo a Resolução 357 - CONAMA (BRASIL, 2005), a Toxicidade em corpos de água doce e das emissões de efluentes deverão ser controladas,

visando à proteção das comunidades aquáticas. Os valores limites de toxicidade estão na Tabela 03:

Tabela 03 – Padrões máximos permitidos de toxicidade nos corpos de água doce

Classificação		Toxicidade
1	Classe 1 – águas doces	Não verificação do efeito crônico a organismos
2	Classe 2 – águas doces	Não verificação do efeito crônico a organismos
2	Classe 3 – águas doces	Não verificação do efeito agudo a organismos
3	Classe 4 – águas doces	-----
4	Padrões de Emissão de Efluentes	Não deverá possuir potencial para causar efeitos tóxicos aos organismos aquáticos no corpo receptor. *

* Em concordância ao Artigo 34, Resolução 357- Conama.

Organismos apropriados devem ser usados de modo a permitir uma extrapolação ecologicamente realista de resultados de estudos de efeitos de poluentes no meio aquático. Portanto, uma série de critérios deve ser considerada na escolha do organismo-teste, tais como sensibilidade entre as espécies, disponibilidade, ser representante do ecossistema em estudo, facilidade de manutenção e informação sobre a autoecologia da espécie em estudo.

Uma variedade de protocolos, nos quais são recomendadas as espécies a serem utilizadas, tem sido desenvolvidas pela American Public Health Association (A.P.H.A.), U.S.Environmental Protection Agency (U.S.E.P.A.), American Society for

Testing and Materials (A.S.T.M.) e Organization for Economic Cooperation and Development (O.E.C.D.). No Brasil, os procedimentos dos testes em organismos aquáticos estão descritos no Manual de Testes para a Avaliação de Toxicidade de Agentes Químicos do IBAMA (IBAMA, 1989), em documentos da CETESB – Companhia de Tecnologia e Saneamento Ambiental - que informam sobre as metodologias com diferentes organismos e nas Normas Brasileiras - NBR da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT)

Entre os organismos-testes de ambiente aquáticos mais utilizados na avaliação de substâncias tóxicas e poluentes estão as algas e o zooplâncton. As primeiras por constituírem a base da cadeia trófica destes tipos de ambiente através da produção primária. Já o zooplâncton desempenha importante papel nesta cadeia trófica servindo como elo entre produtores primários e macroinvertebrados, peixes, aves aquáticas, répteis, além de serem responsáveis por grande parcela da regeneração de nutrientes e refertilização da coluna de água (OLIVEIRA-NETO, 1999).

Estudos ecotoxicológicos são realizados com organismos pertencentes a diferentes níveis tróficos do ambiente aquático. Como por exemplo, com os produtores primários, representados por espécies de algas como *Chlorella vulgaris*, *Pseudokirchneriella subcapitata*, *Ankistrodesmus* sp e *Scenedesmus* sp, com os consumidores primários como os microcrustáceos *Daphnia* sp. (*D. similis*, *D. magna*, *D. laevis*) e *Ceriodaphnia* sp. (*C. dubia*, *C. silvestrii*) e com os consumidores secundários representados por peixes como *Cheirodon notomelas*, *Hemigrammus marginatus*, *Poecilia reticulata*, *Danio rerio* e peixes da família Characidae em geral. São também descritos testes com bactérias como

Photobacterium phosphoreum e *Spirillum volutans* representando os decompositores. Além dos organismos citados, são relatados também na literatura estudos de efeitos de poluentes com outros organismos aquáticos como anfíbios (RICHARDS; KENDALL, 2002), quironomídeos (FONSECA, 1997), anfípodos (ARAÚJO, 1998), insetos (JIN-CLARK et al., 2002), anelídeos (MELLER et al., 1998), moluscos (SURESH et al., 1993), protozoários (NICOLAU et al., 2004), plantas (TEISSEIRE et al., 1998) e fungos (EL HISSY et al., 1995).

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Zooplâncton

5.1.1 Escolha do Organismo Teste

Os microcrustáceos desempenham um papel importante para a transferência de energia de um nível trófico a outro, pois alimentam-se de algas e servem de alimento para muitas espécies de peixes e invertebrados. Alterações significativas destes organismos podem interferir nos níveis tróficos do ecossistema aquático.

Estes organismos apresentam uma ampla distribuição em ambientes temperados e tropicais, sendo facilmente encontrado em lagos, represas e reservatórios. Caracterizam-se pela segmentação reduzida do corpo e por apresentarem tórax e abdômen fundidos em um tronco no qual são inseridos quatro a seis pares de apêndices na porção anterior, os quais funcionam individualmente como brânquias e estruturas filtradoras de alimento (ROCHA; GUNTZEL, 1999)

A *Daphnia*, conhecida também como pulga d'água, é um microcrustáceo de água doce pertencente ao filo Arthropoda, subfilo Crustacea, classe Branchiopoda, ordem Cladocera e família Daphnidae e mede cerca de 0,5 a 5,0 mm de

comprimento. O corpo é protegido por uma carapaça transparente e bivalve, exceto a cabeça e antenas. O olho é composto, bem evidente na cabeça e é sensível à mudança de luz. Suas longas antenas funcionam como remos e são responsáveis pelo seu impulso natatório para frente, característico da *Daphnia*.

É um organismo filtrador alimentando-se de algas, bactérias e detritos orgânicos presentes na água. Reproduzem-se principalmente por partenogênese e durante a maior parte do ano sua população natural é constituída apenas de fêmeas. Em cultivos o aparecimento de machos parece estar associado à baixas temperaturas, alta densidade de organismos com acúmulo subsequente de produtos de excreção e baixa disponibilidade de alimentos (CETESB, 2004). Essas condições adversas levam à uma diferenciação das fêmeas com aparecimento de efípios (ARAUJO,1999), caracterizada pelo escurecimento de parte das valvas que cobrem a câmara incubadora e aumento dos tegumentos (RAND et al., 1995).

O número de ovos partenogenéticos é variável intra e inter espécies e está relacionado com a qualidade e quantidade de alimentos e outros fatores físicos tais como, temperatura, intensidade luminosa, OD, pH e concentração de íons entre outros (CETESB, op cit.). O ciclo de vida médio da *Daphnia similis* é de 40 dias a 20°C.

A utilização de espécies da família *Daphnidae* como organismos-teste se deve ao fato de apresentarem a maioria dos requisitos exigidos, tais como: representatividade dentro de um grupo ecológico em termos de nível trófico; facilidade de cultivo e de manutenção em laboratório, possibilitando a obtenção de

populações homogêneas com sensibilidade constante para uso em teste de toxicidade (ARAUJO, 1999); estabilidade genética; conhecimento da biologia da espécie e sensibilidade a uma grande variedade de contaminantes ambientais (RAND et al., 1995).



Figura 01 - *Daphnia similis*

Fonte: Ipen (www.ipen.br), (2005).

5.1.2 Procedência dos organismos

A espécie de cladóceros *Daphnia similis* foi obtida do Laboratório de Ecotoxicologia Aquática do CRHEA/USP, São Carlos e vem sendo mantida no Laboratório de Ecotoxicologia Aquática e Limnologia do CESET/UNICAMP, Limeira/SP desde 2004, de acordo com os procedimentos descritos pela ABNT NBR 12713 (2004).

As espécies de clorófitas *Pseudokirchneriella subcapitata* (*Selenastrum capricornutum*) e da cianófitas *Anabaena spiroides* foram obtidas no Laboratório

de Ficologia no Departamento de Botânica da Universidade Federal de São Carlos.

5.1.3 Cultivo do organismo teste – Cladóceros

O cultivo do cladóceros foi feito em água de diluição e as culturas foram mantidas em local limpo, isento de substâncias ou vapores tóxicos. Os organismos foram mantidos em cristalizadores com capacidade para 02 litros (70 organismos/cristalizador), em estufa incubadora B.O.D. marca Ação Científica modelo, AC 72, com controle de temperatura e luz. A incubadora foi regulada para um fotoperíodo de 16 horas de luz e 8 horas de escuro, intensidade luminosa de aproximadamente 1000 lux e temperatura de $22 \pm 2^\circ \text{C}$.

A renovação da água de cultivo nos cristalizadores foi feita 3 vezes por semana evitando-se diferença de temperatura maior que 2°C . No manuseio de *D. similis* foram utilizadas pipetas de diâmetro adequado ao seu tamanho, com borda arredondada (ABNT, 2004). A sala de cultivo para manipulação das culturas foi aclimatada com temperatura de $20 \pm 2^\circ \text{C}$.

Como citado anteriormente condições desfavoráveis, incluindo superpopulação, falta ou excesso de alimentação, poderá influenciar a reprodução dos microcrustáceos. Nestas condições podem surgir organismos machos na cultura, por reprodução sexuada e efípios. Caso dois ou mais indivíduos com efípios surgirem em um lote, os organismos jovens neste lote não deverão ser

utilizados no ensaio e o procedimento de cultivo deverá ser avaliado. Também é recomendado o descarte do lote com organismos com idade superior a 28 dias no caso de *D. similis* (ABNT, op cit).

Os organismos jovens do gênero *Daphnia* , obtidos por partenogênese a partir da segunda postura e cultivados nas condições estabelecidas, foram os organismos utilizados nos ensaios, atendendo aos seguintes requisitos de acordo com a ABNT (op.cit.):

- Segundo esta norma para *D. similis* deverão ser utilizados organismos jovens entre 6 e 24 horas de idade, obtidos a partir de fêmea com idade entre 7 dias e 28 dias;



Figura 02 - Câmara incubadora para cultivo de *Daphnia similis*

Fonte: Laboratório de ecotoxicologia Aquática e Limnologia – CESET/UNICAMP/Limeira.

5.1.4 Água de Diluição.

A água de diluição foi preparada com água mineral de boa qualidade, de uso comercial com procedência conhecida (Jacutinga), a qual é utilizada para a manutenção de culturas e para a realização de testes de toxicidade. Adicionou-se sais durante o preparo para correção de alguns parâmetros, tais como: pH de 7.2 a 7.6, dureza total de 40 a 48 mg/L em CaCO_3 e condutividade de aproximadamente 160 uS/cm. Para o preparo da água de diluição foram utilizadas 2 soluções: SOLUÇÃO 1, contendo sulfato de cálcio e SOLUÇÃO 2, contendo cloreto de potássio, bicarbonato de sódio e sulfato de magnésio. A água de diluição deve ser mantida com aeração constante e filtrada antes de ser utilizada.

Para manter o controle da qualidade de cada lote de água de diluição preparado realizou-se o teste de viabilidade. Este teste foi feito uma vez por mês através da exposição de 10 organismos-teste distribuídos em 5 réplicas. Esses recipientes foram mantidos nas mesmas condições da manutenção das culturas e sem alimentação, por um período de 48 horas. Após esse período, foram efetuadas as leituras dos testes, sendo anotado o número de organismos móveis. O lote de água de diluição foi considerado aceitável para uso quando a porcentagem de imobilidade dos organismos não excedeu a 10% do valor total (ABNT, 2004).



Figura 03 - Água de cultivo ou de diluição (Água Mineral + adição de sais)

Fonte: Laboratório de ecotoxicologia Aquática e Limnologia – CESET/UNICAMP/Limeira.

5.1.5 Alimentação do Cladóceros

As culturas de *Daphnia* foram alimentadas com cultura de *P. subcapitata* em fase exponencial de crescimento e concentração final de 3×10^6 células / *Daphnia*/dia e alimento composto (ração para truta e levedura) cuja concentração final foi 0,05mL /*Daphnia*/dia.

5.1.6 Teste de sensibilidade – *Daphnia similis*

Testes de sensibilidade foram realizados mensalmente para avaliação das condições fisiológicas dos organismos-teste, utilizando substâncias de referência. Os resultados obtidos e análise estatística indicam se o organismo está dentro da faixa estabelecida (carta-controle) e apto a ser usado nos testes.

Para o teste de sensibilidade com *Daphnia similis* preparou-se, a partir de uma solução estoque de dicromato de potássio, as concentrações 0,02; 0,04; 0,08; 0,16 e 0,32 mg.L⁻¹. Na montagem do ensaio cada concentração foi preparada em triplicata, contendo 10 mL em cada recipiente. Preparou-se o controle com água de diluição também em triplicata contendo 10 mL em cada recipiente e colocou-se 05 neonatas em cada recipiente. A leitura final da sensibilidade foi realizada após 24 horas. Por tratar-se de material tóxico, o conteúdo dos recipientes foi armazenado em frascos apropriados, após o término dos testes, para posterior tratamento.

5.1.7 Vidraria e material de cultivo

As vidrarias envolvidas no cultivo, manutenção dos organismos e testes de toxicidade aguda foram lavadas de forma adequada, repassada com água destilada e seca em estufa a 104°C, seguindo as recomendações da ABNT (2004).

Esses cuidados tem por objetivo evitar a contaminação das culturas por outros organismos e/ou substâncias tóxicas ou, ainda, evitar a mistura de espécies.

5.2 Fitoplâncton

5.2.1 Cultivo de algas para extração de Polissacarídeos

Todo o processo de cultivo das algas *P. subcapitata* e *A. spiroides*, filtração tangencial, extração e fracionamento dos polissacarídeos foi realizado no Laboratório de Ficologia (Departamento de Botânica da Universidade Federal de São Carlos – UFSCAR), sob coordenação do Prof. Dr. Armando A.H. Vieira.

5.2.1.1 Clorofíceas

O cultivo de *Pseudokirchneriella subcapitata* (*Selenastrum capricornutum*) para extração dos polissacarídeos fracionados foi realizado a partir do preparo do inóculo de cultura axênica. Este inóculo foi preparado em erlenmeyer de 250mL contendo 100mL de meio WC esterilizado (GUILLARD; LORENZEN, 1972) e transferiu-se 12mL de alga para o inóculo sob condições de esterilização e assepsia, na capela de fluxo laminar e próximo da chama do bico de Bunsen. Após a adição de algas nos inóculos, os erlenmeyers foram transferidos para sala com temperatura constante de $23^{\circ}\text{C} \pm 2$ e sob iluminação com fotoperíodo de 12h luz/escuro.

Após os inóculos atingirem a fase exponencial foram semeadas as culturas, transferindo os volumes dos inóculos para frascos com capacidade para 10 litros, contendo 07 litros de meio WC (Meio com EDTA e Meio sem EDTA) (GUILLARD; LORENZEN, 1972) (Anexo A), sob condições de esterilização e assepsia, na Capela de Fluxo Laminar e próximo da chama do bico de Bunsen.

Todos os meios, tanto dos inóculos (frascos de 250 mL) como os de cultivos (frascos de 10 litros), foram ajustados para pH 7,0 e autoclavados por 30 minutos a 120°C.

Os frascos já com inóculos foram mantidos em sala com temperatura controlada ($23^{\circ}\text{C} \pm 1$) e fotoperíodo de 12h luz/escuro sob irradiação constante de $150\text{-}200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ provenientes de tubos fluorescentes de 40 w. As culturas foram aeradas constantemente, utilizando-se ar filtrado e umedecido em água autoclavada e acidificada (pH 2,0). Condições assépticas foram mantidas em todas as fases experimentais.

As culturas foram mantidas em crescimento por 30 dias, quando atingiu a fase exponencial de crescimento. Após o período de crescimento, as culturas foram levadas para o sistema de filtração para obtenção das frações de polissacarídeos e células algais.



Figura 04 – Cultivo de *P. subcapitata* em meio WC.

Fonte – Laboratório de Ficologia, Departamento de Botânica –UFSCAR.

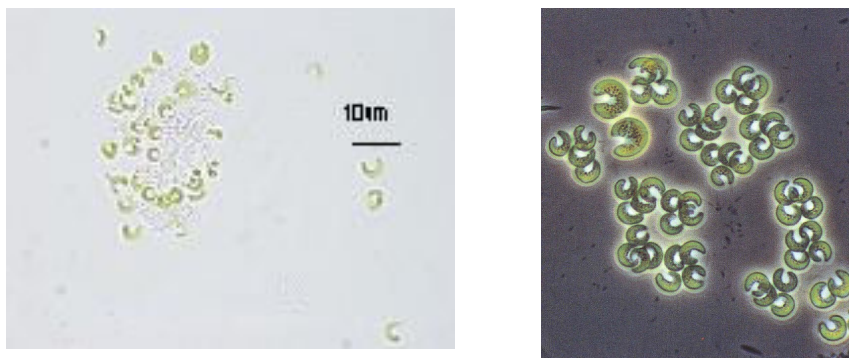


Figura 05 – Clorofícea – *Pseudokirchneriella subcapitata* - observação de células algais em microscópio óptico.

Fonte: CALOTO-OLIVEIRA (2005) e LUND (1995).

Exopolissacarídeos de *P. subcapitata* observados em coloração de nanquim.

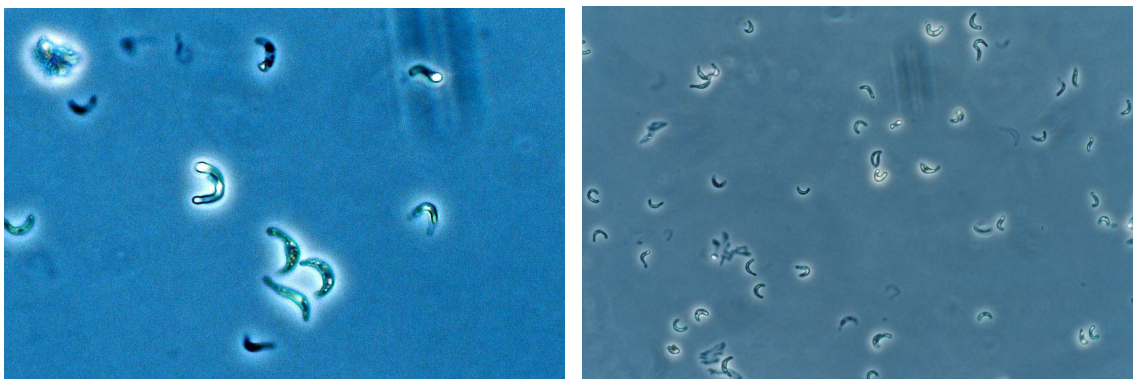


Figura 06 – Clorofíceas – células de *P. subcapitata* e a excreção dos polissacarídeos nas áreas esbranquiçadas no entorno das células.

Fonte: VIEIRA (2005).

5.2.1.2 Cianobactéria

O inóculo para o cultivo de *Anabaena spiroides* foi preparado em erlenmeyer de 250 ml contendo 100 mL de meio ASM-1 com TRIS, esterilizado. Foi transferido para este meio 12 mL de cultura algal em capela de fluxo laminar para manter as condições de assepsia e esterilização. Após a adição de algas nos inóculos, os erlenmeyers foram transferidos para sala com temperatura constante de 23 ± 2 °C e sob iluminação com fotoperíodo de 12h luz/escuro.

O cultivo de *Anabaena spiroides* foi feito em frascos com capacidade para 10 L. Foram preparados 7 L de meio ASM-1 (meio com EDTA e meio sem EDTA) (GORHAM et al., 1964) e adicionado 500 mg L^{-1} de tampão TRIS (Anexo B). O meio foi, então, ajustado para pH 7,0 e autoclavado por 30 minutos a 120°C. Após resfriado, o meio foi inoculado com 100 mL de cultura algal em fase logarítmica de

crescimento. O recipiente de cultivo foi então mantido em sala com temperatura controlada ($23^{\circ}\text{C} \pm 1$) e fotoperíodo de 12h luz/escuro, sob irradiação constante de $150 - 200 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ provenientes de tubos fluorescentes de 40 w. As culturas foram aeradas constantemente utilizando-se ar filtrado e umedecido em água autoclavada e acidificada (pH 2,0). Condições assépticas foram mantidas em todas as fases experimentais. A cultura foi mantida em crescimento por 30 dias, quando ficou pronta para ser filtrada.

Apesar das culturas não serem axênicas, exames periódicos ao microscópio óptico (65x) não revelaram indícios de contaminação por bactérias.



Figura 07 – Cultura de *Anabaena spiroides* em meio ASM1 - TRIS

Fonte – Laboratório de Ficologia, Departamento de Botânica –UFSCAR.



Figura 08 – Cianobactéria – *Anabaena spiroides*

Fonte: GAVEL e MARSÁLEK (2005), SAUGESTAD (2005).

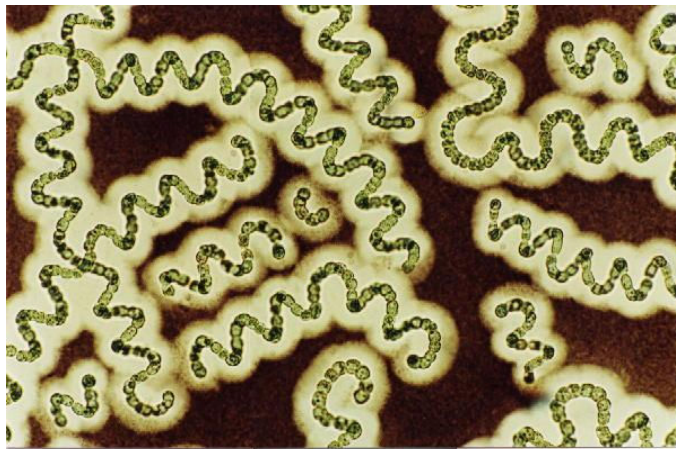


Figura 09 – Cianobactéria – células de *A. spiroides* e a excreção dos polissacarídeos nas áreas esbranquiçadas no entorno das algas

Fonte: VIEIRA (2005).

5.3 Filtração tangencial

Os exopolissacarídeos provenientes das algas são aqueles excretados e encontrados dissolvidos no meio de cultura. As culturas tiveram suas células separadas no início da fase estacionária, através de filtração tangencial.

Alíquotas da cultura de alga *Pseudokirchneriella subcapitata* (*S. capricornutum*) e *Anabaena spiroides* foram filtradas tangencialmente em cartuchos de fibra oca com poros variados (0,65 μm e 10000D) acoplados ao aparelho de filtração tangencial Mid Gee (A/G Technology Corporation, Needham, MA, USA). Na filtração tangencial, a cultura passa por dentro do cartucho que possui poros de tamanho definido. Devido à pressão realizada por uma bomba peristáltica as moléculas da amostra que são menores do que os poros passam por eles e, dessa forma, são separadas das moléculas maiores do que o poro. As moléculas maiores do que os poros passam diretamente por toda a extensão do cartucho e retornam ao sistema (BITTAR, 2005).

A extração dos polissacarídeos da cultura foram realizadas nas frações de <10000 D, >10000 D e excretados totais. As algas separadas pela filtração também apresentaram número de células diferenciados, obtidos pelo concentrado de algas.

As amostras de exopolissacarídeos e células algais obtidas foram então guardadas em geladeira a 5°C até o momento do uso, não excedendo o tempo de 15 dias, que é o intervalo máximo para sua utilização.

As frações da cultura algal extraída pela filtração tangencial estão descritas na Tabela 04.

Tabela 04 – Frações da cultura algal após filtração tangencial.

Nome da fração	Composição	Obtenção
Fração Particulada	Células	Filtração Tangencial (Fração maior que 0,45 μm)
Fração coloidal	Polissacarídeos Extracelulares Coloidais	Filtração Tangencial (Fração menor que 0,45 μm e maior que 3000 D)
Fração Dissolvida Real	Moléculas menores	Filtração Tangencial (Fração menor que 3000 D)

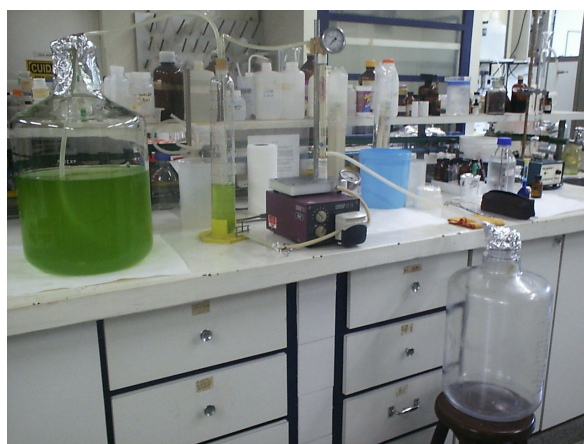


Figura 10 – Sistema de Filtração Tangencial

Fonte – Laboratório de Ficologia, Departamento de Botânica – UFSCAR.



**Figura 11 – Cultura de *P. subcapitata* e amostras extraídas na filtração tangencial:
Concentrado de Alga e Fração de Polissacarídeo**

Fonte: Laboratório de Ficologia/UFSCAR/São Carlos/SP.

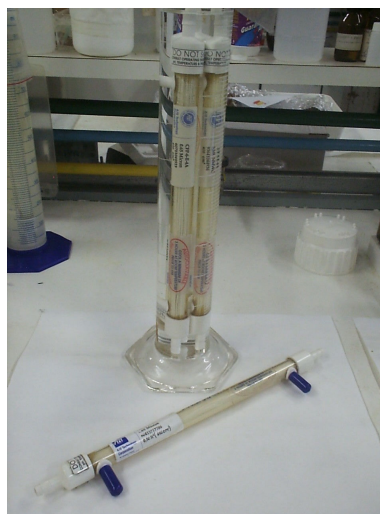


Figura 12 – Cartucho de celulose usado na filtração tangencial

Fonte: Laboratório de Ficologia/UFSCAR/São Carlos/SP.

5.4 Contagem das células algais

As culturas de *P. subcapitata* foram centrifugadas a 2000 rpm por 20 minutos para a retirada do meio WC, que pode ser tóxico para os organismos zooplanctônicos. Após este procedimento as células foram diluídas em água de diluição. As células das culturas algais de *P. Subcapitata* separadas no concentrado de algas, foram contadas com auxílio de câmara de Neubauer. Estas algas serviram de alimento na concentração de 3×10^6 células/*Daphnia*/dia nos testes ecotoxicológicos posteriormente.

As células das culturas de *A. spiroides* separadas no concentrado de algas foram lavadas durante a filtração tangencial. Esse processo foi realizado porque não foi possível centrifugá-las, devido à presença de vesículas gasosas – aerótopos, que impedem a sua sedimentação. A medida da quantidade de algas foi realizada de forma indireta, pela análise de clorofila-a, em eletrodo seletivo marca YSI e comparada ao valor da clorofila-a da cultura de *P. subcapitata* para obtenção da concentração usada para alimentação 3×10^6 células/*Daphnia*/dia.

