

UNIVERSIDADE DO VALE DO ITAJAÍ

ALBERTINA XAVIER DA ROSA CORRÊA

**Desenvolvimento de um Método de Imobilização/Conservação
de Algas Utilizadas em Testes Ecotoxicológicos**

Itajaí, SC
2006

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

ALBERTINA XAVIER DA ROSA CORRÊA

**Desenvolvimento de um Método de Imobilização/Conservação
de Algas Utilizadas em Testes Ecotoxicológicos**

Dissertação apresentada como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia Ambiental, na Universidade do Vale do Itajaí, Centro de Ciências Tecnológicas da Terra e do Mar. Área de concentração em Tecnologia e Gestão Ambiental.

Orientador: Claudemir Marcos Radetski, Dr.

Itajaí, SC
2006

Dedico esta obra aos meus filhos Lucas e Luana e principalmente, ao meu esposo Rogério, pela disposição e paciência, que tanto admiro, servindo de estímulo nas horas mais difíceis.

AGRADECIMENTOS

À minha mãe Terezinha de Jesus Xavier da Rosa pelo exemplo e carinho, inclusive por respeitar a minha ausência.

Em especial ao Prof. Claudemir Marcos Radetski pela orientação, dedicação e amizade dispensadas a este trabalho. E, principalmente, pelo exemplo de pessoa. Meu muito obrigado.

À Millipore pelo apoio material.

À equipe do LAMA (laboratório de microbiologia – UNIVALI) em especial ao Prof. Leonardo R. Rörig, pela oportunidade concedida para a realização deste trabalho.

Ao Prof. Charrid Regalla Jr., pela oportunidade dada para elaboração deste trabalho.

Ao amigo Roberto Dalla Vecchia, pelo incentivo nas horas difíceis e por tantos anos de amizade.

Ao oceanógrafo Márcio da Silva Tamanaha, amizade que cresceu durante o curso e que auxiliou na realização deste trabalho.

Ao técnico do Laboratório de química Orgânica Carlos Ossi da Costa pela ajuda e companheirismo.

À aluna do curso de Engenharia Ambiental, Renata Germani, pela amizade e ajuda em alguns momentos na elaboração deste trabalho.

Ao Prof. Paulo Ricardo Schwingel, coordenador do curso de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental.

À UNIVALI, pela possibilidade do desenvolvimento do trabalho nas suas instalações.

RESUMO

Os testes de toxicidade com algas são importantes para se avaliar o efeito ambiental de substâncias químicas no meio aquático. Os protocolos atuais de execução destes testes exigem uma cultura algal permanente, o que eleva os custos, aumenta a carga laboratorial e acarreta riscos de contaminação ao se fazer, periodicamente, a repicagem da cultura para um novo meio de cultivo. Uma maneira de diminuir toda essa carga laboratorial e riscos de contaminações é a utilização da técnica de imobilização para a conservação do inóculo algal. Desta forma, o objetivo do presente trabalho foi o de avaliar novas metodologias para facilitar a execução desta rotina laboratorial relativa às algas, como por exemplo: a utilização do método fluorimétrico para contagem das algas; a proposição de uma técnica conservação de algas baseada na imobilização/desimobilização química e uma demonstração da aplicabilidade dessa técnica em estudos de campo. Baseado nos resultados obtidos em campo e no laboratório evidenciou-se que esta técnica de conservação é viável tecnicamente, além de ser uma maneira rápida, barata e de grandes possibilidades de aplicação em estudos ambientais.

Palavras chaves: imobilização de algas, teste de toxicidade com algas, conservação de algas.

ABSTRACT

Algal toxicity tests are very important to evaluate aquatic environmental effects of chemical pollutants. To carry out algal toxicity tests, a permanent algae pre-culture is necessary, which have costs, is labour intensive and is subject to accidental contamination during laboratory manipulations. To avoid these inconvenients, some authors suggest to use an algae immobilization technique based on chemical solidification to preserve algae inoculum. Thus, the aim of this work was to evaluate new methodologies that can improve algal toxicity tests applications: use of fluorimetric method to enumerate algal cells; proposition of a chemical immobilization/demobilization method to preserve algal inoculum, and utilization of immobilized algae to study aquatic environmental impact. The results showed that improved methodology to preserve algal inoculum is feasible, with low costs and with a great potential to use in environmental studies concerning aquatic ecotoxicology.

Keywords: algae immobilization; algal toxicity tests; algae preservation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: <i>Selenstrum capricornutum</i>	17
Figura 2: Suporte para imobilização de células por ligação covalente.....	26
Figura 3: Alginato complexado com íon bivalente e não-complexado com íon monovalente.....	28
Figura 4: Processo de imobilização das algas em alginato; 1 - cultura algal, 2 - solução de alginato em meio de cultura, 3 - precipitação das esferas de alginato com células em CaCl ₂ , 4 - separação e lavagem das algas com meio de cultura e 5 - conservação das algas imobilizadas em meio de cultura.....	32
Figura 5: Local onde as algas imobilizadas foram colocadas – Rio Pau do Barco.....	35
Figura 6: Correlação entre o número de células de algas e os parâmetros utilizados.....	39
Figura 7: <i>Selenastrum capricornutum</i> imobilizadas em esferas de alginatos 1,4%.....	42
Figura 8: Comparação do crescimento das algas frescas e imobilizadas em diferentes tempos relacionando o desvio padrão.....	46
Figura 9: Imagem das algas apresentadas na seqüência (da esquerda para direita): alga no sítio poluído, alga no sítio não poluído e alga no laboratório.....	53

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Comparação da sensibilidade para contagem algal por diferentes técnicas	38
Tabela 2: Escolha da concentração de alginato em função do crescimento algal. Os dados apresentados são médias e coeficientes de variação (n= 3).....	41
Tabela 3: Tempo de desmobilização e volume de desmobilizante usado.....	43
Tabela 4: Comparação da média dos valores de crescimentos das algas fresca e imobilizadas em diferentes períodos de tempo (n=5).....	45
Tabela 5: Comparação dos valores da CE ₅₀ (72 hs), para alga fresca e imobilizada.....	46
Tabela 6: Comparação dos valores de CE ₅₀ entre algas frescas e imobilizadas, segundo Bozeman <i>et al.</i> (1989).....	47
Tabela 7: Valores da fluorescência para as algas imobilizadas exposta no rio.....	48
Tabela 8: Valores da fluorescência após 5 dias de crescimento em laboratório