Nas amostras dos concentrados de algas também foram realizadas análises de pH, turbidez, clorofila-a, sólidos dissolvidos totais (TDS), temperatura, condutividade, oxigênio dissolvidos (APHA, 1998), com auxílio da sonda multiparâmetros para monitoração da qualidade da água marca YSI, modelo 6600, com display 650 MDS, para controle das amostras após a lavagem das células.

5.5 Determinação do Carbono Orgânico Total (TOC) nas culturas de *P. subcapitata* e de *A. spiroides* e nos polissacarídeos fracionados.

Foram determinados, o teor de carbono total (TC), carbono inorgânico (IC), carbono orgânico total (TOC) nas amostras de concentrado de algas, excretado total, fracionado >10 KD e fracionado <10 KD. Para isso após cada extração dos exopolissacarídeos foi reservada em frasco esterilizado uma alíquota de 50 mL de cada amostra. As determinações foram feitas no equipamento de TOC - Total Organic Carbon Analyzer, TOC-5000 A (Shimadzu, Japan), no Laboratório de Ficologia, no Departamento de Botânica, UFSCAR, São Carlos, SP. As análises de carbono foram realizadas por combustão e seguiram metodologia padronizada nº 5310 – B (APHA, 1998). Os valores obtidos foram expressos mg.C.L⁻¹.

5.6 Testes de Toxicidade Aguda – *Daphnia similis*

Os testes de toxicidade são utilizados para avaliar os efeitos causados às espécies-teste. Consistem em expor os organismos aquáticos representativos do ambiente a várias concentrações de uma ou mais substâncias, ou a fatores ambientais, durante um determinado período de tempo (CETESB, 1990).

O ensaio de toxicidade aguda avalia os efeitos, em geral mais severos e rápidos, sofridos pelos organismos expostos ao agente químico, em um curto período de tempo, geralmente de 01 a 04 dias (ARAGÃO; ARAUJO, 2006).

Neste estudo testes de toxicidade aguda foram usados para avaliar os efeitos dos polissacarídeos excretados pelas algas *Pseudokirchneriella subcapitata* e de *Anabaena spiroides*, na toxicidade dos elementos-traço cromo e cádmio.

O preparo dos testes ecotoxicológicos foram realizados no Laboratório de Ecotoxicologia Aquática e Limnologia – LEAL (CESET/UNICAMP/Limeira) e foi utilizado como organismos-teste a espécie padronizada *Daphnia similis*.

A metodologia usada nos testes de toxicidade com *Daphnia similis* seguiu as normas estabelecidas pela ABNT (2004). Foram preparados 04 testes com as concentrações escolhidas para cada metal. As concentrações foram preparadas em 03 réplicas para cada teste. No término de cada teste, foi feita a contagem dos organismos vivos e imóveis ou mortos, visando à obtenção da CE_{50} que consiste na concentração na qual ocorrem 50% de imobilidade ou mortalidade dos indivíduos. Os resultados dos testes foram calculados através do método estatístico Trimmed Spearman-Kärber e expressos em CE_{50} -24/48 horas.

Também foram realizadas medidas de pH, temperatura, condutividade e dureza no final dos experimentos (APHA, 1998).

5.6.1 Testes ecotoxicológicos com metal Cromo

5.6.1.1 Preparo da solução de dicromato de potássio

A solução estoque foi preparada adicionando-se 1g de Dicromato de potássio em 1000 ml de água destilada, de forma a se obter uma concentração final de 1 g.L^{-1} . A partir da solução estoque de 1 g.L^{-1} foi preparada a solução de dicromato de potássio na concentração de 10 mg.L^{-1} , ambas em água destilada. A partir dessas soluções padrão, foram preparadas as soluções testes nas concentrações de 0,05; 0,10; 0,20; 0,40; 0,80 e $1,40 \text{ mg.L}^{-1}$ com água de diluição.

5.6.1.2 Solução de Dicromato de Potássio e Polissacarídeos fracionados

As concentrações das soluções testes foram preparadas na relação de 1/3 de polissacarídeo para 2/3 de água de diluição, afim de obter a concentração real desejada. O polissacarídeo foi usado como a água de diluição para completar o volume no preparo das concentrações. Os cálculos para obtenção desses volumes foram feitos para que a adição do polissacarídeo não interferisse na concentração do metal.

5.6.1.3 Testes Ecotoxicológicos

Conforme a seqüência abaixo os testes ecotoxicológicos com o metal cromo foram preparados com as diferentes amostras de meios de culturas, algas, concentrações dos metais e frações de polissacarídeos, para avaliar a interferência de compostos quelantes na toxicidade do metal cromo para *D. similis*:

Sensibilidade do metal

- Cromo.

Testes com o polissacarídeo e alga *P. subcapitata* (*Selenastrum capricornutum*)

- cromo + Concentrado de alga (3×10^6 células/*Daphnia*/dia),
- cromo + Meio WC com EDTA (Branco),
- cromo + Meio WC com EDTA + Excretado total (1/3 de polissacarídeo),
- cromo + Meio WC com EDTA + Fração > 10KD (1/3 de polissacarídeo),
- cromo + Meio WC com EDTA + Fração < 10KD (1/3 de polissacarídeo),
- cromo + Meio WC sem EDTA (Branco),
- cromo + Meio WC sem EDTA + Excretado total (1/3 de polissacarídeo),
- cromo + Meio WC sem EDTA + Fração > 10KD (1/3 de polissacarídeo),
- cromo + Meio WC sem EDTA + Fração < 10KD (1/3 de polissacarídeo).

Testes com o polissacarídeo e alga (*Anabaena spiroides*)

- cromo + Concentr. de alga (3×10^6 células/*Daphnia*/dia),

- cromo + ASM1 sem EDTA,

- cromo + ASM1 com EDTA,

- cromo + Meio ASM1 com EDTA + Excretado total (1/3 de polissacarídeo),

- cromo + Meio ASM1 com EDTA + Fração > 10KD (1/3 de polissacarídeo),

- cromo + Meio ASM1 com EDTA + Fração < 10KD (1/3 de polissacarídeo).

5.6.2 Testes ecotoxicológicos com metal Cádmio

5.6.2.1 Preparo da solução de cloreto de cádmio

A solução estoque foi preparada adicionando-se 01 g de Cloreto de cádmio em 1000 ml de água destilada, de forma a se obter uma concentração final de 01 g.L⁻¹ de cádmio. A partir da solução estoque de 01 g.L⁻¹ foi preparada a solução de cloreto de cádmio a 10 mg.L⁻¹, ambas em água destilada. A partir dessas soluções padrão foram preparadas as soluções testes nas concentrações de 0,01; 0,10; 0,30; 0,45; 0,60; 0,80 e 1,40 mg.L⁻¹, com água reconstituída.

5.6.2.2 Solução de cloreto de cádmio e polissacarídeo fracionados

As concentrações das soluções testes foram preparadas na relação de 1/3 de polissacarídeo para 2/3 de água de diluição, afim de obter a concentração real desejada. O polissacarídeo foi usado como a água de diluição para completar o volume no preparo das concentrações. Os cálculos desses volumes foram feitos para que a adição do polissacarídeo não interferisse na concentração do metal.

5.6.2.3 Testes Ecotoxicológicos

Conforme a seqüência abaixo os testes ecotoxicológicos com o metal cádmio foram preparados com as diferentes amostras de meios de culturas, algas, metais e frações de polissacarídeos, para avaliar a interferência de compostos quelantes na toxicidade do metal cádmio para *D. similis*:

Sensibilidade do metal

- Cádmio.

Testes com o polissacarídeo e alga *P. subcapitata* (*Selenastrum capricornutum*)

- cádmio + Concentrado de alga (3×10^6 células/*Daphnia*/dia),
- cádmio + Meio WC com EDTA (Branco),
- cádmio + Meio WC com EDTA + Excretado total (1/3 de polissacarídeo),

- cádmio + Meio WC com EDTA + Fração > 10KD (1/3 de polissacarídeo),
- cádmio + Meio WC com EDTA + Fração < 10KD (1/3 de polissacarídeo),

- cádmio + Meio WC sem EDTA (Branco),
- cádmio + Meio WC sem EDTA + Excretado total (1/3 de polissacarídeo),
- cádmio + Meio WC sem EDTA + Fração > 10KD (1/3 de polissacarídeo),
- cádmio + Meio WC sem EDTA + Fração < 10KD (1/3 de polissacarídeo).

Testes com o polissacarídeo e alga (*Anabaena spiroides*)

- cádmio + Concentr. de alga (3×10^6 células/*Daphnia*/dia),

- cádmio + ASM1 sem EDTA (Branco),

- cádmio + ASM1 com EDTA (Branco),
- cádmio + Meio ASM1 com EDTA + Excretado total (1/3 de polissacarídeo),
- cádmio + Meio ASM1 com EDTA + Fração > 10KD (1/3 de polissacarídeo),
- cádmio + Meio ASM1 com EDTA + Fração < 10KD (1/3 de polissacarídeo),



Figura 13 – Excretados fracionados armazenados em frascos esterilizados



Figura 14 - Ensaio ecotoxicológico no laboratório - LEAL

Fonte: Laboratório de Ecotoxicologia Aquática e Limnologia – CESET/UNICAMP/Limeira.

5.7 Controle dos parâmetros físico-químicos nos Testes de Toxicidade

As determinações das características físico-químicas dos ensaios, como pH, condutividade, oxigênio dissolvido e dureza total, foram realizadas no Laboratório de Ecotoxicologia Aquática e Limnologia – LEAL/CESET/UNICAMP/Limeira. Estes parâmetros auxiliam na compreensão das respostas obtidas nos testes ecotoxicológicos uma vez que as variações podem influenciar a toxicidade.

As medidas de oxigênio dissolvido (OD), pH, condutividade e dureza da água, seguiram as metodologias analíticas especificadas na 20ª edição (1998) do Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater de autoria das instituições American Public Health Association (APHA), American Water Works Association (AWWA) e Water Environment Federation (WEF). As variáveis mencionadas foram analisadas ao final dos testes ecotoxicológicos.

A determinação do pH foi realizada pelo método eletrométrico, utilizou-se potenciômetro marca Marte, modelo MB-10 segundo metodologia padronizada nº 4500 – H⁺ -B (APHA, 1998).

Para a determinação da condutividade as medidas foram realizadas em condutivímetro marca Ação Científica, modelo MCA 150P, segundo metodologia padronizada nº 2510 - B (APHA, 1998)

Para a análise de OD foi utilizado o método eletrométrico com eletrodo seletivo (oxímetro) marca YSI, modelo 55/12 FT segundo metodologia padronizada nº 4500 - O - G (APHA, 1998);

Para a determinação da dureza total foi utilizado método titulométrico com EDTA segundo metodologia padronizada 2340 - C (APHA, 1998).

5.8 Tratamento Estatístico

Os testes de toxicidade aguda para *Daphnia similis* foram expressos por meio da contagem do número de organismos imóveis ou mortos e para a análise estatística foi usado o programa estatístico “Trimmed Spearman-Kärber Methods for Estimating Median Lethal Concentration in Toxicity Bioassays” (HAMILTON et al.,1978).

Os resultados da CE₅₀ para os elementos-traço cromo e cádmio, foram expressos em mg.L⁻¹.

5.9 Cálculo para determinação da redução de toxicidade na presença de exopolissacarídeos

¹Segundo Botta-Paschoal (2005) e os cálculos descritos por Braille; Cavalcanti (1993) , para determinar a redução da toxicidade emprega-se a seguinte fórmula:

Cálculo da Redução da toxicidade (%)

Percentual de Redução = P

Valor da CE₅₀ (Toxicidade inicial) x 100

Valor da CE₅₀ (Toxicidade final)

Taxa de Redução = **[100 - P](%)**

Onde:

Para o percentual de redução (P):

CE₅₀ (inicial) – Valor da CE₅₀ obtido na amostra com o metal ou com o branco;

CE₅₀ (final) – Valor da CE₅₀ obtido na amostra com a adição do polissacarídeo;

100 – Transforma o resultado de mg.L⁻¹, em porcentagem (%).

¹ BOTTA-PASCHOAL, C.M.R. – Cálculo para determinação da redução da toxicidade. Informação pessoal, novembro/2005.

Para a taxa de redução:

100 – transformação do percentual de toxicidade em toxicidade total;

P – percentual de redução.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 Ensaio ecotoxicológicos utilizando meio WC sem EDTA - *P. subcapitata*

Na determinação do CE_{50} para cádmio e cromo foram realizados testes ecotoxicológicos com o cladóceros *D. similis*, em diversas concentrações das soluções de cloreto de cádmio e dicromato de potássio com a presença de diferentes frações dos exopolissacarídeos de *P. subcapitata* cultivados em meio WC sem EDTA e com o concentrado de algas. Os resultados obtidos nos 4 ensaios realizados para cada amostra foram convertidos para cádmio e cromo e estão apresentados nas tabelas 05 e 06, e Figura 15:

Tabela 05 – Valores de CE_{50} ($mg.L^{-1}$) de cádmio em meio WC sem EDTA para o cladóceros *D. similis*.

Testes ecotoxicológicos	Resultados CE_{50}				
	1º Ensaio	2º Ensaio	3º Ensaio	4º Ensaio	Média
Cádmio	0,103	0,094	0,093	0,089	0,095
Branco (cádmio + meio)	0,121	0,107	0,113	0,121	0,116
Excretado Total	0,170	0,175	0,183	0,162	0,173
Fração < 10 kD	0,162	0,138	0,143	0,151	0,148
Fração > 10 kD	0,137	0,128	0,139	0,137	0,135
Cádmio + Conc. Algas	0,094	0,091	0,107	0,094	0,096

Tabela 06 – Valores de CE₅₀ (mg.L⁻¹) de cromo em meio WC sem EDTA para o cladóceros *D. similis*.

Testes ecotoxicológicos	Resultados CE ₅₀				
	1º Ensaio	2º Ensaio	3º Ensaio	4º Ensaio	Média
Cromo	0,083	0,083	0,079	0,079	0,081
Branco (cromo + meio)	0,091	0,091	0,087	0,091	0,090
Excretado Total	0,115	0,110	0,105	0,120	0,112
Fração < 10 kD	0,100	0,105	0,110	0,105	0,105
Fração > 10 kD	0,095	0,098	0,100	0,100	0,098
Cromo + Conc. Algas	0,091	0,083	0,087	0,083	0,086

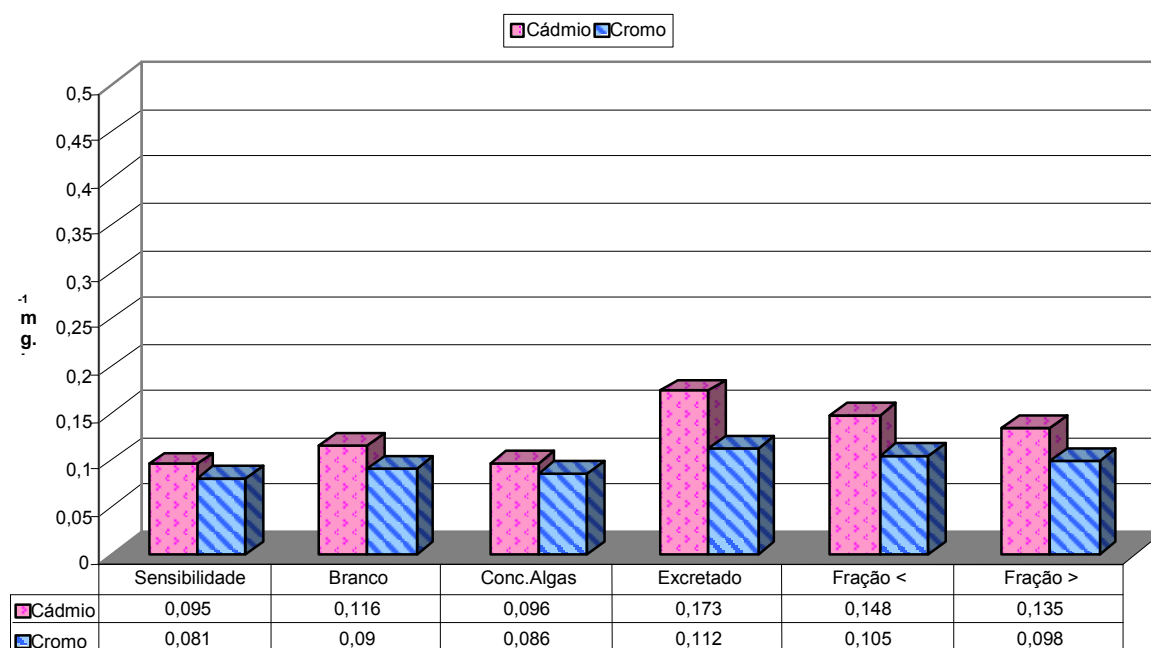


Figura 15 – Valores de CE₅₀ para os metais cádmio e cromo nos ensaios ecotoxicológicos realizados com as amostras de sensibilidade (metais), branco (metal + meio), exopolissacarídeos e concentrado de algas *P. subcapitata* cultivados em meio WC sem EDTA, para *D. similis*.

Os resultados das amostras tanto para cádmio quanto para o cromo apresentaram diminuição da toxicidade em todos os tratamentos empregados. A ausência de EDTA nas amostras evidenciou a ação isolada dos polissacarídeos sobre os metais, uma vez que foi observada somente a ação quelante destes compostos presentes nas culturas sem a interferência de outros complexantes.

Os testes de sensibilidade dos metais e os brancos apresentaram valores aproximados tanto para cádmio como para cromo, com ligeiro abatimento da toxicidade nas amostras com meio WC sem EDTA, indicando que estes compostos utilizados para cultivo possivelmente contém algumas substâncias quelantes.

Nas amostras com polissacarídeos os resultados mostram que sua ação quelante é mais eficiente na amostra de excretado total, como esperado. Ocorreu menor ação na fração >10 KD, provavelmente devido a menor quantidade de exopolissacarídeos presentes no meio, como pode ser observado na análise de TOC (Tabela 17).

As células algais de *P. subcapitata* oferecidas como alimento nos testes com os metais cromo e cádmio não foram contaminadas previamente. As células algais foram utilizadas nos testes somente após a centrifugação, lavagem em água destilada, ressuspensão em água de diluição e contagem, sendo que todo meio de cultivo foi retirado para não haver interferência de substâncias complexantes no experimento.

Através dos valores obtidos nos ensaios com o concentrado de algas (Tabela 06) foi possível observar que no teste realizado com os brancos (somente cromo e cádmio + meio WC) houve pequena redução da toxicidade quando comparado aos testes contendo alimentação (concentrado de algas) e a sensibilidade dos metais testados. Este fato é bastante relevante pois indica que não ocorre mudança significativa na toxicidade de cádmio e de cromo na presença de *P. subcapitata*.

Gorbi et al (2002) estudaram a influência que a presença de *Scenedesmus acutus* exerce sobre a ação tóxica de cromo para *Daphnia magna* e os autores não encontraram mudanças na toxicidade de cromo para o cladóceros *D. magna* mesmo com diferentes concentrações algais utilizadas. Por outro lado, Loivisto et al (1992) relatam que testes com baixas concentrações algais apresentou maior toxicidade de cromo para seis diferentes espécies de cladóceros sugerindo que isto ocorre devido a desintoxicação das algas.

No presente trabalho a diferença entre o concentrado de algas e testes sem algas realizados igualmente não mostraram diferenças significativas e sugerem não haver interação significativa entre os metais e as células fitoplanctônicas sem os seus exudados. Portanto os resultados obtidos mostraram que a adição das células algais em concentração de alimento não interfere na toxicidade do teste agudo realizado em 48 horas.

6.1.1 Correlação entre os valores da substância-referência e os metais analisados

A quantidade de cromo e cádmio presente nas amostras preparadas com dicromato de potássio e cloreto de cádmio, respectivamente, foram calculadas e expressas em mg. L⁻¹ Cr e mg. L⁻¹ Cd para efeito de comparação com a resolução Conama 357. Foi também realizada a conversão de mg.L⁻¹ para mol.L⁻¹ para facilitar as comparações com a literatura. Os valores estão expostos na Tabela 07:

Tabela 07 – Correlação entre os valores de CE₅₀ dos ensaios com cromo e cádmio com meio WC sem EDTA

Testes ecotoxicológicos	CE ₅₀			
	dicromato de potássio (mg. L ⁻¹)	cloreto de cádmio (mg. L ⁻¹)	Metal (mg. L ⁻¹)	Metal (mol. L ⁻¹)
Cádmio	-	0,155	0,095	1,38 x 10 ⁻⁶
Branco (cadmio + meio)	-	0,189	0,116	1,68 x 10 ⁻⁶
Excretado Total	-	0,282	0,173	2,51 x 10 ⁻⁶
Fração < 10 kD	-	0,242	0,149	2,15 x 10 ⁻⁶
Fração > 10 kD	-	0,220	0,135	1,96 x 10 ⁻⁶
Cádmio+Alimento(conc.alga)	-	0,157	0,095	1,40 x 10 ⁻⁶
Cromo	0,230	-	0,081	2,21 x 10 ⁻⁶
Branco (cromo + meio)	0,255	-	0,090	2,45 x 10 ⁻⁶
Excretado Total	0,318	-	0,112	3,06 x 10 ⁻⁶
Fração < 10 kD	0,296	-	0,105	2,85 x 10 ⁻⁶
Fração > 10 kD	0,278	-	0,098	2,67 x 10 ⁻⁶
Cromo +Alimento(conc.alga)	0,244	-	0,086	2,35 x 10 ⁻⁶

Os resultados obtidos de CE_{50} do metal cromo e cádmio atendem os parâmetros estabelecidos na Resolução Conama 357/2005 conforme observados nos padrões de emissão de efluentes nas Tabelas 01 e 02, e quando adicionado o exopolissacarídeo a toxicidade diminui.

6.1.2 Redução da toxicidade de cádmio e cromo nas amostras de *P. subcapitata* sem EDTA

Os valores calculados da porcentagem de redução da toxicidade dos metais cádmio e cromo estão expressos nas Figuras 16 e 17; respectivamente:

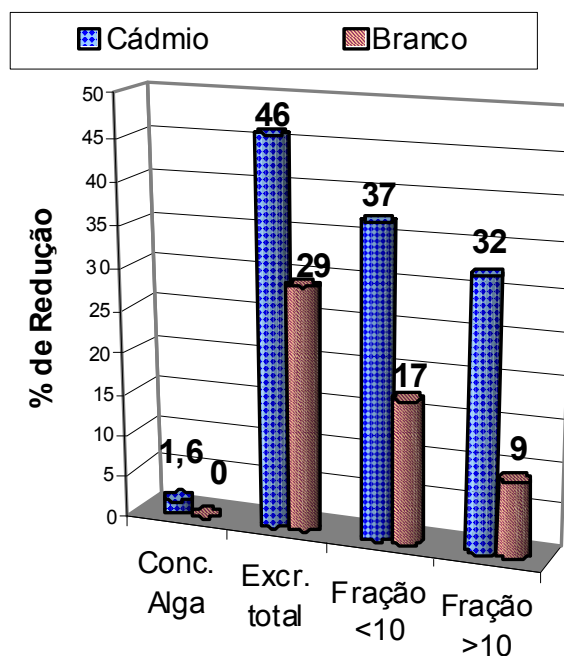


Figura 16 – Redução da Toxicidade de cádmio nos ensaios com amostras de *P. subcapitata* para concentrado de alga e exopolissacarídeos (excretado total, fração <10KD e fração >10KD) cultivados em meio WC sem EDTA para *Daphnia similis*.

A redução na toxicidade para o cádmio foi observada nas amostras de excretado total, fração <10KD e fração >10KD, quando comparadas com as amostras do metal e o branco.

Na figura 16, as amostras, quando comparadas ao metal, mostram os valores de redução maiores que quando comparadas às amostras com o branco. Para este estudo as amostras foram comparadas ao branco para manter as mesmas características das amostras, contendo a presença do meio de cultivo sem EDTA .

A menor redução da toxicidade para o cádmio foi verificada nos testes realizados com a fração >10KD, quando foi registrada a redução de apenas 9% na toxicidade de cádmio para *D. similis*. Na fração <10KD a redução encontrada foi de 17% e no excretado total 29%.

Ferrari et al (2006) demonstraram que a redução na toxicidade do metal cádmio para as larvas de *Bufo arenarum*, promovida pela ausência de cálcio na solução e a presença de substâncias húmicas, foi determinante para sobrevivência, aumentando significativamente a proteção das larvas no tempo de exposição.

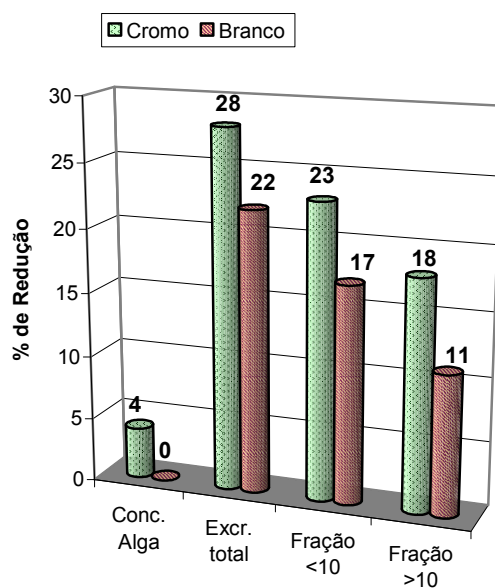


Figura 17 — Redução da Toxicidade de cromo nos ensaios com as amostras de *P. subcaptata* para concentrado de alga e exopolissacarídeos (excretado total, fração <10KD e fração >10KD) cultivados em meio WC sem EDTA para *Daphnia similis*.

A porcentagem de redução na toxicidade para o cromo também foi observada nas amostras excretado total, fração <10KD e fração >10KD, quando relacionada as amostras do metal e o branco (Figura 17), semelhante aos resultados obtidos para o cádmio.

As amostras quando comparadas ao metal exibiram valores de redução maiores que quando comparadas às amostras com o branco.

A redução mais significativa foi verificada nos testes realizados com o excretado total, quando foi registrado a redução de 22% na toxicidade de cromo para *D. similis*. Na fração <10KD a redução encontrada foi de 17% e na fração >10KD foi de 11%. Comparando-se os dois metais observou-se que houve maior

eficiência na redução da toxicidade do cádmio do que a do cromo, o que indica haver maior eficiência na quelação de cádmio pelo polissacarídeo de *P. subcapitata* do que a do cromo nos três tratamentos adotados neste trabalho.

Os polissacarídeos atuam na formação das substâncias húmicas, servindo de substrato, como fonte de carbono, complexando metais e reduzindo a sua toxicidade (ANDERSON; MOREL 1978; McKNIGHT; MOREL 1980; VIEIRA; NASCIMENTO, 1988; LOMBARDI; VIEIRA, 1998, 1999, 2000). Além disso, a matéria orgânica excretada pelas algas pode modificar a especiação dos metais no ambiente, controlando sua biodisponibilidade e toxicidade.

Os exopolissacarídeos algais são matrizes que formam os agregados gelatinosos orgânicos (TEP), os quais podem ser utilizados como substrato por vários organismos (CHO; AZAM, 1988; SIGG et al., 1987). Esses agregados, além de terem importante papel na exportação de matéria orgânica da coluna fótica através do afundamento em forma de partículas, contribuindo para redução da toxicidade, podem ser importantes como fonte de alimento para os organismos aquáticos, filtradores ou não.

Os polissacarídeos extracelulares além de formarem cápsulas e bainhas de muitas espécies de algas, podem sofrer processo de desagregação para o meio circundante após sua excreção. Estas formações têm importante papel no sequestro e redução dos metais no ambiente (BONEY, 1981; PAULSEN; VIEIRA, 1994).

6.2. Ensaio ecotoxicológicos utilizando meio ASM-1-TRIS sem EDTA - *A. spiroides*

Os ensaios ecotoxicológicos não foram realizados com a amostra de *Anabaena spiroides* cultivada em ASM-1 com TRIS sem EDTA, pois esta alga não cresceu neste meio sem a presença deste sal. O EDTA se mostrou de fundamental importância no crescimento populacional desta alga. Estão descritos na Tabela 08 os valores obtidos nos ensaios ecotoxicológicos para a sensibilidade dos metais e para os brancos (metal + meio de cultura).

Tabela 08 – Valores de CE_{50} ($mg.L^{-1}$) para ensaios com cádmio e cromo e meio ASM-1 com TRIS sem EDTA

Testes ecotoxicológicos	Resultados CE_{50}				
	1º Ensaio	2º Ensaio	3º Ensaio	4º Ensaio	Média
Cádmio	0,104	0,094	0,093	0,089	0,095
Branco (cadmio + meio)	0,148	0,132	0,130	0,125	0,134
Cromo	0,083	0,083	0,079	0,079	0,081
Branco (cromo + meio)	0,132	0,126	0,120	0,132	0,128

Tabela 09 – Correlação dos valores de CE_{50} dos ensaios com cromo e cádmio, com meio ASM-1 com TRIS sem EDTA

Testes ecotoxicológicos	CE_{50}			
	Dicromato de Potássio (mg. L ⁻¹)	Cloreto de Cádmio (mg. L ⁻¹)	Metal (mg. L ⁻¹)	Metal (mol. L ⁻¹)
Cádmio	-	0,155	0,095	$1,38 \times 10^{-6}$
Branco (cadmio + meio)	-	0,219	0,134	$1,95 \times 10^{-6}$
Cromo	0,230	-	0,081	$2,21 \times 10^{-6}$
Branco (cromo + meio)	0,361	-	0,128	$3,48 \times 10^{-6}$

Valores de CE_{50} para *A. spiroides* (meio ASM-1 sem EDTA)

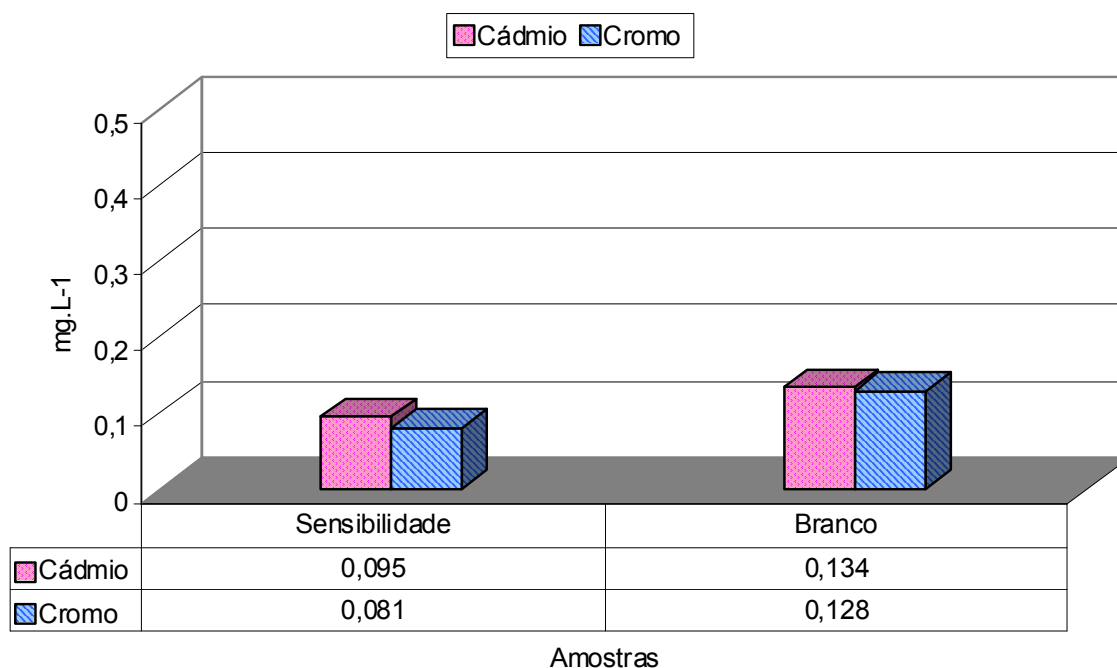


Figura 18 – Valores de CE_{50} para os metais cádmio e cromo nos ensaios de sensibilidade (metais) e branco (metal+meio) com o meio ASM-1 com Tris sem EDTA para *D. similis*.

Ocorreu diminuição na toxicidade dos brancos em relação a sensibilidade dos metais cádmio e cromo (Tabela 08). Esta diferença pode ter ocorrido devido a presença da substância TRIS no meio de cultura. Esta substância também apresenta capacidade de complexação e se comparada com a diminuição da toxicidade ao cádmio e cromo causada pela presença de meio WC sem EDTA, este meio tem maior poder quelante dos metais estudados, propriedade que deve ser levada em consideração quando da realização de testes ecotoxicológicos utilizando este meio.

Os resultados apresentados nos testes realizados com o meio ASM-1 sem EDTA foram usados para comparação com as amostras contendo meio ASM-1 com EDTA, principalmente para observar as variações nos resultados dos brancos e da sensibilidade aos metais.

6.3 Testes utilizando meio WC com EDTA e polissacarídeos de *P. subcapitata*

Para observação de interferência do EDTA presente no meio de cultivo sobre a toxicidade dos metais foram realizados testes ecotoxicológicos para determinação do CE_{50} para cádmio e cromo com o cladóceros *D. similis*, em diferentes concentrações das soluções de cloreto de cádmio e dicromato de potássio e adicionadas diferentes frações dos exopolissacarídeos de *P. subcapitata*, cultivados no meio WC com EDTA. Os resultados obtidos nos 4

ensaios realizados para cada amostra são apresentados nas Tabelas 10 e 11 e na Figura 19.

Tabela 10 – Valores de CE_{50} em $mg.L^{-1}$ para ensaios com cádmio e meio WC com EDTA para *Daphnia similis*

Testes ecotoxicológicos	Resultados CE_{50}				
	1º Ensaio	2º Ensaio	3º Ensaio	4º Ensaio	Média
Cádmio	0,104	0,094	0,093	0,089	0,095
Branco (cadmio + meio)	0,197	0,202	0,218	0,207	0,206
Excretado Total	0,278	0,292	0,302	0,304	0,294
Fração < 10 kD	0,275	0,258	0,282	0,254	0,267
Fração > 10 kD	0,205	0,229	0,223	0,208	0,216
Cádmio + Conc.Algas	0,094	0,093	0,098	0,095	0,095

Tabela 11 – Valores de CE_{50} em $mg.L^{-1}$ para ensaios com cromo e meio WC com EDTA para *Daphnia similis*

Testes ecotoxicológicos	Resultados CE_{50}				
	1º Ensaio	2º Ensaio	3º Ensaio	4º Ensaio	Média
Cromo	0,083	0,083	0,079	0,079	0,081
Branco (cromo + meio)	0,120	0,115	0,115	0,109	0,115
Excretado Total	0,135	0,142	0,145	0,145	0,141
Fração < 10 kD	0,137	0,126	0,132	0,132	0,132
Fração > 10 kD	0,126	0,120	0,128	0,120	0,123
Cromo + Conc.Algas	0,087	0,083	0,079	0,087	0,084

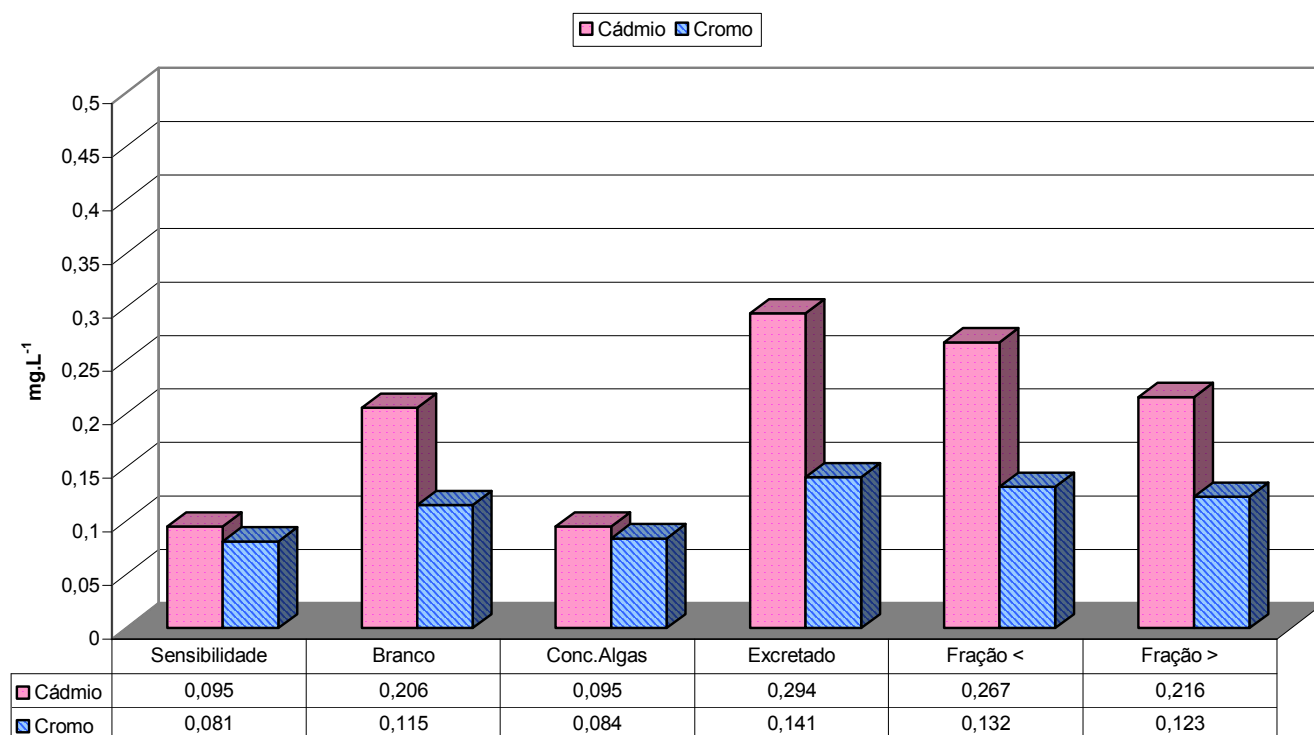


Figura 19 – Valores de CE_{50} para os metais cádmio e cromo nos ensaios ecotoxicológicos realizados com as amostras de sensibilidade (metal), branco (metal + meio), exopolissacarídeos e concentrado de algas *P. subcapitata* cultivados em meio WC com EDTA, para *D. similis*.

Nos testes realizados com a presença de EDTA no meio, como esperado, foi observado uma maior ação quelante que nos ensaios realizados sem a presença de EDTA. A ação do EDTA como complexante foi observado principalmente nos resultados do ensaio com os brancos, os quais não continham polissacarídeos. Mesmo nesta situação houve redução na toxicidade dos metais, demonstrando a ação do EDTA como quelante.

Nas amostras que foram adicionadas os exopolissacarídeos pode-se observar diminuição na toxicidade. A amostra de excretado total foi a que mostrou melhor ação quelante dentre as frações de polissacarídeos analisadas.

O EDTA é um sal de cálcio do ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), composto que extrai e solubiliza a maioria dos íons metálicos. Os íons metálicos são complexados pelos dois nitrogênios e pelos oxigênios carregados para formar um quelato (BAIRD, 2002), como mostra na Figura 20 a estrutura.

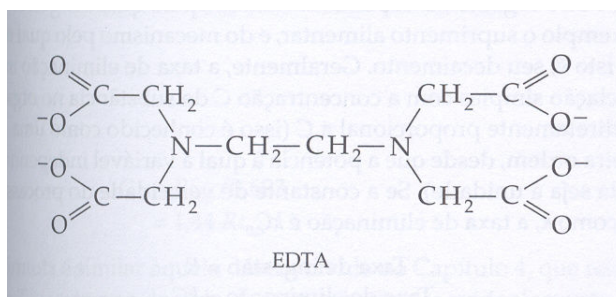


Figura 20 - Estrutura química do complexante EDTA (BAIRD, 2002).

O quelante orgânico ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) tem a propriedade de formar complexos metálicos, relativamente não tóxicos, com os metais alumínio, bário, cádmio, cobalto, cobre, ferro, chumbo, manganês, níquel, estrôncio e zinco e tem baixa especificidade para prata, cromo e tálio. Além disso, o EDTA pode reduzir a toxicidade de surfactantes catiônicos e não reage com os metais aniônicos (BOTTA-PASCHOAL, 2002).

Nos testes de avaliação e identificação da toxicidade realizados por Botta-Paschoal (2002), o EDTA foi utilizado no tratamento das amostras para

demonstrar a presença de metais, possíveis causadores da toxicidade. No caso no qual a toxicidade permaneceu inalterada, independente da concentração de EDTA utilizada, suspeitou-se de ausência de metais com afinidade pelo EDTA. (BOTTA-PASCHOAL, 2002).

A toxicidade de metais pesados em águas doces é influenciada por diversos fatores básicos na qual inclui força iônica, dureza e a presença de compostos orgânicos com propriedades complexantes.

A já comentada baixa especificidade do EDTA para o metal cromo pode ser observada neste estudo. Embora a sensibilidade do Cladocera *D. similis* seja maior ao cádmio, observou-se que quando realizados os testes com os brancos e também do excretado total e das frações de exopolissacarídeos < e > 10KD ocorreu um aumento bem maior para as amostras de cádmio do que para as amostras de cromo, indicando a eficiência do EDTA na quelatação do cádmio. Na tabela 16 os valores de TOC, para quantificar os exopolissacarídeos, é maior na amostra de excretado total 14,50 mg.L⁻¹, seguida de 8,21 mg.L⁻¹ para fração < e 3,78 mg.L⁻¹ para fração >10KD, e são compatíveis com os valores de CE₅₀ encontrados nos testes ecotoxicológicos (Figura 19).

Na amostra contendo o concentrado de algas (*P. subcapitata*) cujo meio de cultivo continha EDTA, foi realizada a lavagem das células para retirada do meio, sua ressuspensão em água de diluição e feita a contagem para especificar a quantidade oferecida como alimento. Todo este procedimento foi realizado com o objetivo de evitar a presença de substâncias complexantes nas células algais que serviram de alimento, que poderiam comprometer os resultados do ensaio.

Os resultados apresentados nas Tabelas 10 e 11 e na Figura 19 mostram que a adição das células algais de *P. subcapitata* não interferiram na toxicidade do cádmio ou do cromo, uma vez que os valores das amostras de sensibilidades dos metais foram muito próximos aos valores das amostras com adição de alimento. A CE_{50} dos metais não foram alteradas com a adição das células algais em forma de alimento a não ser quando em presença do meio (branco). Neste tipo de tratamento observa-se que o CE_{50} para cádmio passa de 0,095 para 0,206 $mg.L^{-1}$ (Tabela 10) e de 0,084 para 0,155 $mg.L^{-1}$ para o cromo (Tabela 11).

Esta diminuição da toxicidade para os metais estudados é devido à presença de EDTA no meio de cultivo. Este fato corrobora a tese de que para as comunidades aquáticas a forma livre dos íons metálicos é mais tóxica e as complexadas são aparentemente não tóxicas ou consideravelmente menos tóxicas do que os íons metálicos livres (KONG et al., 1995).

6.3.1 Correlação entre os valores da substância-referência e os metais analisados

A quantidade de cromo e cádmio presente nas amostras preparadas com dicromato de potássio e cloreto de cádmio respectivamente foram calculadas e expressas em $mg.L^{-1}$ Cr e $mg.L^{-1}$ Cd para efeito de comparação com a resolução Conama 357. Foi também realizada a conversão de $mg.L^{-1}$ para $mol.L^{-1}$, para facilitar as comparações com a literatura. Os valores estão expostos na Tabela 12.

Tabela 12 – Correlação entre os valores de CE_{50} dos ensaios com cromo e cádmio com meio WC com EDTA

Testes ecotoxicológicos	CE_{50}			
	Dicromato de Potássio (mg. L ⁻¹)	Cloreto de Cádmio (mg. L ⁻¹)	Metal (mg. L ⁻¹)	Metal (mol. L ⁻¹)
Cádmio	-	0,155	0,095	1,38 x 10 ⁻⁶
Branco (cadmio + meio)	-	0,336	0,206	3,00 x 10 ⁻⁶
Excretado Total	-	0,479	0,294	4,26 x 10 ⁻⁶
Fração < 10 kD	-	0,436	0,267	3,88 x 10 ⁻⁶
Fração > 10 kD	-	0,352	0,216	3,13 x 10 ⁻⁶
Cádmio+Alimento(Conc.Alga)	-	0,155	0,095	1,38 x 10 ⁻⁶
Cromo	0,230	-	0,081	2,21 x 10 ⁻⁶
Branco (cromo + meio)	0,324	-	0,115	3,12 x 10 ⁻⁶
Excretado Total	0,400	-	0,142	3,85 x 10 ⁻⁶
Fração < 10 kD	0,373	-	0,132	3,59 x 10 ⁻⁶
Fração > 10 kD	0,350	-	0,124	3,36 x 10 ⁻⁶
Cromo+Alimento(Conc. Alga)	0,238	-	0,084	2,29 x 10 ⁻⁶

Com os resultados foram observados que os valores de CE_{50} para os metais cromo e cádmio atendem os parâmetros estabelecidos na Resolução Conama 357/2005, conforme observados nos padrões de emissão de efluentes nas Tabelas 01 e 02, e quando adicionado o exopolissacarídeo a toxicidade diminui.

6.3.2 Redução da Toxicidade de cádmio e cromo nas amostras de *P. subcapitata* com o meio contendo EDTA.

Os valores calculados da porcentagem de redução da toxicidade dos metais cádmio e cromo estão expressos nas Figura 21 e 22.

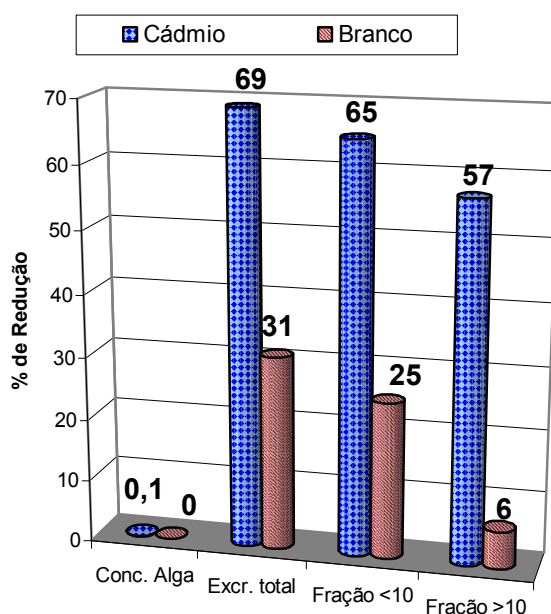


Figura 21 – Redução da Toxicidade de cádmio nos ensaios com as amostras de *P. subcapitata* para concentrado de alga e exopolissacarídeos (excretado total, fração <10KD e fração >10KD) cultivados em meio WC com EDTA para *Daphnia similis*.

A maior redução da toxicidade para o cádmio foi observada nas amostras de excretado total, fração <10KD e fração >10KD, quando relacionada as amostras do metal e o branco em meio com EDTA (Figura 21).

As amostras quando comparadas ao metal mostram os valores de redução maiores que quando comparadas às amostras com o branco.

Nos valores encontrados pode-se observar que há uma redução de até 69% na toxicidade do metal cádmio, quando adicionado os exopolissacarídeos, na forma de excretado total. Comparando a redução da toxicidade do cádmio em meio com EDTA (Figura 21) e sem EDTA (Figura 16) é possível observar a grande influência do EDTA na indisponibilização do cádmio. Enquanto no meio com cádmio e EDTA a toxicidade foi reduzida para 69, 65 e 57% na frações excretado total, <10 e >10KD, respectivamente, estes valores em meio sem EDTA foram 46, 37 e 32% quando comparados ao valor do metal cádmio (sensibilidade). A redução da toxicidade para o cádmio quando comparados ao valor do branco (metal + meio) foi reduzida para 31, 25 e 6% nas frações excretado total, <10 e >10KD (com EDTA) e 29, 17 e 9% (sem EDTA).

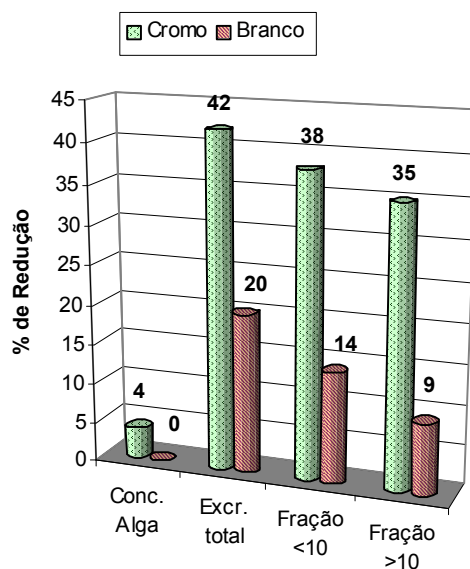


Figura 22 – Redução da Toxicidade de cromo nos ensaios com as amostras de *P. subcapitata* para concentrado de alga e exopolissacarídeos (excretado total, fração <10KD e fração >10KD) cultivados em meio WC com EDTA para *Daphnia similis*.

A exemplo do que ocorreu com o cádmio, pode-se observar na Figura 22 a redução da toxicidade para o cromo em todos os tratamentos realizados.

As amostras quando comparadas ao metal mostram os valores de redução maiores que quando comparadas às amostras com o branco.

Nos valores encontrados pode-se observar que há uma redução de 9 a 20% na toxicidade do metal cromo, quando adicionado os exopolissacarídeos, sendo que a redução mais significativa ocorreu na presença do excretado total, conforme Figura 22. Comparado a redução da toxicidade do cromo em meio sem

EDTA (Figura 17) observamos que o tratamento com EDTA foi muito mais eficiente, como ocorrido com o cádmio.

Um dos critérios para a avaliação da importância dos carboidratos solúveis de origem algal é o seu comportamento em relação aos íons metálicos. Os polissacarídeos dissolvidos são significantes na formação de complexos com esses íons e representam de 5 a 90% do carbono assimilado pelo fitoplâncton em culturas, dependendo do organismo e das circunstâncias de cultivo (GUILLARD; WANGRSKY, 1958). Esses compostos são utilizados por algumas microalgas na formação de cápsulas mucilaginosas ao redor das células (BROOK, 1981) as quais, além de servirem de proteção contra predadores (STUTZMAN, 1995), atuam também como agentes complexantes de metais e promovem a redução da toxicidade (VIEIRA; NASCIMENTO, 1988).

6.4 Ensaios ecotoxicológicos utilizando meio ASM-1-TRIS com EDTA e exopolissacarídeos extraídos de *A. spiroides*

Na determinação do CE_{50} foram realizados testes ecotoxicológicos com o cladóceros *D. similis*, em diversas concentrações das soluções de cloreto de cádmio (cádmio) e dicromato de potássio (cromo), e também, adicionadas diferentes frações dos exopolissacarídeos de *A. spiroides*, cultivados no meio de cultura ASM-1 com TRIS com EDTA. Os resultados obtidos nos 4 ensaios realizados para cada amostra estão apresentados nas tabelas 13 e 14 e Figura 23.

Tabela 13 – Valores de CE_{50} ($mg.L^{-1}$) de cádmio em meio ASM-1 com TRIS com EDTA para o cladóceros *D. similis*

Testes ecotoxicológicos	Resultados CE_{50}				
	1º Ensaio	2º Ensaio	3º Ensaio	4º Ensaio	Média
Cádmio	0,104	0,094	0,093	0,089	0,095
Branco (cadmio + meio)	0,292	0,301	0,292	0,284	0,292
Excretado Total	0,437	0,463	0,434	0,465	0,450
Fração < 10 kD	0,346	0,331	0,319	0,331	0,332
Fração > 10 kD	0,283	0,254	0,263	0,275	0,269
Cádmio + Conc.Algas	0,136	0,121	0,137	0,140	0,134

Tabela 14 – Valores de CE_{50} ($mg.L^{-1}$) de cromo em meio ASM-1 com TRIS com EDTA para o cladóceros *D. similis*

Testes ecotoxicológicos	Resultados CE_{50}				
	1º Ensaio	2º Ensaio	3º Ensaio	4º Ensaio	Média
Cromo	0,083	0,083	0,079	0,079	0,081
Branco (cromo + meio)	0,188	0,181	0,188	0,196	0,188
Excretado Total	0,233	0,244	0,268	0,224	0,242
Fração < 10 kD	0,216	0,207	0,207	0,235	0,216
Fração > 10 kD	0,181	0,190	0,209	0,200	0,195
Cromo + Conc.Algas	0,105	0,098	0,093	0,098	0,098

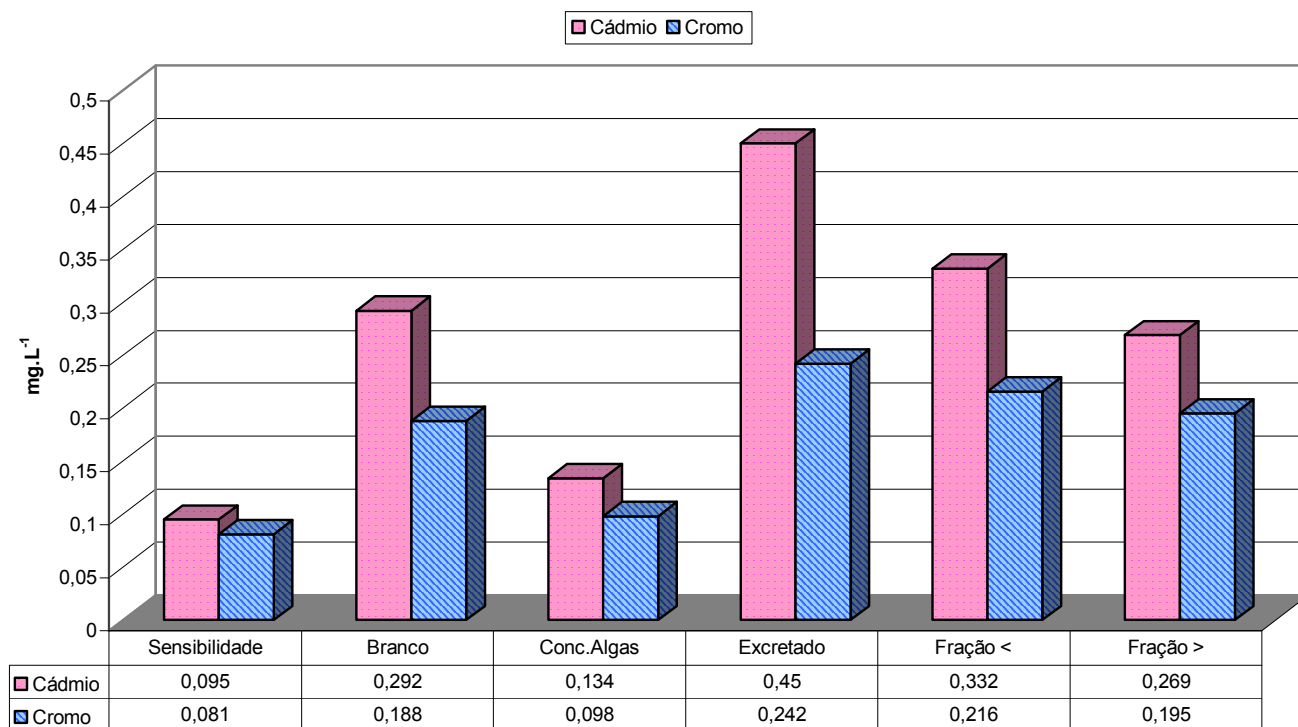


Figura 23 – Valores de CE_{50} para os metais cádmio e cromo nos ensaios ecotoxicológicos realizados com as amostras de sensibilidade (metais), branco (metal + meio), exopolissacarídeos e concentrado de algas *A. spiroides* cultivados em meio ASM-1 + TRIS com EDTA, para *D. similis*.

Os resultados da CE_{50} nos testes com cromo e cádmio utilizando o polissacarídeo produzido pela alga *A. spiroides* em meio com EDTA mostram que entre a sensibilidade dos metais cádmio e cromo e os brancos (cádmio 0,095 e branco 0,292; cromo 0,081 e branco 0,188), a redução na toxicidade foi significativa devido a presença das substâncias TRIS e EDTA nos brancos. Com a

adição dos exopolissacarídeos nos testes foi observado maior redução na toxicidade, principalmente na amostra contendo excretado total (Figura 23).

Os resultados dos ensaios realizados com a adição de concentrado de algas para o metal cádmio mostram não haver redução em relação ao branco com EDTA e a ocorrência de uma redução de 32% à sensibilidade do metal (Figura 24). Para o cromo também não ocorreu a redução em relação ao branco com EDTA e correspondeu a 18% à sensibilidade do metal (Figura 25). Pode observar que quando adicionado EDTA ao meio de cultivo a redução da toxicidade foi maior do que a encontrada na amostra de concentrado de algas, demonstrado pelo efeito das substâncias complexantes do meio.

Os resultados da CE_{50} das amostras com os metais cádmio e cromo na presença de excretado total, fração >10KD e fração < 10KD dos polissacarídeos observados na figura 23 são condizentes com os valores de TOC expressos na Tabela 18.

Na amostra de concentrado de algas da *A. spiroides* cujo meio de cultivo continha EDTA, foi realizada a lavagem das células para retirada do meio durante a filtração tangencial. No entanto neste procedimento também não foi possível separar totalmente o meio das células fitoplanctônicas. Outros procedimentos como centrifugação não são realizados devido à ineficiência da separação das células e o meio e também devido a presença de aerótopos - vacúolos gasosos das células, que não permite a sedimentação das algas. A contagem das células algais foi feita de maneira indireta pela determinação da clorofila-a para ser oferecida como alimento nos ensaios. Todo procedimento foi realizado para

minimizar as interferências causadas pela presença de substâncias complexantes nas células algais, para que não comprometessem os resultados do ensaio.

Os resultados obtidos com a adição de alimento na forma de células fitoplanctônicas demonstram que não existe alteração na toxicidade dos metais. Potanto, pode-se concluir que as células algais de *Anabaena spiroides* não alteraram a toxicidade dos metais em ensaios ecotoxicológicos agudos de 48 horas.

6.4.1 Correlação entre os valores da substância-referência e os metais analisados

A quantidade de metal presente nas amostras preparadas com dicromato de potássio e cloreto de cádmio, foi calculado e expresso em mg. L^{-1} Cr e mg. L^{-1} Cd para efeito de comparação com a resolução Conama 357, também foi calculado e expresso em mol. L^{-1} Cr e mol. L^{-1} Cd. Os valores estão na tabela 15.

Tabela 15 – Correlação entre os valores de CE_{50} dos ensaios com cromo e cádmio, com meio ASM-1 com TRIS com EDTA

Testes ecotoxicológicos	CE_{50}			
	Dicromato de	Cloreto de	Metal	Metal
	Potássio (mg. L ⁻¹)	Cádmio (mg. L ⁻¹)	(mg. L ⁻¹)	(mol. L ⁻¹)
Cádmio	-	0,155	0,095	1,38 x 10 ⁻⁶
Branco (cadmio + meio)	-	0,476	0,292	4,23 x 10 ⁻⁶
Excretado Total	-	0,734	0,450	6,53 x 10 ⁻⁶
Fração < 10 kD	-	0,541	0,332	4,81 x 10 ⁻⁶
Fração > 10 kD	-	0,438	0,269	3,90 x 10 ⁻⁶
Cádmio+Alimento(conc.alga)	-	0,218	0,134	1,94 x 10 ⁻⁶
Cromo	0,230	-	0,081	2,21 x 10 ⁻⁶
Branco (cromo + meio)	0,533	-	0,188	5,13 x 10 ⁻⁶
Excretado Total	0,685	-	0,242	6,59 x 10 ⁻⁶
Fração < 10 kD	0,612	-	0,216	5,88 x 10 ⁻⁶
Fração > 10 kD	0,552	-	0,195	5,31 x 10 ⁻⁶
Cromo+Alimento(conc.alga)	0,278	-	0,098	2,67 x 10 ⁻⁶

Com os resultados foi observado que os valores de CE_{50} do metal cromo e cádmio atendem os parâmetros estabelecidos na Resolução Conama 357/2005 conforme observados nos padrões de emissão de efluentes nas Tabelas 01 e 02, e quando adicionado o exopolissacarídeo a toxicidade diminui.

6.4.2 Redução da Toxicidade de cádmio e cromo nas amostras de *A. spiroides* com EDTA.

Os valores calculados da porcentagem de redução da toxicidade dos metais cádmio e cromo estão expressos nas Figuras 24 e 25.

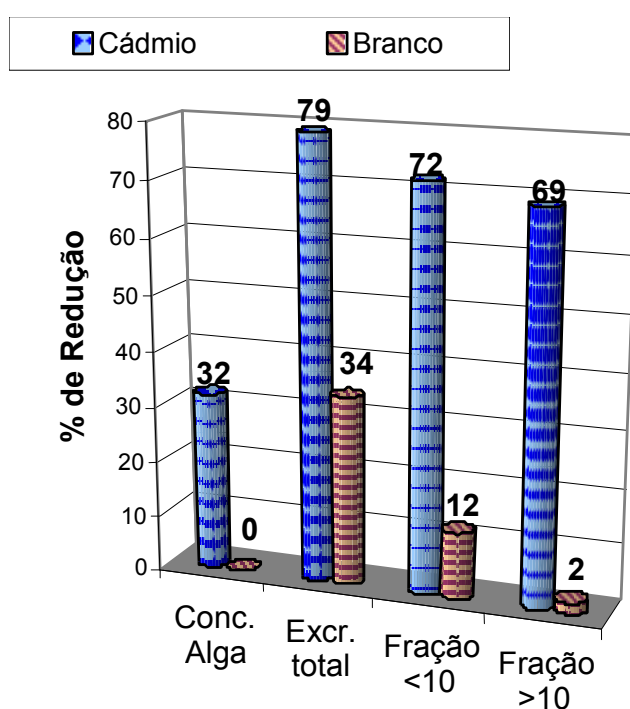


Figura 24 – Redução da toxicidade de cádmio nos ensaios com as amostras de *A. spiroides* para concentrado de alga e exopolissacarídeos (excretado total, fração <10KD e fração >10KD) cultivados em meio ASM-1 + TRIS com EDTA para *Daphnia similis*.

A redução na toxicidade para o cádmio foi observada em todos os tratamentos, ou seja, nas amostras de concentrado de alga, excretado total, fração <10KD e fração >10KD, quando comparada as amostras do metal e o branco.

As amostras quando comparadas ao metal mostram os valores de redução maiores que quando comparadas às amostras com o branco (Figura 24 e 25).

Nos valores encontrados pode-se observar que houve uma redução de 2 a 34% na toxicidade do metal, quando adicionado os exopolissacarídeos, e a maior redução ocorreu na presença de excretado total.

Pode-se observar que a redução da toxicidade de cádmio e cromo é maior quando ao tratamento de meio+EDTA é acrescentado exopolissacarídeo de *A. spiroides*. A dificuldade metodológica de remoção eficiente dos exudados destas células pode explicar esta redução mais eficiente pois compostos quelantes podem ter permanecido no meio mesmo após a lavagem das células. No entanto, mesmo com estes possíveis resquícios de quelantes, a eficiência maior foi observada nos testes realizados com cádmio, demonstrando a importância do EDTA, eficiente quelante deste metal.

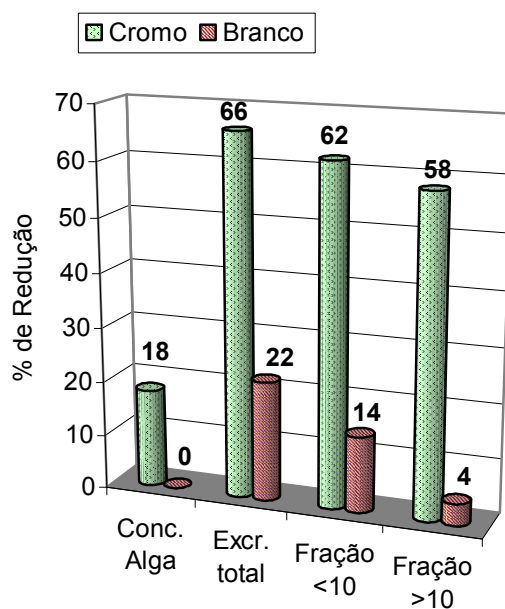


Figura 25 – Redução da toxicidade de cromo nos ensaios com as amostras de *A. spiroides* para concentrado de alga e exopolissacarídeos (excretado total, fração <10KD e fração >10KD) cultivados em meio ASM-1 + TRIS com EDTA para *Daphnia similis*.

A redução na toxicidade para o cromo foi observada nas amostras de concentrado de alga, excretado total, fração <10KD e fração >10KD, quando relacionada às amostras do metal e o branco.

As amostras quando comparadas ao metal mostram os valores de redução maiores que quando comparadas às amostras com o branco como ocorrido com quase todos os experimentos anteriores.

Nos valores encontrados pode-se observar que há uma redução de 4 a 22% na toxicidade do cádmio, quando adicionado os exopolissacarídeos para o branco, ocorrendo a maior redução na presença de excretado total.

O EDTA é o agente quelante largamente usado em meios de cultura sintético. Este composto é utilizado em culturas para precipitar o ferro formando complexos de ferro (BOSSUYT; JANSSEN , 2004). A presença de agentes quelantes em meios de cultura apresentam uma considerável redução da toxicidade do metal. (CHIAUDANI; VIGHI, 1978). Quando necessário este quelante também pode ser usado nas culturas em baixas concentrações para minimizar o efeito quelante do EDTA sobre o metal. (CLEMENT; ZAID, 2004).

Desde o início da década de cinquenta a capacidade das cianobactérias de produzir polissacarídeos extracelulares (EPS) vem sendo relatada.

Espécies encontradas no reservatório de Barra Bonita, no Estado de São Paulo, como *A. spiroides*, *A. granulata*, *M. aeruginosa*, *Microcystis* sp, *P. mucicola*, *C. menegheniana*, *Cryptomonas* sp, *D. pulchellum* e *S. indica* (DELLAMANO-OLIVEIRA, 2006) são consideradas como grandes produtoras de polissacarídeos extracelulares (EPS) (DE PHILLIPS; VICENZINI, 1998; HOAGLAND et al., 1993; GIROLDO; VIEIRA, 2002; SHIN et al., 2003).

Esses polissacarídeos podem ser encontrados formando cápsulas que são estruturas compactas associadas com a superfície celular ou como massa mucilaginosa amorfa, fracamente ligada as células (FAY, 1983). Em muitos casos, podem ser liberados para o meio (DE PHILIPPIS; VICENZINI, 1998).

A natureza aniônica dos polissacarídeos extracelulares (EPS) das cianobactérias, juntamente com as propriedades físico químicas, apresentam

vantagens para sua utilização industrial, como gelificantes, emulsificantes, floculantes, hidratantes (DE PHILIPPIS; VICENZINI, 1998; OTERO; VICENZINI, 2003) e aplicações na área de biomedicina (LEE et al., 2000; MISHIMA et al., 1998; HIRAHASHI et al., 2002), além das aplicações no campo da biorremediação para remoção de metais tóxicos de águas poluídas (SINGH et al., 1999).

A produção de EPS em excesso, por cianobactérias, em resposta ao estresse causado por metais, mostra a capacidade das microalgas de criar estratégias que garantam sua sobrevivência (DOUMIT; PINOTTI, 2004), uma vez que esse polímeros têm a capacidade de se ligar fortemente a cátions (SINGH et al., 1999).

Os exopolissacarídeos apresentam uma grande capacidade de interagir fortemente com cátions, tendo um papel importante no sequestro ou imobilização de íons metálicos (DE PHILIPPIS; VICENZINI, 1998). Também podem atuar como barreira física ao oxigênio e podem servir como quelante de ferro e cálcio, essenciais para fixação do nitrogênio (REDDY et al., 1996).

6.5 Carbono das culturas e dos meios

6.5.1 Carbono orgânico, inorgânico e total das Culturas de *P. subcapitata* e meios de cultivo.

As substâncias orgânicas comuns que contribuem para a carga de partículas coloidais em sistemas aquáticos podem ser polímeros de substância húmica ou polissacarídeos. Portanto, a quantidade de compostos orgânicos pode ser determinada a partir de frações definidas operacionalmente como matéria orgânica particulada (MOP) e matéria orgânica dissolvida (MOD). A matéria orgânica dissolvida pode também adsorver partículas e formas agregadas e ainda constituir parte da fração da MOP (NOGUEIRA, 2007).

O carbono orgânico dissolvido (COD) representa a fração quimicamente reativa na água. Esta é uma medida de moléculas orgânicas que compõem a carga orgânica dissolvida. O carbono orgânico particulado (COP) é o mesmo que o carbono orgânico suspenso, o qual é também retido por filtro de 0,45 μ m. Ele é composto de matéria orgânica de plantas e de animais e revestimentos orgânicos sobre silte e argila.

O carbono orgânico total (COT) é a soma de COD, COP e colóides. Matéria orgânica dissolvida, particulada e total (MOD, MOP, MOT) são análogas ao COD, COP e COT (THURMAN, 1985), sendo importantes nas reações químicas da água e na ligação e transporte de metais e químicos orgânicos (RAND, 1995).

Os valores dos carbonos determinados nos meios de cultivo e nas culturas de *P. subcapitata* com o meio contendo EDTA e sem EDTA estão descritas nas Tabelas 16 e 17.

Tabela 16 – Valores de carbonos na cultura e no meio de cultivo WC com EDTA de *P. subcapitata*

Carbono Orgânico, Inorgânico e Total			
Amostras – cultura <i>P. subcapitata</i>	TOC	IC	TC
com EDTA	mg. L ⁻¹	mg. L ⁻¹	mg. L ⁻¹
Meio de cultura WC com EDTA	1,56	2,54	3,96
Concentrado de algas	48,77	0,18	48,95
Excretado total	14,50	1,86	16,36
Fração > 10kD	3,78	2,37	6,15
Fração < 10kD	8,21	1,49	9,71

Tabela 17 – Valores de carbonos na cultura e no meio de cultivo WC sem EDTA de *P. subcapitata*

Carbono Orgânico, Inorgânico e Total			
Amostras – cultura <i>P. subcapitata</i>	TOC	IC	TC
sem EDTA	mg. L ⁻¹	mg. L ⁻¹	mg. L ⁻¹
Meio de cultura WC sem EDTA	1,53	2,08	3,61
Concentrado de algas	17,10	0,99	18,09
Excretado total	9,36	5,91	14,28
Fração > 10kD	2,06	1,19	3,25
Fração < 10kD	7,62	4,38	12,00

Nas amostras com EDTA e sem EDTA os valores obtidos no concentrado de algas demonstram que a ação do EDTA foi determinante para o crescimento das células algais e para a produção de exopolissacarídeos. Também pode-se observar que a produção de exopolissacarídeos foi maior na amostra de excretado total, seguida pela fração < 10KD e a fração >10KD. Entre as frações pode-se observar que pelos valores de TOC as de partículas < 10KD foi excretada em maior quantidade na cultura que as partículas >10KD (Tabelas 16 e 17).

Dentre os produtos orgânicos excretados pelo fitoplâncton os carboidratos são os mais abundantes, principalmente na forma de polissacarídeos (VIEIRA; MYKLESTAD, 1986; PAULSEN et al., 1992; PAULSEN; VIEIRA, 1994).

Em ambientes aquáticos, os polissacarídeos podem contribuir de 1 a 30% para a concentração de carbono orgânico dissolvido no ecossistema, sendo

portanto, um dos maiores componentes da fração identificável da matéria orgânica dissolvida (MOD). No que se refere aos mono e dissacarídeos algais dissolvidos (açúcares de baixa massa molecular), a principal fonte de origem em ambientes de água doce é a degradação enzimática de matéria orgânica algal, além da excreção pelas microalgas (GUILLARD; WANGERSKY, 1958; HELLEBUST, 1974). Assim, a maior parte dos carboidratos excretados por microalgas é polimérica e somente uma pequena parcela é de baixa massa molecular (HELLEBUST, 1974; WOOD; VAN VALLEN, 1990; MYKLESTAD, 1995). Os carboidratos poliméricos de origem algal podem ser estruturais, de reserva ou extracelulares.

Os carboidratos, especialmente os polissacarídeos, muitas vezes compreendem de 80% a 90% da liberação extracelular total, porém a composição e a concentração destes açúcares variam com o estado nutricional do ambiente, com o estado fisiológico do fitoplâncton (MYKLESTAD, 1995) e com a composição taxonômica da comunidade fitoplanctônica e dominância de determinadas espécies (SHIN et al., 2003).

6.5.2 Carbono orgânico, inorgânico e total das Culturas de *A. spiroides* e meios de cultivo

Os valores dos carbonos determinados nos meios de cultivo e nas culturas de *A. spiroides* com EDTA e sem a presença de EDTA estão descritas nas Tabelas 18 e 19, respectivamente.

Tabela 18 – Valores de carbonos na cultura e no meio de cultivo ASM-1 + TRIS com EDTA de *A. spiroides*

Carbono Orgânico, Inorgânico e Total			
Amostras – cultura <i>A. spiroides</i> com EDTA	TOC mg. L ⁻¹	IC mg. L ⁻¹	TC mg. L ⁻¹
Meio de cultura ASM-1+TRIS, com EDTA	3,91	3,78	7,69
Concentrado de algas	24,92	0,41	25,31
Excretado total	214,99	3,37	218,31
Fração > 10kD	61,52	0,75	62,24
Fração < 10kD	196,65	1,59	198,23

A quantidade de exopolissacarídeos presentes no excretado total foi aproximadamente 10 vezes maior que a quantidade de células algais. A capacidade de produção de exopolissacarídeos da alga *A. spiroides* (Tabela 18) é consideravelmente maior que da alga *P. subcapitata* (Tabela 16).

Os exopolissacarídeos utilizados foram separados da cultura algal quando esta se encontrava no início da fase estacionária de crescimento, devido ao fato de que é nesta fase que ocorre maior concentração de exudatos excretados, sendo estes de maior poder complexante (LOMBARDI; VIEIRA, 2000). No início da fase estacionária não ocorreu ainda liberação de toxinas produzidas por estas algas. Segundo Fogg (1983), as fases de crescimento de uma cultura de algas subdivide-se em : 1) fase lag ou introdutória, onde, aparentemente, não ocorre

aumento no número de células; 2) fase exponencial, na qual ocorre multiplicação celular rápida e o número de células aumenta em progressão geométrica; 3) fase na qual ocorre um relativo declínio de crescimento; 4) fase estacionária, na qual o número de células permanece praticamente o mesmo; 5) morte . Para este estudo foram usadas as culturas no início da fase estacionária.

Os exopolissacarídeos de cianobactérias são caracterizados por uma grande variedade tanto em número (2 a 10) como em tipo de monossacarídeos constituídos (várias combinações de açúcares neutros ou ácidos). A maioria dos polímeros apresenta natureza aniônica, devido à presença de ácidos urônicos e/ou grupos carregados tais como piruvil ou sulfato. Alguns podem apresentar moléculas polipeptídicas e substituintes acetil, causando complexidade estrutural maior (DE PHILIPPIS; VICENZINI, 1998)

A capacidade de preservação das cianobactérias reflete a estabilidade intrínseca do seu polissacarídeo extracelular (EPS) e a habilidade deste de ligar-se a metais pesados assim como resistir à degradação (HELM et al., 2000).

Tabela 19 – Valores de carbonos no meio de cultura ASM-1 + TRIS sem EDTA de *A. spiroides*

Carbono Orgânico, Inorgânico e Total			
Amostras – cultura <i>A. spiroides</i>	TOC	IC	TC
sem EDTA	mg. L ⁻¹	mg. L ⁻¹	mg. L ⁻¹
Meio de cultura ASM-1 sem EDTA	2,14	3,73	5,87

Os valores de COT obtidos mostram que a quantidade de carbono no meio sem EDTA é menor que no meio com EDTA.

6.6 Controle das amostras de concentrado de algas

Para a utilização das células algais como fonte de alimento nos testes foram avaliadas as amostras de concentrado de algas através das análises físico-químicas, conforme apresentado na Tabela 20.

Tabela 20 – Análises de parâmetros físico-químicos e biológicos dos concentrados de algas usadas para alimentação dos testes

Parâmetros	<i>P. subcapitata</i>	<i>P. subcapitata</i>	<i>A. spiroides</i>
	C/EDTA	S/EDTA	C/EDTA
Temperatura – (°C)	14,24	14,90	15,28
Condutividade – (ms. cm ⁻¹)	7,342	3,648	3,533
Sólidos Susp.Dissolv. (TDS)-(g. L ⁻¹)	6,881	3,172	3,347
Oxigênio Dissolvido – (mg.L ⁻¹)	0,89	0,81	0,78
pH	8,33	8,12	7,21
Turbidez – (NTU)	907,0	475,5	450,8
Clorofila-a – (µg. L ⁻¹)	559,3	298,3	247,3

As amostras de concentrado de algas foram mantidas sob refrigeração e para a realização das análises, foram deixadas em temperatura ambiente por 2 horas.

As amostras apresentaram valores elevados nos parâmetros analisados como condutividade, sólidos susp., turbidez e clorofila-a para a alga *P. subcapitata* com EDTA e valores menores dos mesmos parâmetros para a alga *A. spiroides* (Tabela 20).

Os resultados encontrados nestes parâmetros são compatíveis aos valores das análises de TOC, que demonstram a quantidade de carbono presente na amostra de concentrado de algas (Tabelas 16, 17 e 18). Portanto, os resultados

dos parâmetros físico-químicos para as algas demonstram a presença diferenciada do n° de células em cada amostra.

O parâmetro clorofila-a foi utilizado como medida indireta para o cálculo do número de células para amostra de *A. spiroides*, uma vez que possuía os valores do número de células das amostras de *P. subcapitata*. A medida de clorofila-a foi proporcional a quantidade do número de células algais.

7 CONCLUSÕES

Os ensaios ecotoxicológicos realizados com os metais cádmio e cromo para o organismo *Daphnia similis* demonstraram redução na toxicidade destes metais-traço quando adicionado os exopolissacarídeos de *P. subcapitata* e *A. spiroides*.

A redução da toxicidade do cádmio foi maior tanto para os ensaios com exopolissacarídeos extraídos de *P. subcapitata* quanto o extraído de *A. spiroides*. A presença de EDTA provavelmente foi responsável pela maior eficiência na redução de toxicidade do cádmio pois este composto apresenta grande afinidade com este metal.

Observou-se redução de 34% na toxicidade de cádmio e 22 % de cromo para *D. similis* na presença de frações de excretado total de exopolissacarídeo de *A. spiroides* cultivada em meio com EDTA. Os ensaios ecotoxicológicos com a fração de exopolissacarídeo >10KD extraídos de *A. spiroides* apresentaram redução da toxicidade de 2% do cádmio e 4% do cromo para *D. similis* cultivada em meio com EDTA.

O exopolissacarídeo de *P. subcapitata* cultivada no meio WC sem EDTA apresentou uma redução de 29% na toxicidade do cádmio e 22% do cromo para *D. similis* na presença de frações de excretado total, enquanto que nos testes

realizados com as frações >10KD a redução foi de 9% do cádmio e 11% do cromo.

Para *P. subcapitata* cultivada em meio WC com EDTA a redução da toxicidade foi de 6% para cádmio e 9% para cromo nos testes realizados com a amostra de exopolissacarídeo na fração >10KD. As maiores reduções foram observadas nas amostras de excretado total, sendo 31% para cádmio e 20% para cromo.

Não ocorreu alteração da toxicidade dos metais para *D. similis* quando adicionada as células de *P. subcapitata*, porque no período de análise provavelmente não teve a liberação de exopolissacarídeos, pois foram removidos o meio de cultivo e os exopolissacarídeos da *P. subcapitata* com lavagem e centrifugação. Entretanto, nos testes de toxicidade com adição de células de *A. spiroides* ocorreu discreta redução na toxicidade devido à presença de células contendo meio de cultivo, mesmo após lavagem no sistema de filtração tangencial.

Os testes ecotoxicológicos com os metais cádmio e cromo com *D. similis* apresentaram maior redução com a presença de EDTA no meio de cultivo ministrados juntamente com os exopolissacarídeos.

Observou-se, pelos valores de carbono orgânico dissolvido, maior produção de exopolissacarídeos na cultura de *A. spiroides* em relação à cultura e *P. subcapitata*. O carbono orgânico dissolvido mostrou-se excelente parâmetro para o monitoramento da quantidade de exopolissacarídeos.

8 RECOMENDAÇÕES

Estudos sobre a redução da toxicidade dos metais cádmio e cromo poderiam ser mais aprofundados quanto a adição de células algais, visto que neste trabalho estas não diminuíram a toxicidade dos metais em 48 horas, mas em experimentos de maior duração poderão ocorrer alterações na produção de exopolissacarídeos.

Com base nas informações deste trabalho outros metais com relevância ambiental poderiam ser analisados quanto a influência dos exopolissacarídeos e a redução da toxicidade.

O cultivo e extração de outras algas clorofíceas e cianofíceas deveriam ser realizadas em estudos futuros para analisar o comportamento quelante de seus exopolissacarídeos sobre metais.

Como visto no cultivos das algas ocorre a presença de exopolissacarídeos, os quais também são liberados em ambientes naturais como lagos e reservatórios, indisponibilizando os metais presentes por algum período de tempo, mas por decorrência de alterações do meio pode torná-los disponíveis novamente e provocar toxicidade aos organismos aquáticos.

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABNT NBR 12713, Associação Brasileira de Normas Técnicas, **Ecotoxicologia aquática – Toxicidade aguda – Método de ensaio com *Daphnia spp* (Cladocera, Crustácea)**, 31 de maio de 2004.

ALEXOPOULUS C.J.; BOLD, H.C. – **Current concepts in biology series : Algae and Fungi**. Collier-Macmillan, Toronto, Canada, 1967, 135p.

ALLDREDGE, A.L.; GOLTSCHALK, C.C. – The relative contribution of marine snow of different origins to biological processes in coastal waters. **Continental Shelf Research**, 1990, 10: 41-58p.

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION (APHA) – **Standard methods for the examination of water and waste**. 20^o ed., APWA, AWWA, WEF, New York, 1998.

ANDERSON, D.M.; MOREL, F.M.M. – Cooper sensitivity to *Gonyaulax tamarensis*. **Limnology and oceanography**, v.23, p.283-295, 1978

ARAUJO, R.P.A. – **Avaliação da toxicidade de sedimentos ao anfípoda de água doce *Hyalella meinerte* Stebbing, 1899 (Crustácea, Amphipoda)**. 1998, 184f. Dissertação (Mestrado em Ecologia Geral) – Instituto de Biociências, USP, São Paulo, 1998.

ARAUJO, R.P.A. – Orientação para manutenção, cultivo e realização de testes de toxicidade com *Daphnia*. In: **Métodos de avaliação da toxicidade de poluentes a organismos aquáticos**, Volume 1, CETESB, São Paulo, 1999, 51-60p.

ARAGÃO , M.A.; ARAUJO, R.P.A. – Métodos de ensaios de toxicidade com organismos aquáticos. In: ZAGATTO, P.A.; BERTOLETTI, E., edit. – **Ecotoxicologia aquática: Princípios e aplicações**. Rima, São Carlos, 2006, 117-152p.

AZEVEDO, F.A.; LIMA, I.V. - Toxicocinética. In: AZEVEDO, F.A.; CHASIN, A. A. M. – **As Bases Toxicológicas da Ecotoxicologia**. Rima, São Carlos, Intertox, São Paulo, 2003, 28-91p.

BAIRD, C. – **Química ambiental**. 2ª edição, Bookman, Porto Alegre, 2002, 403-439p.

BELLOTTO, V.R.; MIEKELEY, N. – Bioacumulação de metais-traço (Cd, Cu, Mn, Pb) no mexilhão *Perna perna* para exposições de curta duração – Influência da concentração de metais na água do mar. In: **VI Encontro de Ecotoxicologia -**

Ecotoxicologia e desenvolvimento sustentável: Perspectivas para o século XXI. São Carlos, 2000, p-91.

BERGMAN, L.; PUGH, D.M. – Environmental Toxicology, Economics and Institutions: The Atrazine case study. **Kluwer Academic Publishers**, V. 8, 1994, 01-89p.

BERNI, C.R.; ALMEIDA, C. A ; PASCHOAL, C.B.; OLIVEIRA-NETTO, A ; MASUTTI, M.B. – Toxicidade aguda do metal cádmio para organismo bentônico *Chironomus xanthus* (Díptera) em meio com a presença de polissacarídeo excretado pela Cianobactéria *Anabaena spiroides* . In: HERKOVITS, J. – **Toxicología y Química Ambiental, Contribuciones para un Desarrollo Sustentable.** SETAC, Buenos Aires, Argentina, 2003, Cap.4, 185-187p.

BICUDO, C.E.M. ; BICUDO, R.M.T. – **Algas de águas continentais Brasileiras. Fundação Brasileira para Desenvolvimento do Ensino de Ciências.** (FUNBEC), Editora Universidade de São Paulo, São Paulo, 1970, 228p.

BITTAR, T.B. – **Produção de TEP (Transparent Exopolymer Particles) em culturas de três espécies de microalgas isoladas do reservatório de Barra Bonita (Rio Tietê/SP).** 2005. 87f. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP, 2005.

BITTON, G.; DUTKA, B.J. – **Toxicity testing using microorganisms**. CRC Press, Inc., Boca Raton, Flórida, United States, 163p.

BONEY, A.D. – Mucilage: the ubiquitous algal attribute. **Br Phycol. J.**, v.16, p. 115-132, 1981.

BOSSUYT, B.T.A ; JANSSEN, C.R. – Long-term acclimation of *Pseudokirchneriella subcapitata* (Korshikov) hindak to different copper concentrations: changes in tolerance and physiology. **Aquatic Toxicology** 68, 2004, 61-74p.

BOTTA-PASCHOAL C.M.R. – **Avaliação ecotoxicológica de sedimentos em reservatórios da Bacia do Rio Tietê, SP, com ênfase na aplicação do estudo de AIT – Avaliação e Identificação da Toxicidade**. 2002. 162p. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo, São Carlos, 2002.

BOU-OLAYAN, A.; AL-MATTAR, S.; ALYAKOUB, S.; AL-HAZEEM, S. – Marine Pollution. V.30., **Bull. Environ. Contam. Toxicol** , 1995, 211-214p.

BOUDOU, A. ; RIBEYRE, F. – Fundamentals concepts in aquatics ecotoxicology. In: BOUDOU, A. ; RIBEYRE, F., **Aquatic Ecotoxicology**. Boca Raton, CRC Press, Inc., 1989, v.1, 35-74p.

BRAILE, P.M; CAVALCANTI, J.E.W.A - **Manual de Tratamento de Águas Residuárias Industriais** - CETESB – Companhia de Tecnologia e Saneamento Ambiental, 1993.

BRANCO, S.M. – **Hidrobiologia aplicada a engenharia sanitária**. CETESB/ASCETESB, São Paulo,1986, 616p.

BRASIL - Ministério do Meio Ambiente - MMA. Conselho Nacional do Meio Ambiente – CONAMA - **Resolução nº 357 – Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências**. De 17 de março de 2005. Diário Oficial da União, Brasília, 18 de março de 2005, 23p.

BREMER, P.J. & LOUTITI, M.W. - Bacterial polysaccharide as a vehicle for entry of Cr(III) to a food chain. **Mar. Environ. Res.**, v.20, 1986, 235-248 p.

BROOK, A.J. – The biology of Desmids. **Botanical Monographs**, v.16, Blackwell Scientific, Oxford, 276p., 1981.

BUTLER,G.C. – **Principles of toxicology**. Scientific Committee Problems of the Environmental (SCOPE) of the International Council of Scientific Unions. SCOPE Report 12. John Wiley & Sons,1978, 350p.

CAIRNS, J.J.; PRATT, J.R. – The scientific basis of bioassays. In: MUNAWAR, M. et al – **Environmental bioassay Techniques and their Application**. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 1990, 05-20p.

CALIJURI, M.C.; ALVES, M.S.A.; DOS-SANTOS, A.C.A. - **Cianobactérias e cianotoxinas em águas continentais**. Rima, São Carlos, 2006, 109p.

CALOTO-OLIVEIRA. – ***Pseudokirchneriella subcapitata***. Arquivo pessoal, outubro/2005.

CAMPANELLA, L.; CONTO, M.E.; CUBADDA, F.; SUCAPANE, C. – Trace metals in sea-grass, algae and molluscs from uncontaminated area in Mediterranean. **Environ. Poll.**, v. 111, 2001, 117-126p.

CARMICHAEL, W.W. – Cyanobacteria secondary metabolites – The Cyanotoxins. **Journal of Applied Bacteriology**, 1992, 72: 445-459p.

CASINI, S.; DEPLEDGE, M.H. – Influence of cooper, zinc and iron on cadmium accumulation in the Talitrid Amphipod, *Platochestia platensis*. **Bull. Environ. Contam. Toxicol.**, v. 59, 1997, 500-506p.

CETESB - Companhia de Tecnologia e Saneamento Ambiental – **Procedimentos para utilização de testes de toxicidade no controle de efluentes líquidos**. Série Manuais/ Secretaria do Meio Ambiente, São Paulo, 1990, 17p.

CETESB – Companhia de Tecnologia e Saneamento Ambiental - **Água – Teste de toxicidade aguda com *Daphnia similis*, Claus, 1876 (CLADOCERA, CRUSTACEA)**. Método de Ensaio, Norma Técnica L5.018 São Paulo, 1994, 17p.

CETESB - Companhia de Tecnologia e Saneamento Ambiental – Cultivo e testes de toxicidade com *Daphnia similis*. In: **Metodos de avaliação da toxicidade de poluentes a organismos aquáticos**. Secretaria do Meio Ambiente, São Paulo, 2004.

CHASIN, A.A.M.; CARDOSO, L.M.N. – Cádmiu. In: AZEVEDO, F.A ; CHASIN, A A M. – **Metais: Gerenciamento da Toxicidade**. Editora Atheneu, São Paulo, 2003, Cap. 10, 263-298p.

CHAPMAN, P.M.; ALLEN, H.; GODTFREDSSEN, K.; GRAGGEN, M.N. – Evaluation of bioaccumulation factors in regulating metals. **Environ. Science & Technol.**, 30 (10),1996, 448A-452Ap.

CHIAUDANI, G. ; VIGHI, M. – The use of *Selenastrum capricornutum* batch cultures in toxicity studies. **Mitt. Internat. Verein. Limnol.**, v. 21, p. 316-329, 1978.

CHO, B.C.; AZAM, F. Major role of bacteria in biogeochemical fluxes in the ocean's interior. **Nature**, v.332, p.441-443,1988.

CHORUS, I.; BARTRAM, J. – **Toxic cyanobacteria in water – A guide to their public health consequences, monitoring and management.** E & FN Spon, London, 1999, 414p.

CID, A.; TORRES, E.; HERRERO, C.; ABALDE, J.E. - Disorders provoked by copper in the marine diatom *Phaeodactylum tricornutum* in short-time exposure assays. **Cah. Biol. Mar.** 38: 201-206, 1997.

CLEMENT, B.; ZAID, S. – A new protocol to measure the effects of toxicants on daphnid-algae interactions. **Chemosphere**, v.55, p. 1429-1438, 2004.

COLOMBO, C.M.; VIEIRA, A.A.H.; MORAES, G. – Activity of glycosidases from freshwater heterotrophic microorganisms on the degradation of extracellular polysaccharide produced by *Anabaena spiroides* (Cyanobacteria). **Brazilian Journal of Microbiology**, 2004, 35 : 110-116p.

DE CONTO CINIER, C.; PETIT-RAMEL, R.; FAURE, R.; BORTOLATO, M. – Cadmium accumulation and metallothionein biosynthesis in *Cyprinus carpio* tissues. **Bull. Environ. Contam. Toxicol.**, v. 61, 1998, 793-799p.

DE PHILIPPIS, R.; VINCENZINI, M. – Exocellular polysaccharides from cyanobacteria and their possible applications. **FEMS Microbiology Reviews**, Amsterdam, v.22, p.151-175, 1998.

DELLAMANO-OLIVEIRA, M.J. – **Comunidade fitoplanctônica do reservatório de Barra Bonita e sua relação com a composição e quantidade de polissacarídeos extracelulares e agregados gelatinosos.** 2006, 140f. Tese de Doutorado. Universidade Federal de São Carlos, SP, 2006.

DI BERNARDO, L. – **Algas e suas influências na qualidade das águas e nas tecnologias de tratamento.** ABES, Rio de Janeiro, 1995, 140p.

DOUMIT, C. N.; PINOTTI, M.P. – Exopolissacarídeos de cianobactérias. **Semina: Ciências exatas e tecnológicas**, Londrina, v.25, n.1, p.43-52, 2004.

DULCINI, S.E.M. – **Produção de exopolissacarídeos em diferentes fases do crescimento de *Staurastrum tohopekaligiensis* Wolle (Chlorophyceae).** 1996, 63f. Dissertação de mestrado, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP, 1996.

EL HISSY, F.T.; EL NAGDY, M.A.; EL SHAROUNY, H.M.; ABD ELAAH, G.A. - Effect of the fungicide chlorothalonil (Bravo) on some metabolic activities of aquatic fungi. **Folia Microbiologica** 40: 341-344p., 1995.

ESPINDOLA, E.L.G.; BOTTA-PASCHOAL, C.M.R.; ROCHA, O. ; BOHRER, M.B.C.; OLIVEIRA-NETO, A L. – **Ecotoxicologia : Perspectivas para o século XXI.** Editora Rima, São Carlos, SP, 2000, 575p.

ESTEVES, F. A – **Fundamentos de limnologia**. Editora Interciência, 2 ed, Rio de Janeiro, 1998, 602p.

EVANDRI, M.G.; COSTA, L.G.; BOLLE, P. - Evaluation of brominated diphenyl ether-99 toxicity with *Raphidocelis subcapitata* and *Daphnia magna*. **Environ. Toxicol. Chem.** 22: 2167-2172 p., 2003.

FATHI, A. A.; EL-SHAHED, A. M. - Response of tolerant and wild strains of *Scenedesmus biguja* to copper. **Biol. Plant.** 43: 99-103 p., 2000.

FELSOT, A. S.; RACKE, K.D.; HAMILTON, D.J. - Disposal and degradation of pesticide waste. **Rev. Environ. Contam. Toxicol.** 177: 123-200 p., 2003.

FERRARI, L.; MASTRÁNGELO, M.M.; BONEMBERG-CHARLOF, P.S.; SALIBIÁN, A. – **Toxicidad del cadmio en larvas de *Bufo arenarum*: interacciones con calcio y sustancias húmicas**. IX Congresso Brasileiro de Ecotoxicologia, São Pedro, São Paulo, 2006, p.50.

FERREIRA, A. G.; MACHADO, A.L.S.; ZALMON, I.R. – Metais pesados em moluscos bivalves no litoral norte do Estado do Rio de Janeiro. IN: ESPINDOLA, E.L.G.; BOTTA-PASCHOAL, C.M.R.; ROCHA, O. ; BOHRER, M.B.C.; OLIVEIRA-NETO, A L. – **Ecotoxicologia : Perspectivas para o século XXI**. Editora Rima, São Carlos, SP, 2000, 575p.

FERNICOLA, N.A. G.G.; BOHRER-MOREL, M.B.C.; BAINY, A. C.D.-
Ecotoxicologia. In: AZEVEDO, F.A.; CHASIN, A. A. M. – **As Bases Toxicológicas da Ecotoxicologia**. Rima, São Carlos, Intertox, São Paulo, 2003, 221-243p.

FIORENTINO, A.; GENTILI, A.; ISIDORI, M.; MONACO, P.; NARDELLI, A.;
PARRELLA, A.; TEMUSSI, F. - Environmental effects caused by olive mill
wastewaters: toxicity comparison of low molecular weight phenol components.
J. Agric. Food Chem. 51: 1005-1009 p., 2003.

FOGG, G.E. **Algal cultures and phytoplankton Ecology**. 2° ed. University of
Wisconsin, p.12-36, 1983.

FONSECA, A. L. – **Avaliação da qualidade da água na bacia do Rio Piracicaba/SP através de testes de toxicidade com invertebrados**. 1997, 184f.
Tese de doutorado na área de Hidráulica e Saneamento – Escola de Engenharia de São Carlos, USP, São Carlos, 1997.

FREIRE-NORDI, C.S.; VIEIRA, A.A.H. – Degradability of polyssacharides
compounds excreted by *Ankistrodesmus densus* Kors. (Chlorophyceae) in cultures
of natural bacterial communities. **Verh. Internat Verein. Limnologie**, 1998, 26:
1685-1688p.

FRIAS-ESPERICUETA, M.G.; OASUNA-LÓPEZ, J.I.; SANDOVAL-SALAZAR, G.; LÓPEZ-LÓPEZ, G. – Distribution of trace metals in different tissues in the rock oyster *Crassostrea iridescens*: seasonal variation. **Bull Environ. Contam. Toxicol.**, 1999, 73-79p.

GIROLDO, D.; VIEIRA, A. A. H.; NASCIMENTO, O.R. – The metal binding capacity of *Anabaena spiroides* extracellular polysaccharide: an EPR study. **Process Biochemistry**, 2002, 40: 2215-2224p.

GOES, R.C. – **Toxicologia industrial**. Livraria e Editora Revinter Ltda, Rio de Janeiro, RJ, 1998, 250p.

GOODMAN, L.S.; GILMAN, A.E.D. – **As bases farmacológicas da terapêutica**. 4 ed, Guanabara-Koogan, Rio de Janeiro, 1973, 08-10p.

GAVEL; MARSALEK – Foto - Disponível em www.terramare.de/cyanotox.htm. Acesso em 10/12/2005.

GIROLDO, D. ; VIEIRA, A.A.H. – An extracellular sulfated fucose-rich polysaccharide produced by a tropical strain of *Cryptomonas obovata* (Cryptophyceae). **Journal of Applied Phycology**, v.14, p. 185-191, 2002.

GOODWIN, K.L. – **Cianobactérias da represa da Pampulha**. 1996. Dissertação de mestrado. ICB, UFMG, 1996.

GORHAM, P.R.; MCLACHLAN, J.; HAMMER, U.T.; KIM, W.K. – Isolation and culture of toxic strains of *Anabaena flosaquae*. (Lingb.) Verh. – **Int. Ver. Theor. Angew. Limnol.** 15: 769-780p., 1964.

GOUVÊA, S.P.; VIEIRA, A. A. H.; LOMBARDI, A. T. – Cooper and cadmium complexation by high molecular weight materials and of water from a eutrophic reservoir. **Chemosphere**, 2005, 1332-1339p.

GREMM, T.J. – **Dissolved carbohydrates in streamwater determined by HPLC and pulse amperometric detection**, 1997, 42: 385-393p.

GROSSART, H. P.; HIETANEN, S.; PLOUG, H. – Microbial dynamics on diatom aggregates in Øresund, Denmark. **Marine Ecology Progress series**, 2003, 249: 69-78p.

GROSSART, H.P. ; SIMON, M. – Limnetic macroscopic organic aggregates (lake snow): occurrence, characteristics and microbial dynamics in lake Constance. **Limnology and Oceanography**, v.38 (3), p. 532-546, 1993.

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

GUILLARD, R.R.L.; WANGERSKY, P.J. – The production of extracellular carbohydrates by some marine flagellates. **Limnology Oceanography**, v.3, p.449-454, 1958

HAMILTON, M.A.; RUSSO, R.C.; THRUSTON, R.V. – Trimmed Spearman-Kärber method for estimated median lethal concentration in toxicity bioassays. **Environment Science and Technology**, 1978, 11(7):714-719p.

HEIJERICK, D.G.; DE SCHAMPHELAERE, K.A.C.; JANSSEN, C. R. - Biotic ligand model development predicting Zn toxicity to the alga *Pseudokirchneriella subcapitata*: Possibilities and limitations. **Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.** 133C: 207-218p., 2002.

HELLEBUST, J.A. Extracellular products. In: Stewart, W.D.P. editors. Algal physiology and biochemistry. **Botanical Monographs**, v.10 Blackwell scientific, Oxford, p. 838-863, 1974.

HELM, R. F.; HUANG, Z.; EDWARDS, D.; LEESON, H.; PEERY, W.; POTTS, M. – Structural characterization of the released polysaccharide of desiccation-tolerance *Nostoc commune* DRH-1. **Journal of Bacteriology**, Washington, v.182, p. 974-982, 2000.

HIRAHASHI, T.; MATSUMOTO, M.; HAZEKI, K.; SAEKI, Y.; UI, M.; SEYA, T. – Activation of the human innate immune system by Spirulina: augmentation of

interferon production and NK cytotoxicity by oral administration of hot water extract of *Spirulina platensis*. **International Immunopharmacology**, Amsterdam, v.2, p.423-434, 2002.

HOAGLAND, K. D.; ROSOWSKI, J. R.; GRETZ, R. & ROEMER, S. C. - Diatom extracellular polymeric substances: function, fine structure, chemistry and physiology. **Journal of Phycology**, 29, p.537-566, 1993.

HURTIG, A.K.; SAN SEBASTIAN, M.; SOTO, A.; SHINGRE, A.; ZAMBRANO, D.; GUERRERO, W. - Pesticide use among farmers in the Amazon basin of Ecuador. **Arch. Environ. Health** 58: 223-228p., 2003.

IBAMA - **Manual de testes para a avaliação da ecotoxicidade de agentes químicos**. Secretaria do Meio Ambiente. Brasília, 1989, 351p.

IPEN – *Daphnia similis* – Disponível em www.ipen.br. Acesso em 20/11/2005.

JARDIM, W.F.; PEARSON, H.W. – A study of the copper-complexing compounds released by some species of cyanobacteria. **Water Res.**, 18 (8), 1984, 985-989p.

JENSEN, T.E.; BAXTER, M.; RACHLIN, J.W.; JANI, V. – Uptake of heavy metals by *Plectonema boryanum* (Cyanophyceae) into cellular components especially polyphosphate bodies: an x-ray energy dispersive study. **Environmental Pollution (Série A)** 27, 1982, 119-127p.

JERGENTZ, S.; MUGNI, H.; BONETTO, C.; SCHULZ, R. - Runoff-related endosulfan contamination and aquatic macroinvertebrate response in rural basins near, Buenos Aires, Argentina. **Arch. Environ. Contam. Toxicol.** 46: 345-352p., 2004.

JIN-CLARK, Y.; LYDY, M.J.; ZHU, K.Y. - Effects of atrazine and cyanazine on chlorpyrifos toxicity in *Chironomus tentans* (Diptera: Chironomidae). **Environ. Toxicol. Chem.** 21: 598-603p., 2002.

JONSSON, C.M.; TOLEDO, C.M.F. - Acute toxicity of endosulfan in the fish *Hyphessobrycon bifasciatus* and *Brachydanio rerio* . **Arch. Environ. Contam. Toxicol.** 24: 151-155p., 1993.

JONSSON, C.M.; MAIA, A. H. N. - **Protocolo de avaliação de agentes microbianos de controle biológico de pragas para registro como biopesticidas. III. Testes em organismos não alvo do ambiente aquático.** Embrapa, Meio Ambiente, Serie Documentos, 1999, 33 p.

KALAY, M.; AY, Ö.; CANLI, M. – Heavy metals concentrations in fish tissues from the northeast Mediterranean sea. **Bull. Environ. Contam. Toxicol.**, v. 63, 1999, 673-681p.

KASAI, F. & HATAKEYAMA, S. - Herbicide susceptibility in two green algae, *Chlorella vulgaris* and *Selenastrum capricornutum*. **Chemosphere** 27: 899-904p., 1993.

KEDDY, C.J.; GREENE, J.C.; BONNEL, M.A . - Review of whole-organism bioassay: soil, freshwater, sediment, and freshwater assessment in Canada. **Ecotoxicol. Environm. Saf.** 30: 221-251p., 1995.

KONG, F.X.; HU, W.; LIU, Y. - Molecular structure and biochemical toxicity of four halogeno-benzenes on the unicellular green alga *Selenastrum capricornutum*. **Environ. Exp. Bot.** 40: 105-111p., 1998.

KONG, I.C.; BITTON, G.; KOOPMAN, B. & JUNG, K. – Heavy metal toxicity testing in environmental samples. **Rev. Environ. Contam. Toxicol**, 1995, 119-142p.

LACERDA, L.D.; CARVALHO, C.E.V.; GOMES, M.P. – Nota sobre distribuição de Manganês, Zinco e cobre em siris da Baía de Sepetiba. **Rev. Brasil Biologia**, 49 (3): 847-849p.

LARINI, L. – **Toxicologia dos Inseticidas**. Sarvier, São Paulo, SP, 1979.

LARINI, L.; CECCHINI, R. – A intoxicação como fenômeno biológico. In: LARINI, L. – **Toxicologia**. Editora Manole Ltda, 3 ed., São Paulo, SP, 1997, Cap.1, 01-12p.

LEE, J.B.; HAYASHI, T.; HAYASHI, K.; SANKAWAT, U. – Structural analysis of calcium Spirulan (Ca-SP) – derived oligosaccharides using eletrospray ionization mass spectrometry. **Journal of Natural Products**, Columbus, v.63, p. 136-138, 2000.

LEE, R.E. - **Phycology**. Cambridge University Press, Cambridge, 1989, 645 p.

LELAND, H.V.; KUWABARA, J.S. - Trace metals. In: RAND, G.M. and PETROCELLI, S.R. **Fundamentals of aquatic toxicology: Methods and application**. Hemisphere Publishing Corporation, Washington, 1985, 374-415p.

LEHNINGER, A.L. – **Princípios de bioquímica**. Sarvier, São Paulo, 1990, 205-221p.

LIANG, Y; CHEUNG, R.Y.H.; WONG, M.H. – Reclamation of wastewater for polyculture of freshwater fish : Bioaccumulation of trace metals in fish. **Wat. Res.**, v. 33, n. 11, 1999, 2690-2700p.

LOMBARDI, A T.; VIEIRA, A A H – Cooper complexation by Cyanophyta and Chlorophyta exudates. **Phycologia**, 2000, 39: 118-125p.

LOMBARDI, A.T.; VIEIRA, A.A.H. – Lead and copper-complexing extracelullar ligands released by *Kirchneriella aperta* (Chlorococcales, Chlorophyta). **Phycologia**, v.38 (4), p. 283-288, 1999.

LOMBARDI, A T.; VIEIRA, A A H.; SARTORI, A L. – Extracellular carbohydrate production by *Micrasterias furcata* (Desmidiaceae) grown in various nitrate concentrations. **Hoehnea** 25 (1), 1998, 01-09p.

LOPES, S.G.B.C. - **Seres Vivos**. 8ª edição, Ed. Saraiva, São Paulo, 1992, 332p.

LU,F.C. – **Basic toxicology – Fundamentals, target organs and risk assessment**. Poisons, 1985, 276p.

LUKAK, M.; AEGERTER, R. – Influence of trace metals on growth and toxin production *Microcystis aeruginosa*. **Toxicon**. 31 (3), 1993, 293-305p.

LUND, H.C.; LUND.J.W.G. – **Freshwater algae: Their microscopic world explored**. *Selenastrum capricornutum*, Biopress Ltd., Bristol, England, 2005.

MANTELATTO, F.L.M.; AVELAR, W.E.P.; SILVA, D.M.L.; TOMAZELLI, A.C.; LOPEZ, J.L.C.; SHUHAMA, T. – Heavy metals in the shrimp *Xiphopenaeus kroyeri* (Heller, 1862) (crustacea, Penaeidae) from Ubatuba bay, São Paulo, Brazil. **Bull. Environ. Contam. Toxicol.**, v. 62, 1999; 152-159p.

MASUTTI, M.B.; PANITZ, C.M.N.; PEREIRA, N.C. – Biodisponibilidade e bioconcentração de metais-traço no manguezal do Itacorubi (Florianópolis, SC). In: ESPINDOLA, E.L.G.; et al. – **Ecotoxicologia : Perspectivas para o século XXI**. Editora Rima, São Carlos, SP, 2000, 207-219p.

McNIGHT, D.M.; MOREL, F.M.M. Copper complexation by siderophores from filamentous blue-green algae. **Limnology and Oceanography**, v.25, p.62-71, 1980.

MEON, B.; KIRCHMAN, D.L. – Dynamics and molecular composition of dissolved organic material during experimental phytoplankton blooms. **Marine Chemistry**, 2001, 75: 185-199p.

MELLER, M.; EGELER, P.; ROMBKE, J.; SCHALLNASS, H.; NAGEL, R.; STREIT, B. - Short-term toxicity of lindane, hexachlorobenzene, and copper sulfate to tubificid sludgeworms (*Oligochaeta*) in artificial media. **Ecotoxicol. Environ. Saf.** 39: 10-20p., 1998.

MISHIMA, T.; MURATA, J.; TOYOSHIMA, M.; FUJII, H.; NAKAJIMA, M.; HAYASHI, T.; KATO, T.; SAIKI, I. – Inhibition of tumor invasion and metastasis by calcium Spirulan (Ca-SP), a novel sulfated polysaccharide derived from a blue-green alga, *Spirulina platensis*. **Clinical & Experimental Metastasis**, Oxford, v.16, p. 541-550, 1998.

MIYASHITA, N.J.; NUVOLARI, A – A preparação para execução das obras. In: NUVOLARI, A et al – **Esgoto Sanitário, Coleta, Transporte, Tratamento e Reuso Agrícola**. Editora Edgard Blucher Ltda., 1 ed, São Paulo, SP, 2003, Cap.5, 87-136p.

MYKLESTAD, S.M. - Release of extracellular products by phytoplankton with special emphasis on polysaccharide. **Sci. Total. Environ.**, v.165, p.155-164, 1995.

MOENNE, A. - Eucaryotic metallothioneins: proteins, gene regulation and copper homeostasis. **Cah. Biol. Mar.** 42: 125-135p., 2001.

MOPPER, K.; SCHULTZ, C.A.; CHEVOLOT, L.; REVUELTA, R.; DAWSON, R. – Determination of sugar in unconcentrated seawater and other waters by liquid chromatography pulse amperometric detection. **Environment Science Technology**, 1992, 26: 133-138p.

MORAES, A.J. – **Manual para avaliação da qualidade da água – 1**. Rima, São Carlos, 2001, 45p.

MUYSSSEN, B.T.A.; JANSSEN, C.R. - Zinc acclimation and its effect on the zinc tolerance of *Raphidocelis subcapitata* and *Chlorella vulgaris* in laboratory experiments. **Chemosphere** 45: 507-514p., 2001.

NICOLAU, A.; MOTA, M.; LIMA, N. - Effect of different toxic compounds on ATP content and acid phosphatase activity in axenic cultures of *Tetrahymena pyriformis*. **Ecotoxicol. Environ. Saf.** 57: 129-135p., 2004.

NICOLAUS, B.; PANICO, A.; LAMA, L.; ROMANO, I.; MANCA, M.C.; DE GIULIO, A.; GAMBACORTA, A. – Chemical composition and production of

exopolysaccharides from representative members of heterocystous and non-heterocystous cyanobacteria. **Phytochemistry**, 1999, 52: 639-647p.

NIMMO, D.R. - Pesticides. In: RAND, G.M. and PETROCELLI, S.R. **Fundamentals of aquatic toxicology: Methods and application**. Hemisphere Publishing Corporation, Washington, 335-373p., 1985.

NOGUEIRA, P.F.M. – **Interpretação entre a matéria orgânica natural, o cobre e microrganismos heterotróficos: implicações na dinâmica do metal e sua disponibilização para a biota aquática**.2007. 163f. Tese (doutorado) Departamento de Ecologia e Recursos Naturais, Universidade Federal de São Carlos, 2007.

NOGUEIRA, P.F.M.; MELÃO, M.G.G.; LOMBARDI, A.T.; VIEIRA, A.A.H. – The effects of *Anabaena spiroides* (Cyanophyceae) exopolysaccharide on copper toxicity *Symocephalus serrulatus* (Cladocera, Daphnidae). **Freshwater Biology**, 2005, 50: 1560 – 1567p.

ODUM, E.P. – **Ecologia**. Editora Guanabara, Rio de Janeiro, RJ, 1988, 578p.

OECD - Organization for Economic Cooperation and Development - **Guidelines for Testing of Chemicals**, Paris, 1981.

OLIVEIRA-NETO, A L. – **Toxicidade de alguns metais pesados (Cd, Cr, e Pb) em organismos Planctônicos Lacustres**. 1999. Tese de Doutorado. Escola de Engenharia de São Carlos. Universidade de São Paulo, São Carlos, SP, 1999.

OLIVEIRA-NETO, A L.; BOTTA-PASCHOAL, C.M.R. – Sensibilidade do Cladóceras Lacustre Planctônico *Ceriodaphnia silvestri* (Família Daphnidae) ao metais cádmio, cromo e chumbo. In: ESPINDOLA, E.L.G.; et al. – **Ecotoxicologia : Perspectivas para o século XXI**. Editora Rima, São Carlos, SP, 2000, 537-543p.

ORTIZ, J.B.; GONZALEZ DE CANALES, M. L.; SARASQUETE, C. - Histopathological changes induced by lindane (gamma-HCH) in various organs of fishes. **Scientia Marina** 67: 53-61P., 2003.

OTERO, A.; VINCENZINI, M. – Extracellular polysaccharide synthesis by *Nostoc* strains as affected by N source and light intensity. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v.102, p. 143-153, 2003.

PANG, X.P.; LETEY, J. - Pesticide leaching sensitivity to irrigation, salinity and N application: Model simulations. **Soil Sci.** 164: 922-929P., 1999.

PAULSEN, B.S.; ASLAKSEN, T.; FREIRE-NORDI, C.S.; VIEIRA, A.A.H. – Extracellular polysaccharides from *Ankistrodesmus densus* (Chlorophyceae). **J. Phycol.**, v.34, p. 638-641, 1998.

PAULSEN, B.S.; VIEIRA, A.A.H. - Structural studies on extracellular dissolved and capsular polyssacharides produced by *Spondylosium panduriforme*. **Journal of Phycology**, v.30, n.4, p.638-641, 1994.

PAULSEN, B.S. ; VIEIRA, A.A.H. – Structure of the capsular and extracellular polysaccharides produced by the desmid *Spondylosium panduriforme* (Chlorophyta). **J. Phycol.**, v.30, p.638-641, 1994.

PAULSEN, B.S.; VIEIRA, A.A.H.; KLAVENESS,D. - Structure of extracellular polyssacharides produced by soil *Cryptomonas* sp (Cryptophyceae). **Journal of Phycology**, v. 28, n.1, p.61-63, 1992.

PELCZAR-JR, M.J. ; CHAN,E.C.S.; KRIEG,N.R.; EDWARDS, D.D.; PELCZAR, M.F. – **Microbiologia: Conceitos e Aplicações**. Makron Books, Pearson Education do Brasil, 1997. 485p.

PIERRE, J.F. - Suivi algologique de la reserve d’approvisionnement en eau de Richardménil (Lorraine, France). **Bulletin de l’Académie Lorraine des Sciences** 40: 1-2p., 2001.

PRIMACK, R.B. ; RODRIGUES, E. – **Biologia da Conservação**. Editora Midiograf, Londrina, Paraná, 2001, 328p.

RAI, P.K.; RAI, L.C. - Interactive effects of UV-B and Cu on photosynthesis, uptake and metabolism of nutrients in a green alga *Chlorella vulgaris* under simulated ozone column. **J. Gen. Appl. Microbiol.** 43: 281-288p., 1997.

RAND, G. M. – **Fundamentals of aquatic toxicology: effects, environmental fate and risk assessment.** 2 ed. Washington, D.C.: Taylor and Francis, 1995.

REDDY, K.J.; SOPER, B.W.; TANG, J.; BRADLEY, R.L. - Phenotypic variation in exopolysaccharide production in the marine, aerobic nitrogen-fixing unicellular cyanobacterium. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, Oxford, v.12, p. 311-318, 1996.

REZENDE, C.E.; LACERDA, L.D. – Metais pesados em mexilhões *Perna perna* no litoral do Estado do Rio de Janeiro. **Rev. Brasil Biologia**, 1986, 46: 239-247p.

RICHARDS, S.M.; KENDALL, R.J. - Biochemical effects of chlorpyrifos on two developmental stages of *Xenopus laevis*. **Environ Toxicol Chem.** 21: 1826-1835p., 2002.

RICKLEFS, R.E. – **A Economia da Natureza.** Editora Guanabara Koogan, 3 ed., Rio de Janeiro, RJ, 1996, 470p.

RIVOAL, J.; TURPIN, D.H.; PLAXTON, W.C. - *In vitro* phosphorylation of phosphoenolpyruvate carboxylase from the green algae *Selenastrum minutum*.

Plant Cell Physiol. 43: 785-792p., 2002.

ROCHA, O.; GUNTZEL, A. – Crustáceos branquiópodos. JOLY, C.A.; BICUDO, C.E.M. org. In: **Biodiversidade do Estado de São Paulo, Brasil: síntese do conhecimento ao final do século XX.** 4: Invertebrados de água doce. FAPESP, São Paulo, 1999, 109-120p.

ROST, T.L. - **Botany: a brief introduction to plant biology.** J. Wiley, New York, 1984, 302 p.

ROUND, F.E. – The epipsammon, a relatively unknown freshwater algal association. **European Journal of Phycology**, v.2 (6), p.456-462, 1965.

SANT'ANNA, C.L.; AZEVEDO, M.T.P. – Contribution to the knowledge of potentially toxic cyanobacteria from Brazil. **Nova Hedwigia**, 2000, 71(3-4): 359-385p.

SANT'ANNA, C.L.; AZEVEDO, M.T.P.; AGUJARO, L.F.; CARVALHO, M.C.; CARVALHO, L.R.; SOUZA, R.C.R. - **Manual Ilustrado para Identificação de Cianobactérias Planctônicas de Águas Continentais Brasileiras.** Editora Interciência, Rio de Janeiro, 2006, 58p.

SAUGESTAD, A. – Foto – Disponível em www.milijolare.no/data/ut/bildearkiv/index.php. Acesso em 22/12/2005.

SIGG,L., STURM, M.& KISTLER, D. - Vertical transport of heavy metal by settling particles. **Limnol. Oceanogr.**, v.32, n.1, p.112-130,1987.

SHIN, K. H.; HAMA, T. HANDA, N. Effect of nutrient conditions on the composition of photosynthetic products in the East China Sea and surrounding waters. **Deep-Sea Research II**, v.50, p. 389-401, 2003.

SILVA, C.S. – Cromo. In: AZEVEDO, F.A ; CHASIN, A A M. – **Metais: Gerenciamento da Toxicidade**. Editora Atheneu, São Paulo, 2003, Cap. 2, 35-66p.

SINGH, N.; ASTHANA, R.K.; KAYASTHA, A.M.; PANDEY, S.; CHAUDHARY, A.K; SINGH, S.P. – Thiol and exopolysaccharide production in a cyanobacterium under heavy metal stress. **Process Biochemistry**, London, v.35, p. 41-46, 1998.

SINGH, S.P.; TACK, F.M.G.; GABRIELS, D.; VERLOO, M.G. - Heavy metal transport from dredged sediment derived surface soils in a laboratory rainfall simulation experiment. **Water Air Soil Poll.** 118: 73-86p., 2000.

SIVONEN, K. – Cyanobacterial toxins and toxin production. **Phycologia**, 35 (6 supplement),1996, 12-24p.

SKEI, J.; LARSSON, P.; ROSENBERG, R.; JONSSON, P.; OLSSON, M.; BROMAN, D. – Eutrophication and contaminants in aquatic ecosystems. **AMBIO, A Journal of the Human Environment**, V.29, n°4-5, August 2000, 184-194p.

SKULBERG, O.M.; CARMICHAEL, W.W.; CODD,G.A.; SKULBERG, R. – **Taxonomy of Toxic Cyanophyceae (Cyanobacteria). Algal Toxins in Seafood and Drinking Water**. Chapter 9, Academic Press Ltda, 1993.

SOARES, F. S. **Estudo dos carboidratos dissolvidos livres e combinados na Represa do broa(SP) e sua relação com a comunidade fitoplanctônica**. 1992. 127p. Tese – Doutorado (PPGERN/UFSCar) São Carlos, 1992.

SOUZA, R.C.R. – Cianobactérias. In: SANT'ANNA, C.L.; AZEVEDO, M.T.P.; AGUJARO, L.F.; CARVALHO, M.C.; CARVALHO, L.R.; SOUZA, R.C.R. - **Manual Ilustrado para Identificação de Cianobactérias Planctônicas de Águas Continentais Brasileiras**. Editora Interciência, Rio de Janeiro, 2006, 01-04p.

SURESH, P.G.; REJU, M.K.; MOHANDAS, A. - Haemolymph phosphatase activity levels in two fresh-water gastropods exposed to copper. **Sci. Total Environ.** Suppl. 2: 1265-1277p., 1993.

STUTZMAN, P. - Food quality of gelatinous colonial chlorophytes to the freshwater zooplankters *Daphnia pulex* and *Diaptomus oregonensis*. **Freshwater Biology**, v.34, p.149-153, 1995.

SZEFER, P.; ROBICKI, J.; FRELEK, K.; SKÓRA, K.; MALINGA, M. – Bioaccumulation of selected trace elements in lung nemaodes, *Pseudalius inflexus*, of harbor porpoise (*Phocoena phocoena*) in polish zone of Baltic sea. **Sci. Total Environ.**, n.220,1998, 19-24p.

TAVARES, L.H.S.; ROCHA, O. – **Produção de plâncton (fitoplâncton e zooplâncton) para alimentação de organismos aquáticos.** Editora Rima, São Carlos, SP, 2003, 106p.

TAYLOR, G.E. JR.; SCHALLER, K.B.; GEDDES, J.D.; GUSTIN, M.S. - Microbial ecology, toxicology and chemical fate of methyl isothiocyanate in riparian soils from the Upper Sacramento River. **Environ. Toxicol. Chem.** 15: 1694-1701p., 1996.

TEISSEIRE, H.; COUDERCHET, M.; VERNET, G. - Toxic responses and catalase activity of *Lemna minor* L. exposed to folpet, copper, and their combination. **Ecotoxicol. Environ. Saf.** 40: 194-200p., 1998.

THEODOROU, M.E.; ELRIFI, I.R.; TURPIN, D.H.; PLAXTON, W.C. - Effect of phosphorus limitation on respiratory metabolism in the green algae *Selenastrum minutum*. **Plant Physiol.** 95: 1089-1095p., 1991.

THURMAN, E.M. Organic geochemistry of natural waters. **Dordrecht, Nijhoff/Junk Po.**, p.497, 1985.

TIEN, C. J.; KRIVTSOV, V.; LEVADO, E.; SIGEE, D. C.; WHITE, K. N. - Occurrence of cell-associated mucilage and soluble extracellular polysaccharides in Rostherne Mere and their possible significance. **Hydrobiologia**, 485 (1-3): p.245-252, 2002.

TRUHAUT, R. – Introduction . In: BUTLER,G.C. – **Principles of toxicology**. Scientific Committee Problems of the Environmental (SCOPE) of the International Council of Scientific Unions. SCOPE Report 12. John Wiley & Sons,1978, 350p.

TUNDISI, J.G. – **Diretrizes para o gerenciamento de lagos**. V. 1, São Carlos, SP, 2000, 176p.

TUNDISI, J.G.; TUNDISI, T.M. – Eutrophication of lakes and reservoirs: a comparative analysis, case studies, perspectives. In: CORDEIRO-MARINO, M. et al, editors. **Algae and Environment – A general approach**. Sociedade Brasileira de Ficologia, 1992, 1-33p.

TUNDISI, J.G. - **Planejamento e gerenciamento de lagos e reservatórios: Uma abordagem integrada ao problema da eutrofização**. UNEP-PNUMA, IETC, Série de Publicações Técnicas (11P), Osaka, Shiga, 2001, 385p.

TUNDISI, J.G. – **Planejamento e gerenciamento de lagos e reservatórios: Uma abordagem integrada ao problema da eutrofização**. UNEP-PNUMA, IETC, Série de Publicações Técnicas, São Carlos, SP, 1992, 275p.

TUNDISI, J.G.; ROCHA, T.; MATSUMURA-TUNDISI, T.; BRAGA, B. – Reservoir management in South America. **Water Resources Development**, 1998, 14 (2): 141-155p.

U.S.E.P.A. - **96-hour static toxicity test using *Selenastrum capricornutum*** . Environmental Protection Agency SOP#: 2027. 5p, 1994.

VAN DEN HOEK, C.; MANN, D.G.; JAHNS, H.M. - Cyanophyta. In: Van den Hoek,C.; Mann, D,G; Jahns, H.M, editors - **Algae: an introduction to phycology**. Cambridge University Press, 1997, 16-34 p.

VIDOTTI, E.C.; ROLLEMBERG, M.C.E. - Algas: da economia nos ambientes aquáticos à bioremediação e à química analítica. **Química Nova** 27: 139-145p., 2004.

VIEIRA, A.A.H. – ***Anabaena spiroides***. Arquivo pessoal, novembro/2005.

VIEIRA, A.A.H. – ***Pseudokirchneriella subcapitata***. Arquivo pessoal, outubro/2005.

VIEIRA, A.A.H.; MYKLESTAD, S. Production of extracellular carbohydrates from *Ankistrodesmus densus*. **Journal Plankton Research**, v.8, n.5, p.985-994, 1986.

VIEIRA, A.A.H.; NASCIMENTO, O.R.; SARTORI, A.L. – Release of extracellular polysaccharide by *Spondylosium panduriforme* (Desmidiaceae). **Revista de Microbiologia**, 25(1): 6-10p, 1994.

VIEIRA, A.A.H.; NASCIMENTO, O.R. An EPR determination of copper complexation by excreted high molecular weight compounds of *Ankistrodesmus densus* (Chlorophyta). **Journal of plankton research**, v. 10, p.1313-1315, 1988.

VON SPERLING, M. - **Introdução a qualidade das águas e ao tratamento de esgoto**. DESA – UFMG, Belo Horizonte, 1996.

WARD, T.J.; RAUSINA, G.A; STONEBRAKER, P.M.; ROBINSON, W.E. – Apparent toxicity resulting from the sequestering of nutrient trace metals during standard *Selenastrum capricornutum* toxicity tests. **Aquatic Toxicology** 60, 2002, 01-16p.

WHO - World Health Organization - **Cadmium**. International Programme on Chemical Safety. Environmental Health Criteria, 134. Geneva, 1992.

WHO - World Health Organization - **Copper**. International Programme on Chemical Safety. Environmental Health Criteria, 200. Geneva, 1998.

WHO - World Health Organization - **Chromium**. International Programme on Chemical Safety. Environmental Health Criteria, 61. Geneva, 1988.

WOOD, A.M.; VAN ALEN, L.M. Paradox lost? On the release of energy compounds by phytoplankton. **Mar. Microb. Food Webs**, v.4, p. 103-116, 1990.

ZAGATTO, P.A.; ARAGÃO, M.A.; CARVALHO, M.C.; SOUZA, R.C.R. - **Manual de orientação em casos de florações de algas tóxicas: um problema ambiental e de saúde pública**. CETESB – Companhia de Tecnologia e Saneamento Ambiental – Séries Manuais (14), ,1997, 20p.

ZAGATTO, P.A.; ARAGÃO, M.A. – **Avaliação ecotoxicológica do Reservatório do Guarapiranga, SP, com ênfase ao problema de algas tóxicas e algicidas**. CETESB – Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental, Projeto de Recuperação da bacia do Guarapiranga, São Paulo,1995, 116p.

ANEXOS

ANEXO A - CULTIVO DE *Pseudokirchneriella subcapitata* (*Selenastrum capricornutum*)

MEIO W.C.

Tabela A 01 – Soluções para preparo da água de cultivo e de diluição

Solução	Reagente	Quantidade mg	Preparo
1	CaCl ₂ .2H ₂ O	73 500	Dissolver e diluir a 1 000 mL com água processada
2	MgSO ₄ .7H ₂ O	123 300	Dissolver e diluir a 1 000 mL com água processada
3	NaHCO ₃	64 800	Dissolver e diluir a 1 000 mL com água processada
4	MnCl ₂ .4H ₂ O	7 210	Dissolver e diluir a 1 000 mL com água processada
	LiCl	6 120	
	RbCl	1 420	
	SrCl ₂ .6H ₂ O	3 040	
	CuCl ₂ .2H ₂ O ¹⁾	335	
	ZnCl ₂ ¹⁾	260	
	CoCl ₂ .6H ₂ O ¹⁾	200	
5	NaNO ₃	548	Dissolver e diluir a 1 000 mL com água processada
	H ₃ BO ₃	5 719	
	NaBr	32	
	Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	126	
	NH ₄ VO ₃	1,15	
	KI	6,5	
	NaSe ₂ O ₃	4,38	
6	Na ₂ SiO ₃	21 465	Dissolver e diluir a 1 000 mL com água processada, deixando em agitação até o clareamento da solução.
7	KH ₂ PO ₄	286 mg	Dissolver e diluir a 1 000 mL com água processada
	K ₂ HPO ₄	368 mg	

8	Hidrocloreto de Tiamina	750 mg	Dissolver e diluir a 1 000 mL com água processada. Congelar em volume adequado para uso.
	Cianocobalamina (Vitamina B12)	10 mg	
	D (+) Biotina	7,5 mg	
¹⁾ Pesar em vidro ou filme plástico. Não usar papel alumínio.			

As soluções da tabela A.01 devem ser estocadas de 4°C a 10°C, no máximo, por três meses.

Tabela A 02 – Volume das soluções para preparo de 1 L do meio de cultura

Solução	1	2	3	4	5	6	7	8
Volume (mL. L ⁻¹)	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0

Ajustar o pH desse meio com HCl ou NaOH para 7,1 ($\pm 0,1$). Autoclavar a 121°C. por 40 min. Deixar esfriar antes da utilização.

MEIO L.C. OLIGO

Tabela A 03– Soluções para preparo do meio de cultura

Solução	Reagente	Quantidade mg	Preparo
1	Ca(NO ₃) ₂ .4H ₂ O	4 000	Dissolver e diluir a 100 mL com água processada
2	KNO ₃	10 000	Dissolver e diluir a 100 mL com água processada
3	MgSO ₄ .7H ₂ O	3 000	Dissolver e diluir a 100 mL com água processada
4	K ₂ HPO ₄	4 000	Dissolver e diluir a 100 mL com água processada
5	CuSO ₄ .5H ₂ O	30	Dissolver e diluir a 1 000 mL com água processada
	(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ .4H ₂ O	60	
	ZnSO ₄ .7H ₂ O	60	
	CoCl ₂ .6H ₂ O	60	
	Mn(NO ₃) ₂ .4H ₂ O	60	
	C ₆ H ₈ O ₂ .H ₂ O	60	
	H ₃ BO ₃	60	
6	C ₆ H ₅ FeO ₇ .5H ₂ O	1 625	Dissolver e diluir a 1 000 mL com água processada
	FeCl ₃ .6H ₂ O	6 250	
	FeSO ₄ .7H ₂ O	6 250	
7	NaHCO ₃	15 000	Dissolver e diluir a 1 000 mL com água processada

As soluções da tabela A.03 devem ser estocadas de 4°C a 10°C, no máximo, por três meses.

Tabela A 04 – Volume das soluções para preparo de 1 L do meio de cultura

Solução	1	2	3	4	5	6	7
Volume (mL. L ⁻¹)	1,0	1,0	1,0	1,0	0,5	0,5	1,0

Ajustar o pH desse meio com HCl ou NaOH para 7,1 ($\pm 0,1$). Autoclavar a 121°C. por 40 min. Deixar esfriar antes da utilização.

Anexo B - CULTIVO DE *Anabaena spiroides*

Meio ASM1 – TRIS

Tabela B 01– Soluções para preparo do meio de cultura

Solução Estoque	Reagentes	g x 100mL ⁻¹ Água Destilada.	Volume da Solução Estoque em mL x L ⁻¹ (meio de cultura)
A	NaNO ₃	0,850	20mL
	MgSO ₄ . 7H ₂ O	0,245	
	MgCl ₂ . 6H ₂ O	0,205	
	CaCl ₂ . 2H ₂ O	0,145	
B	KH ₂ PO ₄	0,870	02mL
	Na ₂ HPO ₄ . 2H ₂ O	1,780	
C	H ₃ BO ₃	2,480	0,1mL
	MnCl ₂ . 4H ₂ O	1,390	
	FeCl ₃ . 6H ₂ O	1,080	
	ZnCl ₂	0,335	
	CoCl ₂ . 6H ₂ O	0,019	
	CuCl ₂ . 2H ₂ O	0,0014	
D	Na ₂ EDTA	1,86	0,4mL

As soluções da tabela B.01 devem ser estocadas de 4°C a 10°C, no máximo, por três meses.

Tabela B 02 – Volume das soluções para preparo de 1 L do meio de cultura

Solução	A	B	C	D
Volume (mL. L ⁻¹)	20	2	0,1	0,4

Adicionar ao meio ASM1: 0,5g. L⁻¹ de reagente **Tris(Hidroximetil)aminomethano**
– TRIS.

Ajustar o pH desse meio com HCl ou NaOH para 7,0 (± 0,1). Autoclavar a 121°C. por 40 min. Deixar esfriar antes da utilização.

Anexo C – Planilhas dos Ensaio Ecotoxicológicos com Cádmi

Ensaio Ecotoxicológicos - Cádmio

Teste nº 01 - 01 - A

Água de cultivo e/ou Água de diluição					Amostra		Responsável
Lote	pH	Cond	OD	Dureza	Solução de Cloreto de Cádmio		Ádria
Mineral – 06/10/06	7,60	126,3	4,40	45			

Data- 12/10/06	concentração mg.L ⁻¹	Organismos Imóveis																		Variáveis Finais			
		Ensaio 1			Ensaio 2			Ensaio 3			Ensaio 4			pH	Cond µS.cm	OD mg.L ⁻¹	Dureza mg.L ⁻¹						
		1	2	3	T	1	2	3	T	1	2	3	T					1	2	3	T		
Controle	0,01	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	7,82	150,9	4,60	48
	0,10	0	1	1	2	0	0	2	2	0	1	1	2	0	1	2	0	2	0	7,86	159,3	4,60	54
	0,30	4	3	4	11	3	5	5	13	5	4	5	14	5	5	4	14	5	4	7,90	163,8	4,59	54
	0,45	5	5	5	15	5	5	5	15	5	5	5	15	5	5	5	15	5	5	7,92	174,9	4,56	55
	0,60	5	5	5	15	5	5	5	15	5	5	5	15	5	5	5	15	5	5	7,95	175,9	4,45	60
	0,80	5	5	5	15	5	5	5	15	5	5	5	15	5	5	5	15	5	5	8,02	177,1	4,21	64
	1,40	5	5	5	15	5	5	5	15	5	5	5	15	5	5	5	15	5	5	8,04	183,4	4,18	65
		5	5	5	15	5	5	5	15	5	5	5	15	5	5	5	15	5	5	8,08	206,4	4,12	66
Resultados EC ₅₀ 48h.		0,1687256			0,1526277			0,1519667			0,1451642			Método Estatístico utilizado - Trimmed Spearman Karber (JSPEAR)									

Ensaio Ecotoxicológicos - Cádmio + Concentrado de algas

Teste nº 01 - 02 - A

Água de cultivo e/ou Água de diluição				Amostra		Responsável
Lote	pH	Cond	OD	Dureza		Ádria
Mineral -03/01/07	7,84	142,0	4,30	41		
				<i>P. subcapitata</i> - Alimento + Meio sem EDTA		

Data- 16/01/07	Organismos Imóveis																Variáveis Finais							
	Ensaio 1				Ensaio 2				Ensaio 3				Ensaio 4				pH	Cond $\mu\text{S.cm}^{-1}$	OD mg.L^{-1}	Dureza mg.L^{-1}				
	1	2	3	T	1	2	3	T	1	2	3	T	1	2	3	T								
concentração mg.L^{-1}	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	7,80	180,4	4,40	47
Controle	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	7,84	194,1	4,42	49
0,01	1	2	0	3	1	1	1	3	0	1	1	2	1	0	1	2	1	0	1	2	7,87	196,3	4,40	49
0,30	3	4	4	11	4	4	4	12	5	3	4	12	4	5	4	13	4	5	4	13	7,90	199,8	4,36	50
0,45	5	5	4	14	5	5	5	15	5	4	4	13	5	5	5	15	5	5	5	15	7,91	200,3	4,23	51
0,60	5	5	5	15	5	5	5	15	5	5	5	15	5	5	5	15	5	5	5	15	7,94	202,7	4,18	53
0,80	5	5	5	15	5	5	5	15	5	5	5	15	5	5	5	15	5	5	5	15	8,00	202,9	4,07	56
1,40	5	5	5	15	5	5	5	15	5	5	5	15	5	5	5	15	5	5	5	15	8,04	204,2	4,02	59
Resultados EC_{50} 48h.	0,1541622				0,1481385				0,1742492				0,1526277				Método Estatístico utilizado - Trimmed Spearman Karber (JSPEAR)							

Ensaio Ecotoxicológicos - Cádmio + Concentrado de algas

Teste nº 01 - 03 - A

Água de cultivo e/ou Água de diluição					Amostra		Responsável
Lote	pH	Cond	OD	Dureza	<i>P. subcapitata</i> - Alimento + Meio com EDTA		Ádria
Mineral – 06/10/06	7,60	126,3	4,40	45			

Data- 12/10/06	Concentração mg.L ⁻¹	Organismos Imóveis																		Variáveis Finais								
		Ensaio 1			Ensaio 2			Ensaio 3			Ensaio 4			pH	Cond µS.cm ⁻¹	OD mg.L ⁻¹	Dureza mg.L ⁻¹											
		1	2	3	T	1	2	3	T	1	2	3	T					1	2	3	T							
Controle	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	7,82	180,5	4,45	48				
0,01	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	7,86	183,5	4,46	50				
0,10	0	0	2	2	0	0	2	2	1	1	0	2	0	1	0	1	0	1	0	1	7,88	189,4	4,44	52				
0,30	5	4	4	13	5	5	4	14	5	4	4	13	5	5	5	15	5	5	5	15	7,90	192,5	4,30	52				
0,45	5	5	5	15	5	5	5	15	5	5	5	15	5	5	5	15	5	5	5	15	7,97	202,1	4,28	53				
0,60	5	5	5	15	5	5	5	15	5	5	5	15	5	5	5	15	5	5	5	15	7,99	204,9	4,16	56				
0,80	5	5	5	15	5	5	5	15	5	5	5	15	5	5	5	15	5	5	5	15	8,04	209,3	4,04	59				
1,40	5	5	5	15	5	5	5	15	5	5	5	15	5	5	5	15	5	5	5	15	8,07	211	4,00	61				
Resultados EC ₅₀ 48h.	0,1526277	0,1519667																		0,1597664				0,1546405				Método Estatístico utilizado - Trimmed Spearman Karber (JSPEAR)

Ensaio Ecotoxicológicos - Cádmio + Concentrado de Alga

Teste nº 01 - 04 - A

Água de cultivo e/ou Água de diluição					Amostra		Responsável
Lote	pH	Cond	OD	Dureza	A. spiroides - Alimento + Meio com EDTA		Ádria
Mineral - 04/12/06	7,33	144,6	4,49	43			

Data- 12/12/06	Concentração mg.L ⁻¹	Organismos Imóveis																Variáveis Finais				
		Ensaio 1			Ensaio 2			Ensaio 3			Ensaio 4			pH	Cond µS.cm ⁻¹	OD mg.L ⁻¹	Dureza mg.L ⁻¹					
		1	2	3	T	1	2	3	T	1	2	3	T					1	2	3	T	
	Controle	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	7,85	173,9	4,50	48
	0,01	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	7,88	174,5	4,51	51
	0,10	0	1	1	2	1	1	1	3	1	2	0	3	0	1	1	2	2	7,90	176,2	4,48	52
	0,30	2	2	2	6	2	2	2	6	2	1	2	5	2	2	3	7	7	7,91	178,4	4,46	54
	0,45	5	4	5	14	5	5	4	14	5	4	5	14	4	5	5	14	7,94	180,3	4,39	55	
	0,60	5	5	5	15	5	5	5	15	5	5	5	15	5	5	5	15	7,96	186,6	4,24	56	
	0,80	5	5	5	15	5	5	5	15	5	5	5	15	5	5	5	15	8,03	192,9	4,13	59	
	1,40	5	5	5	15	5	5	5	15	5	5	5	15	5	5	5	15	8,08	197,5	4,01	62	
Resultados EC ₅₀ 48h.		0,2218625			0,1980827			0,224413			0,2278312			Método Estatístico utilizado - Trimmed Spearman Karber (JSPEAR)								

Ensaio Ecotoxicológicos - Cádmio + Meio WC com EDTA

Teste nº 01 - 05 - A

Água de cultivo e/ou Água de diluição					Amostra		Responsável	
Lote	pH	Cond	OD	Dureza	Branco		Ádria	
Mineral – 06/11/06	7,59	125,8	4,35	45				

Data- 09/11/06	Concentração mg.L ⁻¹	Organismos Imóveis																		Variáveis Finais			
		Ensaio 1			Ensaio 2			Ensaio 3			Ensaio 4			pH	Cond µS.cm ⁻¹	OD mg.L ⁻¹	Dureza mg.L ⁻¹						
		1	2	3	T	1	2	3	T	1	2	3	T					1	2	3	T		
Controle	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	7,86	172,9	4,45	48
0,01	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	7,89	174,3	4,43	51
0,10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	7,91	175,8	4,40	52
0,30	2	0	2	4	2	1	1	4	1	1	1	3	2	1	1	4	10	4	4	7,94	176,4	4,36	54
0,45	4	4	4	12	3	4	4	14	3	4	3	10	3	3	4	10	3	4	10	7,95	178,4	4,35	55
0,60	5	5	5	15	5	5	5	15	5	5	5	15	5	5	5	15	5	5	15	8,01	180,2	4,20	55
0,80	5	5	5	15	5	5	5	15	5	5	5	15	5	5	5	15	5	5	15	8,06	186,6	4,09	59
1,40	5	5	5	15	5	5	5	15	5	5	5	15	5	5	5	15	5	5	15	8,09	193,5	4,00	63
Resultados EC ₅₀ 48h.		0,3222366			0,3297685				0,3548275				0,3374765							Método Estatístico utilizado - Trimmed Spearman Karber (JSPEAR)			

Ensaios Ecotoxicológicos - Cádmio + meio WC com EDTA +
Excretado total

Teste nº 01 - 07 - A

Água de cultivo e/ou Água de diluição				Amostra		Responsável
Lote	pH	Cond	OD	Exopolissacarídeo		Ádria
Mineral – 06/10/06	7,60	126,3	4,40	<i>P. subcapitata</i>		
			Dureza			
			45			

Data- 12/10/06	Organismos Imóveis												Variáveis Finais							
	Ensaio 1			Ensaio 2			Ensaio 3			Ensaio 4			pH	Cond $\mu\text{S.cm}^{-1}$	OD mg.L^{-1}	Dureza mg.L^{-1}				
	1	2	3	T	1	2	3	T	1	2	3	T					1	2	3	T
Concentração mg.L^{-1}	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	7,83	192,3	4,34	48
Controle	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	0	0	1	1	7,86	207,4	4,21	56
0,01	1	0	1	2	0	1	1	2	0	1	0	2	0	1	1	2	7,95	208,3	4,10	58
0,10	1	0	2	3	1	2	0	3	0	1	1	2	0	1	1	2	7,96	214,4	3,86	63
0,30	1	1	2	4	1	1	1	3	0	1	2	3	1	0	1	2	7,99	217,0	3,82	64
0,45	2	1	2	5	1	2	1	4	2	1	2	5	2	2	2	6	8,02	218,5	3,78	66
0,60	5	5	5	15	5	5	5	15	5	5	5	15	5	5	5	15	8,04	220,3	3,78	68
0,80	5	5	5	15	5	5	5	15	5	5	5	15	5	5	5	15	8,07	224,1	3,75	69
1,40																				
Resultados EC_{50} 48h.	0,4529596				0,4755591				0,4929025				0,4952014			Método Estatístico utilizado - Trimmed Spearman Karber (JSPEAR)				

Ensaio Ecotoxicológicos - Cádmio + meio WC com EDTA +
Fração < 10KD

Teste nº 01 - 08 - A

Água de cultivo e/ou Água de diluição				Amostra		Responsável
Lote	pH	Cond	OD	Exopolissacarídeo		Ádria
Mineral – 06/10/06	7,60	126,3	4,40	<i>P. subcapitata</i>		
			Dureza			
			45			

Data- 12/10/06	Concentração mg.L ⁻¹	Organismos Imóveis																		Variáveis Finais			
		Ensaio 1			Ensaio 2			Ensaio 3			Ensaio 4			pH	Cond µS.cm ⁻¹	OD mg.L ⁻¹	Dureza mg.L ⁻¹						
		1	2	3	T	1	2	3	T	1	2	3	T					1	2	3	T		
	Controle	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	7,87	194,2	4,32	48	
	0,01	0	1	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0	1	0	0	1	0	7,89	202,6	4,19	57	
	0,10	0	0	1	1	0	0	1	1	0	1	1	0	1	1	1	2	1	7,95	202,9	4,10	58	
	0,30	2	0	0	2	0	0	1	1	0	1	1	2	0	2	0	2	2	7,96	205,3	3,92	59	
	0,45	2	2	0	4	0	1	1	2	0	1	2	3	0	0	2	2	2	7,99	209,4	3,84	63	
	0,60	5	5	5	15	5	5	5	15	5	5	5	15	5	5	5	15	5	8,01	210,8	3,71	63	
	0,80	5	5	5	15	5	5	5	15	5	5	5	15	5	5	5	15	5	8,02	211,5	3,70	64	
	1,40	5	5	5	15	5	5	5	15	5	5	5	15	5	5	5	15	5	8,04	213,2	3,68	65	
	Resultados EC ₅₀ 48h.	0,4481832			0,4213103			0,4602537			0,4146982			Método Estatístico utilizado - Trimmed Spearman Karber (JSPEAR)									

Ensaio Ecotoxicológicos - Cádmio + meio WC com EDTA +
Fração > 10KD

Teste nº 01 - 09 - A

Água de cultivo e/ou Água de diluição				Amostra		Responsável
Lote	pH	Cond	OD	Exopolissacarídeo		Ádria
Mineral – 06/10/06	7,60	126,3	4,40	<i>P. subcapitata</i>		
			Dureza			
			45			

Data- 12/10/06	concentração mg.L ⁻¹	Organismos Imóveis																		Variáveis Finais			
		Ensaio 1			Ensaio 2			Ensaio 3			Ensaio 4			pH	Cond µS.cm ⁻¹	OD mg.L ⁻¹	Dureza mg.L ⁻¹						
		1	2	3	T	1	2	3	T	1	2	3	T					1	2	3	T		
	Controle	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	7,84	180,6	4,34	48	
	0,01	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	7,87	184,5	4,32	52	
	0,10	1	0	1	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	7,95	186,0	4,25	53	
	0,30	1	1	1	3	1	1	0	2	1	2	0	3	1	1	1	3	3	7,97	191,0	4,25	55	
	0,45	3	2	3	8	3	4	3	10	3	3	3	9	4	4	4	12	7,98	198,3	4,18	58		
	0,60	5	5	5	15	5	5	5	15	5	5	5	15	5	5	5	15	8,01	207,5	4,13	59		
	0,80	5	5	5	15	5	5	5	15	5	5	5	15	5	5	5	15	8,02	209,1	4,05	61		
	1,40	5	5	5	15	5	5	5	15	5	5	5	15	5	5	5	15	8,05	213,2	3,94	64		
	Resultados EC ₅₀ 48h.	0,3337774			0,3730706			0,3631212			0,3388041			Método Estatístico utilizado - Trimmed Spearman Karber (JSPEAR)									

Ensaio Ecotoxicológicos - Cádmio + meio WC sem EDTA +
Fração < 10KD

Teste nº 01 - 11 - A

Água de cultivo e/ou Água de diluição				Amostra		Responsável
Lote	pH	Cond	OD	Exopolissacarídeo		Ádria
Mineral – 03/01/07	7,84	142,0	41	<i>P. subcapitata</i>		
			Dureza			
			41			

Data- 16/01/07	Concentração mg.L ⁻¹	Organismos Imóveis																		Variáveis Finais			
		Ensaio 1			Ensaio 2			Ensaio 3			Ensaio 4			pH	Cond µS.cm ⁻¹	OD mg.L ⁻¹	Dureza mg.L ⁻¹						
		1	2	3	T	1	2	3	T	1	2	3	T					1	2	3	T		
	Controle	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	7,86	186,5	4,36	48	
	0,01	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	7,88	190,3	4,20	52	
	0,10	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	7,89	198,2	4,20	52	
	0,30	2	3	2	7	2	4	2	8	3	3	3	9	3	3	2	8	7,93	200,3	4,14	53		
	0,45	5	4	5	14	5	4	5	14	5	5	5	15	5	5	5	15	7,97	201,8	4,12	54		
	0,60	5	5	5	15	5	5	5	15	5	5	5	15	5	5	5	15	8,01	204,2	4,03	57		
	0,80	5	5	5	15	5	5	5	15	5	5	5	15	5	5	5	15	8,04	206,7	3,97	59		
	1,40	5	5	5	15	5	5	5	15	5	5	5	15	5	5	5	15	8,07	209,3	9,95	61		
	Resultados EC ₅₀ 48h.	0,2647189			0,2247884			0,2339931			0,246037			Método Estatístico utilizado - Trimmed Spearman Karber (JSPEAR)									

Ensaio Ecotoxicológicos - Cádmio + meio WC sem EDTA +
Fração > 10KD

Teste nº 01 - 12 - A

Água de cultivo e/ou Água de diluição				Amostra		Responsável
Lote	pH	Cond	OD	Exopolissacarídeo		Ádria
Mineral – 03/01/07	7,84	142,0	41	<i>P. subcapitata</i>		
			Dureza			
			41			

Data- 16/01/07	Concentração mg.L ⁻¹	Organismos Imóveis																		Variáveis Finais			
		Ensaio 1			Ensaio 2			Ensaio 3			Ensaio 4			pH	Cond µS.cm ⁻¹	OD mg.L ⁻¹	Dureza mg.L ⁻¹						
		1	2	3	T	1	2	3	T	1	2	3	T					1	2	3	T		
	Controle	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	7,85	190,6	4,34	48	
	0,01	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	7,86	195,1	4,20	49	
	0,10	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	7,87	196,4	4,18	50	
	0,30	3	3	4	10	3	3	3	9	2	4	4	10	3	4	3	10	7,90	198,3	4,16	53		
	0,45	5	5	5	15	5	5	5	15	5	5	4	14	5	5	5	15	7,93	198,8	4,10	53		
	0,60	5	5	5	15	5	5	5	15	5	5	5	15	5	5	5	15	7,99	201,5	4,06	55		
	0,80	5	5	5	15	5	5	5	15	5	5	5	15	5	5	5	15	8,00	203,6	4,01	58		
	1,40	5	5	5	15	5	5	5	15	5	5	5	15	5	5	5	15	8,05	206,4	3,98	59		
	Resultados EC ₅₀ 48h.	0,2225509			0,2089131			0,2277528			0,2225509			Método Estatístico utilizado - Trimmed Spearman Kerber (JSPEAR)									

Ensaio Ecotoxicológicos - Cádmio + meio ASM-1 com TRIS com EDTA

Teste nº 02 - 01 - A

Água de cultivo e/ou Água de diluição						Amostra	Responsável
Lote	pH	Cond	OD	Dureza		Branco	Ádria
Mineral – 01/11/06	7,59	125,8	4,35	45			

Data- 09/11/06	Concentração mg.L ⁻¹	Organismos Imóveis																Variáveis Finais			
		Ensaio 1				Ensaio 2				Ensaio 3				Ensaio 4				pH	Cond µS.cm ⁻¹	OD mg.L ⁻¹	Dureza mg.L ⁻¹
		1	2	3	T	1	2	3	T	1	2	3	T	1	2	3	T				
Controle		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	7,87	190,3	4,45	48
0,01		1	0	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0	0	1	0	1	7,90	187,4	4,42	50
0,10		1	1	0	2	1	1	0	2	1	1	0	2	2	0	0	2	7,97	192,3	4,40	52
0,30		2	1	0	3	1	0	1	2	1	1	1	3	2	1	0	3	7,98	207,3	4,28	53
0,45		2	0	1	3	1	2	1	4	1	1	1	3	2	1	1	4	8,03	208,4	4,15	55
0,60		2	1	1	4	2	1	1	4	2	1	1	4	1	2	1	4	8,05	208,9	4,02	58
0,80		5	5	5	15	5	5	5	15	5	5	5	15	5	5	5	15	8,08	210,2	4,00	58
1,40		5	5	5	15	5	5	5	15	5	5	5	15	5	5	5	15	8,09	212,3	3,97	60
Resultados EC ₅₀ 48h.		0,4755591				0,49062541				0,4755591				0,4630485				Método Estatístico utilizado - Trimmed Spearman Karber (JSPEAR)			

Ensaio Ecotoxicológicos - Cádmio + meio ASM-1 com TRIS sem EDTA

Teste nº 02 - 02 - A

Água de cultivo e/ou Água de diluição					Amostra		Responsável	
Lote	pH	Cond	OD	Dureza	Branco		Ádria	
Mineral – 01/11/06	7,59	125,8	4,35	45				

Data- 09/11/06	Organismos Imóveis																		Variáveis Finais			
	Ensaio 1			Ensaio 2			Ensaio 3			Ensaio 4			pH	Cond µS.cm ⁻¹	OD mg.L ⁻¹	Dureza mg.L ⁻¹						
	1	2	3	T	1	2	3	T	1	2	3	T					1	2	3	T		
Concentração mg.L ⁻¹	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0				
Controle	0	0	1	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0	1	1				
0,01	1	2	0	3	0	1	2	3	0	2	1	3	1	1	1	1	3	7				
0,10	2	2	2	6	2	2	2	6	1	3	2	6	2	3	2	3	7	7				
0,30	2	4	3	9	4	4	5	13	5	5	4	14	4	4	5	13	13	13				
0,45	4	5	5	14	5	5	5	15	5	5	5	15	5	5	5	15	15	15				
0,60	5	5	5	15	5	5	5	15	5	5	5	15	5	5	5	15	15	15				
0,80	5	5	5	15	5	5	5	15	5	5	5	15	5	5	5	15	15	15				
1,40	5	5	5	15	5	5	5	15	5	5	5	15	5	5	5	15	15	15				
Resultados EC ₅₀ 48h.	0,2419997			0,2163215			0,2117992			0,2041626			Método Estatístico utilizado - Trimmed Spearman Karber (JSPEAR)									

Ensaios Ecotoxicológicos - Cádmio + meio ASM-1 com TRIS com EDTA +
Excretado Total

Teste nº 02 - 03 - A

Água de cultivo e/ou Água de diluição				Amostra		Responsável
Lote	pH	Cond	OD	Exopolissacarídeo		Ádria
Mineral – 04/12/06	7,33	144,6	4,49	<i>Anabaena spiroides</i>		
			Dureza			
			43			

Data- 12/12/06	Concentração mg.L ⁻¹	Organismos Imóveis												Variáveis Finais							
		Ensaio 1			Ensaio 2			Ensaio 3			Ensaio 4			pH	Cond µS.cm ⁻¹	OD mg.L ⁻¹	Dureza mg.L ⁻¹				
		1	2	3	T	1	2	3	T	1	2	3	T					1	2	3	T
	Controle	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	7,74	189,4	4,32	48
	0,01	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	7,74	190,0	4,25	49
	0,10	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	7,77	195,4	4,20	50
	0,30	1	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	0	1	1	7,82	198,3	4,18	50
	0,45	1	0	0	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	1	1	2	7,90	201,4	4,09	54
	0,60	1	0	1	2	1	1	0	2	1	0	0	1	0	1	1	2	7,94	201,9	4,02	57
	0,80	2	3	1	6	2	3	3	8	3	0	4	7	2	1	4	7	7,98	203,8	4,00	60
	1,40	5	5	5	15	5	5	5	15	5	5	5	15	5	5	5	15	8,04	205,2	3,95	61
	Resultados EC ₅₀ 48h.	0,7133616			0,7551188			0,7069245			0,7590088			Método Estatístico utilizado - Trimmed Spearman Karber (JSPEAR)							

Ensaios Ecotoxicológicos - Cádmio + meio ASM-1 com TRIS com EDTA +
Fração < 10KD

Teste nº 02 - 04 - A

Água de cultivo e/ou Água de diluição				Amostra		Responsável
Lote	pH	Cond	OD	Exopolissacarídeo		Ádria
Mineral – 04/12/06	7,33	144,6	4,49	<i>Anabaena spiroides</i>		
			Dureza			
			43			

Data- 12/12/06	Concentração mg.L ⁻¹	Organismos Imóveis																		Variáveis Finais			
		Ensaio 1			Ensaio 2			Ensaio 3			Ensaio 4			pH	Cond µS.cm ⁻¹	OD mg.L ⁻¹	Dureza mg.L ⁻¹						
		1	2	3	T	1	2	3	T	1	2	3	T					1	2	3	T		
	Controle	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	7,69	182,7	4,30	48	
	0,01	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	7,70	185,4	4,20	51	
	0,10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	7,73	188,7	4,18	51	
	0,30	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0	7,80	190,1	4,17	54	
	0,45	2	1	0	3	2	0	0	2	2	1	1	4	2	0	2	4	0	7,95	193,5	4,13	55	
	0,60	2	2	3	7	3	3	2	8	4	2	3	9	3	2	2	7	0	7,96	195,6	4,10	57	
	0,80	5	5	5	15	5	5	5	15	5	4	5	14	5	5	4	14	0	7,99	198,2	4,06	59	
	1,40	5	5	5	15	5	5	5	15	5	5	5	15	5	5	5	15	0	8,02	203,3	4,00	62	
	Resultados EC ₅₀ 48h.	0,5652139			0,5396898			0,5200106			0,5403444			Método Estatístico utilizado - Trimmed Spearman Karber (JSPEAR)									

Ensaios Ecotoxicológicos - Cádmio + meio ASM-1 com TRIS com EDTA +
Fração > 10KD

Teste nº 02 - 05 - A

Água de cultivo e/ou Água de diluição				Amostra		Responsável
Lote	pH	Cond	OD	Exopolissacarídeo		Ádria
Mineral – 04/12/06	7,33	144,6	4,49	<i>Anabaena spiroides</i>		
			Dureza			
			43			

Data- 12/12/06	Concentração mg.L ⁻¹	Organismos Imóveis																		Variáveis Finais			
		Ensaio 1			Ensaio 2			Ensaio 3			Ensaio 4			pH	Cond µS.cm ⁻¹	OD mg.L ⁻¹	Dureza mg.L ⁻¹						
		1	2	3	T	1	2	3	T	1	2	3	T					1	2	3	T		
	Controle	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	7,74	183,4	4,30	48	
	0,01	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	7,76	186,9	4,22	50	
	0,10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	7,80	190,3	4,20	51	
	0,30	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	7,81	190,9	4,19	54	
	0,45	2	0	2	4	1	2	2	5	1	1	2	4	2	1	1	4	4	7,85	200,7	4,14	55	
	0,60	4	4	4	12	3	5	4	12	5	4	5	14	4	4	5	13	7,88	201,2	4,05	58		
	0,80	5	5	5	15	5	5	5	15	5	5	5	15	5	5	5	15	7,94	202,0	4,01	59		
	1,40	5	5	5	15	5	5	5	15	5	5	5	15	5	5	5	15	8,01	202,8	3,97	61		
	Resultados EC ₅₀ 48h.	0,5018019			0,4903407			0,4829184			0,4922696			Método Estatístico utilizado - Trimmed Spearman Karber (JSPEAR)									

Anexo D – Planilhas dos Ensaio Ecotoxicológicos com Cromo

Ensaio Ecotoxicológicos - Cromo

Teste nº 01 - 01 - B

Água de cultivo e/ou Água de diluição				Amostra		Responsável
Lote	pH	Cond	OD	Solução de Dicromato de Potássio		Ádria
Mineral – 06/10/06	7,60	126,3	4,40			
				Dureza	45	

Data- 14/10/06	Organismos Imóveis												Variáveis Finais						
	Ensaio 1			Ensaio 2			Ensaio 3			Ensaio 4			pH	Cond µS.cm	OD mg.L ⁻¹	Dureza mg.L ⁻¹			
	1	2	T	1	2	T	1	2	T	1	2	3					T		
Concentração mg.L ⁻¹	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	7,80	186,4	4,40	48
Controle	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	7,85	212,3	4,24	54
0,05	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	7,88	213,6	4,20	55
0,10	1	1	2	2	1	2	2	1	1	2	2	1	2	1	5	7,90	217,1	4,20	55
0,20	5	5	5	5	4	14	4	5	5	5	5	5	5	5	15	7,93	219,5	4,19	57
0,40	5	5	5	5	5	15	5	5	5	5	5	5	5	5	15	7,95	219,9	4,18	58
0,80	5	5	5	5	5	15	5	5	5	5	5	5	5	5	15	8,10	221,2	4,15	59
1,40	5	5	5	5	5	15	5	5	5	5	5	5	5	5	15				
Resultados EC ₅₀ 48h.	0,2351096			0,2351096			0,2244924			0,2231003			Método Estatístico utilizado - Trimmed Spearman Karber (JSPEAR)						

Ensaio Ecotoxicológicos - Cromo + Meio WC sem EDTA +
Concentrado de algas

Teste nº 01 - 02 - B

Água de cultivo e/ou Água de diluição				Amostra		Responsável
Lote	pH	Cond	OD	<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>		Ádria
Mineral – 03/01/07	7,84	142,0	4,30	Alimento		
			Dureza			
			41			

Data- 18/01/07	Organismos Imóveis															Variáveis Finais			
	Ensaio 1			Ensaio 2			Ensaio 3			Ensaio 4			pH	Cond $\mu\text{S.cm}^{-1}$	OD mg.L^{-1}	Dureza mg.L^{-1}			
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3					T		
Concentração mg.L^{-1}	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	46	
Controle	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	52	
0,05	1	0	0	1	0	1	1	1	0	2	0	0	1	1	1	1	1	55	
0,10	1	0	1	2	0	2	4	1	0	1	0	1	1	1	3	3	3	55	
0,20	5	4	5	14	5	5	15	5	4	14	5	4	5	5	15	5	5	57	
0,40	5	5	5	15	5	5	15	5	5	15	5	5	5	5	15	5	5	58	
0,80	5	5	5	15	5	5	15	5	5	15	5	5	5	5	15	5	5	60	
1,40	5	5	5	15	5	5	15	5	5	15	5	5	5	5	15	5	5	60	
Resultados EC ₅₀ 48h.	0,2578741			0,2352616			0,2462289			0,2351096			Método Estatístico utilizado - Trimmed Spearman Karber (JSPEAR)						

Ensaio Ecotoxicológicos - Cromo + Meio WC com EDTA +
Concentrado de algas

Teste nº 01 - 03 - B

Água de cultivo e/ou Água de diluição				Amostra		Responsável
Lote	pH	Cond	OD	<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>		Ádria
Mineral – 06/10/06	7,60	126,3	4,40	Alimento		
			Dureza			
			45			

Data- 14/10/06	Organismos Imóveis												Variáveis Finais				
	Ensaio 1			Ensaio 2			Ensaio 3			Ensaio 4			pH	Cond $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$	OD $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	Dureza $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	
	1	2	3	T	1	2	3	T	1	2	3	T					
Concentração $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Controle	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0,05	1	0	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	1	1
0,10	1	1	1	3	2	1	1	4	2	2	0	4	1	2	1	4	4
0,20	5	4	5	14	4	5	5	14	5	5	5	15	4	4	5	13	13
0,40	5	5	5	15	5	5	5	15	5	5	5	15	5	5	5	15	15
0,80	5	5	5	15	5	5	5	15	5	5	5	15	5	5	5	15	15
1,40	5	5	5	15	5	5	5	15	5	5	5	15	5	5	5	15	15
Resultados EC ₅₀ 48h.	0,2462289			0,2351096			0,2244924			0,2462289			Método Estatístico utilizado - Trimmed Spearman Karber (JSPEAR)				

Ensaio Ecotoxicológicos - Cromo + Meio ASM-1 com TRIS com EDTA +
Concentrado de algas

Teste nº 01 - 04 - B

Água de cultivo e/ou Água de diluição				Amostra		Responsável
Lote	pH	Cond	OD	Anabaena spiroides		Ádria
Mineral – 04/12/06	7,33	144,6	4,49	Alimento		
			Dureza			
			43			

Data- 14/12/06	Concentração mg.L ⁻¹	Organismos Imóveis																		Variáveis Finais			
		Ensaio 1			Ensaio 2			Ensaio 3			Ensaio 4			pH	Cond µS.cm ⁻¹	OD mg.L ⁻¹	Dureza mg.L ⁻¹						
		1	2	3	T	1	2	3	T	1	2	3	T					1	2	3	T		
	Controle	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	7,81	191,2	4,26	47	
	0,05	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	7,83	209,7	4,24	51	
	0,10	0	0	1	1	1	0	2	1	1	0	2	1	0	2	0	0	1	7,85	210,4	4,23	52	
	0,20	1	2	0	3	2	1	2	5	2	2	1	5	2	1	2	5	5	7,86	216,5	4,21	55	
	0,40	3	4	3	10	3	3	3	9	4	3	3	10	3	4	3	10	10	7,88	217,9	4,18	57	
	0,80	5	5	5	15	5	5	5	15	5	5	5	15	5	5	5	15	15	7,91	220,1	4,15	59	
	1,40	5	5	5	15	5	5	5	15	5	5	5	15	5	5	5	15	15	7,97	220,9	4,12	59	
	Resultados EC ₅₀ 48h.	0,2962195			0,2766283			0,2624982			0,2768743			Método Estatístico utilizado - Trimmed Spearman Karber (JSPEAR)									

Ensaio Ecotoxicológicos - Cromo + meio WC sem EDTA

Teste nº 01 - 05 - B

Água de cultivo e/ou Água de diluição						Amostra	Responsável
Lote	pH	Cond	OD	Dureza		Branco	Ádria
Mineral – 01/11/06	7,59	144,6	4,49	43			

Data- 11/11/06	Concentração mg.L ⁻¹	Organismos Imóveis												Variáveis Finais						
		Ensaio 1			Ensaio 2			Ensaio 3			Ensaio 4			pH	Cond µS.cm ⁻¹	OD mg.L ⁻¹	Dureza mg.L ⁻¹			
		1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3					T		
	Controle	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	7,80	190,4	4,26	48
	0,05	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	7,80	252,7	4,25	56
	0,10	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	7,83	255,3	4,24	56
	0,20	1	2	1	2	1	2	5	3	1	1	1	5	2	1	0	7,84	256,2	4,22	57
	0,40	3	4	5	4	3	4	11	5	4	4	4	13	5	4	5	7,87	256,9	4,21	57
	0,80	5	5	5	5	5	5	15	5	5	5	5	15	5	5	5	7,89	260,2	4,20	58
	1,40	5	5	5	5	5	5	15	5	5	5	5	15	5	5	5	7,91	279,1	4,18	59
Resultados EC ₅₀ 48h.		0,2578741			0,2578741			0,2462289			0,2578741			Método Estatístico utilizado - Trimmed Spearman Karber (JSPEAR)						

Ensaio Ecotoxicológicos - Cromo + meio WC com EDTA

Teste nº 01 - 06 - B

Água de cultivo e/ou Água de diluição						Amostra	Responsável
Lote	pH	Cond	OD	Dureza		Branco	Ádria
Mineral – 01/11/06	7,59	144,6	4,49	43			

Data- 11/11/06	Organismos Imóveis																Variáveis Finais			
	Ensaio 1			Ensaio 2			Ensaio 3			Ensaio 4			pH	Cond $\mu\text{S.cm}^{-1}$	OD mg.L^{-1}	Dureza mg.L^{-1}				
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3					T			
concentração mg.L^{-1}	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
Controle	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	7,78	188,5			
0,05	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	7,80	236,0			
0,10	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	7,81	236,8			
0,20	0	1	2	1	0	2	1	0	2	1	0	1	0	1	2	7,83	238,1			
0,40	3	3	9	3	4	3	5	3	10	5	3	11	3	2	3	7,85	239,3			
0,80	5	5	4	5	5	5	5	5	15	5	5	15	4	5	5	7,88	240,5			
1,40	5	5	5	5	5	5	5	5	15	5	5	15	5	5	5	7,90	241,3			
Resultados EC_{50} 48h.	0,3387557			0,324901			0,324901			0,3088512			Método Estatístico utilizado - Trimmed Spearman Karber (JSPEAR)							

Ensaio Ecotoxicológicos - Cromo + meio WC sem EDTA +
Excretado Total

Teste nº 01 - 07 - B

Água de cultivo e/ou Água de diluição				Amostra		Responsável
Lote	pH	Cond	OD	<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i> Exopolissacarídeo		Ádria
Mineral – 10/01/07	7,84	142,0	4,30			

Data- 18/01/07	Organismos Imóveis												Variáveis Finais						
	Ensaio 1			Ensaio 2			Ensaio 3			Ensaio 4			pH	Cond $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$	OD $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	Dureza $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$			
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3					T		
Concentração $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	7,85	170,4	4,24	46
Controle	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	7,85	174,1	4,20	50
0,05	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	7,88	180,3	4,18	53
0,10	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	7,91	183,8	4,14	54
0,20	4	3	5	12	3	4	5	12	4	5	5	14	4	4	3	8,01	188,1	4,02	58
0,40	5	5	5	15	5	5	5	15	5	5	5	15	5	5	5	8,06	189,5	3,98	60
0,80	5	5	5	15	5	5	5	15	5	5	5	15	5	5	5	8,07	202,3	3,95	64
1,40																			
Resultados EC ₅₀ 48h.	0,324901			0,310229			0,2962195			0,3402669			Método Estatístico utilizado - Trimmed Spearman Karber (JSPEAR)						

Ensaio Ecotoxicológicos - Cromo + meio WC sem EDTA +
Fração < 10KD

Teste nº 01 - 08 - B

Água de cultivo e/ou Água de diluição				Amostra		Responsável
Lote	pH	Cond	OD	<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i> Exopolissacarídeo		Ádria
Mineral – 10/01/07	7,84	142,0	4,30			

Data- 18/01/07	Organismos Imóveis												Variáveis Finais						
	Ensaio 1			Ensaio 2			Ensaio 3			Ensaio 4			pH	Cond $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$	OD $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	Dureza $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$			
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3					T		
Concentração $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	7,84	180,6	4,25	46
Controle	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	7,86	181,4	4,13	47
0,05	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	7,91	185,2	4,11	49
0,10	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	7,95	188,1	4,07	50
0,20	5	5	15	3	4	5	12	4	4	4	5	13	4	5	14	8,03	193,6	4,05	54
0,40	5	5	15	5	5	5	15	5	5	5	5	15	5	5	15	8,08	203,6	3,98	56
0,80	5	5	15	5	5	5	15	5	5	5	5	15	5	5	15	8,14	209,8	3,82	61
1,40																			
Resultados EC_{50} 48h.	0,2828428			0,2962195			0,310229			0,2962195			Método Estatístico utilizado - Trimmed Spearman Karber (JSPEAR)						

Ensaio Ecotoxicológicos - Cromo + meio WC sem EDTA +
Fração > 10KD

Teste nº 01 - 09 - B

Água de cultivo e/ou Água de diluição				Amostra		Responsável
Lote	pH	Cond	OD	<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i> Exopolissacarídeo		Ádria
Mineral – 10/01/07	7,84	142,0	4,30			

Data- 18/01/07	Organismos Imóveis												Variáveis Finais						
	Ensaio 1			Ensaio 2			Ensaio 3			Ensaio 4			pH	Cond µS.cm ⁻¹	OD mg.L ⁻¹	Dureza mg.L ⁻¹			
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3					T		
Concentração mg.L ⁻¹	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	7,81	181,9	4,23	45
Controle	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	7,83	183,3	4,14	49
0,05	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	7,89	186,4	4,10	50
0,10	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	7,97	192,6	4,02	51
0,20	5	5	4	5	5	5	5	5	15	5	5	5	5	4	5	8,04	199,1	4,01	55
0,40	5	5	5	5	5	5	5	5	15	5	5	5	5	5	5	8,07	201,9	3,95	60
0,80	5	5	5	5	5	5	5	5	15	5	5	5	5	5	5	8,14	208,7	3,88	62
1,40																			
Resultados EC ₅₀ 48h.	0,27007			0,2759269			0,2828428			0,2828428			Método Estatístico utilizado - Trimmed Spearman Karber (JSPEAR)						

Ensaio Ecotoxicológicos - Cromo + meio WC com EDTA +
Excretado Total

Teste nº 01 - 10 - B

Água de cultivo e/ou Água de diluição				Amostra		Responsável
Lote	pH	Cond	OD	<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>		Ádria
Mineral – 06/10/06	7,60	126,3	4,40	Exopolissacarídeo		
			Dureza			
			45			

Data- 14/10/06	Organismos Imóveis												Variáveis Finais					
	Ensaio 1			Ensaio 2			Ensaio 3			Ensaio 4			pH	Cond $\mu\text{S.cm}^{-1}$	OD mg.L^{-1}	Dureza mg.L^{-1}		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3					T	
concentração mg.L^{-1}	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
Controle	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	7,86	185,2	4,26
0,05	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	7,94	196,4	4,24
0,10	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	7,99	195,1	4,22
0,20	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	8,00	223,2	4,19
0,40	2	3	8	2	1	4	7	3	1	7	2	2	2	6	6	8,04	238,1	4,03
0,80	5	5	15	5	5	5	15	5	5	15	5	5	5	15	15	8,05	240,8	4,01
1,40	5	5	15	5	5	5	15	5	5	15	5	5	5	15	15	8,07	247,7	3,94
Resultados EC_{50} 48h.	0,3806781			0,4013352			0,4093496			0,4093496			Método Estatístico utilizado - Trimmed Spearman Karber (JSPEAR)					

Ensaio Ecotoxicológicos - Cromo + meio WC com EDTA +
Fração < 10KD

Teste nº 01 - 11 - B

Água de cultivo e/ou Água de diluição				Amostra		Responsável
Lote	pH	Cond	OD	Dureza		Ádria
Mineral – 06/10/06	7,60	126,3	4,40	45		
				<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>		
				Exopolissacarídeo		

Data- 14/10/06	Organismos Imóveis												Variáveis Finais					
	Ensaio 1			Ensaio 2			Ensaio 3			Ensaio 4			pH	Cond µS.cm ⁻¹	OD mg.L ⁻¹	Dureza mg.L ⁻¹		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3					T	
concentração mg.L ⁻¹	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	46
Controle	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	7,85	180,6	4,24
0,05	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	7,88	185,1	4,11
0,10	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	7,89	187,5	4,09
0,20	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0	1	0	7,93	192,4	4,08
0,40	3	2	8	3	3	2	8	2	3	7	3	7	3	2	3	7,93	197,5	3,97
0,80	5	4	5	5	5	5	15	5	5	15	5	5	5	5	5	7,95	198,2	3,92
1,40	5	5	5	5	5	5	15	5	5	15	5	5	5	5	5	7,96	208,7	3,87
Resultados EC ₅₀ 48h.	0,3891281			0,3563595			0,3732132			0,3732132			Método Estatístico utilizado - Trimmed Spearman Karber (JSPEAR)					

Ensaio Ecotoxicológicos - Cromo + meio WC com EDTA +
Fração > 10KD

Teste nº 01 - 12 - B

Água de cultivo e/ou Água de diluição				Amostra		Responsável
Lote	pH	Cond	OD	<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i> Exopolissacarídeo		Ádria
Mineral – 06/10/06	7,60	126,3	4,40			

Data- 14/10/06	Organismos Imóveis												Variáveis Finais						
	Ensaio 1			Ensaio 2			Ensaio 3			Ensaio 4			pH	Cond µS.cm ⁻¹	OD mg.L ⁻¹	Dureza mg.L ⁻¹			
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3					T		
Concentração mg.L ⁻¹	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	7,83	178,1	4,25	46
Controle	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	7,95	178,3	4,30	48
0,05	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	7,97	183,4	4,28	49
0,10	0	0	1	0	0	1	1	1	0	1	0	2	1	0	0	7,97	191,3	4,22	53
0,20	1	4	3	8	3	3	9	2	3	3	3	8	3	3	4	7,98	197,8	4,15	55
0,40	5	5	5	15	5	5	15	5	5	5	5	15	5	5	5	7,99	205,2	4,02	59
0,80	5	5	5	15	5	5	15	5	5	5	5	15	5	5	5	8,02	209,1	3,80	62
1,40																			
Resultados EC ₅₀ 48h.	0,3563595			0,3402669			0,3609123			0,3402669			Método Estatístico utilizado - Trimmed Spearman Karber (JSPEAR)						

Ensaio Ecotoxicológicos - Cromo + Meio ASM-1 com TRIS sem EDTA

Teste nº 01 - 13 - B

Água de cultivo e/ou Água de diluição					Amostra		Responsável	
Lote	pH	Cond	OD	Dureza	Branco		Ádria	
Mineral – 06/11/06	7,59	125,8	4,35	45				

Data- 11/11/06	Organismos Imóveis																Variáveis Finais							
	Ensaio 1				Ensaio 2				Ensaio 3				Ensaio 4				pH	Cond $\mu\text{S.cm}^{-1}$	OD mg.L^{-1}	Dureza mg.L^{-1}				
	1	2	3	T	1	2	3	T	1	2	3	T	1	2	3	T								
concentração mg.L^{-1}	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	7,76	198,30	4,25	46
Controle	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	7,80	300,20	4,20	54
0,05	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	7,83	300,80	4,20	56
0,10	1	0	0	1	1	0	1	1	1	0	2	0	1	0	1	0	1	0	1	0	7,82	300,90	4,17	56
0,20	2	3	3	8	3	3	3	9	3	2	3	8	2	2	3	7	2	2	3	7	7,85	301,00	4,16	59
0,40	5	5	5	15	5	5	5	15	5	5	5	15	5	5	5	15	5	5	5	15	7,92	301,10	4,15	61
0,80	5	5	5	15	5	5	5	15	5	5	5	15	5	5	5	15	5	5	5	15	8,01	301,40	4,12	64
1,40																								
Resultados EC_{50} 48h.	0,3732132				0,3563595				0,3402669				0,3732132				Método Estatístico utilizado - Trimmed Spearman Karber (JSPEAR)							

Ensaio Ecotoxicológicos - Cromo + Meio ASM-1 com TRIS com EDTA

Teste nº 01 - 14 - B

Água de cultivo e/ou Água de diluição					Amostra		Responsável	
Lote	pH	Cond	OD	Dureza	Branco		Ádria	
Mineral – 06/11/06	7,59	125,8	4,35	45				

Data- 11/11/06	Organismos Imóveis																Variáveis Finais			
	Ensaio 1			Ensaio 2			Ensaio 3			Ensaio 4			pH	Cond $\mu\text{S.cm}^{-1}$	OD mg.L^{-1}	Dureza mg.L^{-1}				
	1	2	3	T	1	2	3	T	1	2	3	T					1	2	3	T
Concentração mg.L^{-1}	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
Controle	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
0,05	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
0,10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
0,20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
0,40	1	2	1	4	2	1	1	4	2	1	2	5	3	1	0	4	4	18		
0,80	3	5	4	12	4	4	5	13	4	3	4	11	4	4	3	11	4	15		
1,40	5	5	5	15	5	5	15	15	5	5	5	15	5	5	5	15	5	14		
Resultados EC_{50} 48h.	0,5329754			0,5111773			0,5306084			0,555703			Método Estatístico utilizado - Trimmed Spearman Karber (JSPEAR)							

Ensaio Ecotoxicológicos - Cromo + Meio ASM-1 com TRIS com EDTA +
Excretado Total

Teste nº 01 - 15 - B

Água de cultivo e/ou Água de diluição				Amostra		Responsável
Lote	pH	Cond	OD	Exopolissacarídeo		Ádria
Mineral – 04/12/06	7,33	144,6	4,49	<i>Anabaena spiroides</i>		
			Dureza			
			43			

Data- 14/12/06	Organismos Imóveis												Variáveis Finais					
	Ensaio 1			Ensaio 2			Ensaio 3			Ensaio 4			pH	Cond µS.cm ⁻¹	OD mg.L ⁻¹	Dureza mg.L ⁻¹		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3					T	
Concentração mg.L ⁻¹	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
Controle	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	7,70	198,1	4,25
0,05	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	7,71	198,2	4,24
0,10	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	7,79	198,9	4,21
0,20	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	7,84	202,3	4,20
0,40	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1	7,96	210,4	4,14
0,80	3	3	2	3	2	3	3	3	2	3	3	2	3	3	3	8,01	219,5	4,04
1,40	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	8,06	221,8	4,00
Resultados EC ₅₀ 48h.	0,6596571			0,690855			0,7577469			0,6326778			Método Estatístico utilizado - Trimmed Spearman Karber (JSPEAR)					

Ensaio Ecotoxicológicos - Cromo + Meio ASM-1 com TRIS com EDTA +
 Fração < 10 KD

Teste nº 01 - 16 - B

Água de cultivo e/ou Água de diluição				Amostra		Responsável
Lote	pH	Cond	OD	Exopolissacarídeo		Ádria
Mineral – 04/12/06	7,33	144,6	4,49	<i>Anabaena spiroides</i>		
			Dureza			
			43			

Data- 14/12/06	Organismos Imóveis															Variáveis Finais			
	Ensaio 1			Ensaio 2			Ensaio 3			Ensaio 4			pH	Cond µS.cm ⁻¹	OD mg.L ⁻¹	Dureza mg.L ⁻¹			
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3					T		
concentração mg.L ⁻¹	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	7,72	190,0	46	
Controle	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	7,63	195,1	49	
0,05	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	7,70	198,4	50	
0,10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	7,74	199,6	50	
0,20	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	7,90	208,2	56	
0,40	4	5	3	4	5	12	5	4	3	2	3	5	2	3	5	7,98	213,5	59	
0,80	5	5	5	5	5	15	5	5	15	5	5	15	5	5	15	8,05	224,6	62	
1,40																			
Resultados EC ₅₀ 48h.	0,6122279			0,5845807			0,5845807			0,6655556			Método Estatístico utilizado - Trimmed Spearman Karber (JSPEAR)						

Ensaio Ecotoxicológicos - Cromo + Meio ASM-1 com TRIS com EDTA + Fração > 10 KD

Teste nº 01 - 17 - B

Água de cultivo e/ou Água de diluição						Amostra		Responsável
Lote	pH	Cond	OD	Dureza	Exopolissacarídeo			Ádria
Mineral – 04/12/06	7,33	144,6	4,49	43	<i>Anabaena spiroides</i>			

Data- 14/12/06	Organismos Imóveis																Variáveis Finais			
	Ensaio 1			Ensaio 2			Ensaio 3			Ensaio 4			pH	Cond µS.cm ⁻¹	OD mg.L ⁻¹	Dureza mg.L ⁻¹				
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3					T			
Concentração mg.L ⁻¹	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
Controle	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	7,69	194,3	46		
0,05	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	7,70	198,1	50		
0,10	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	7,78	199,4	52		
0,20	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	7,94	199,9	52		
0,40	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	7,99	202,3	58		
0,80	4	5	5	4	5	14	5	4	5	4	5	14	5	5	15	8,08	210,8	59		
1,40	5	5	5	5	5	15	5	5	15	5	5	15	5	5	15	8,10	223,7	62		
Resultados EC ₅₀ 48h.	0,5134576			0,5377412			0,5898079			0,5656855			Método Estatístico utilizado - Trimmed Spearman Karber (JSPEAR)							

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)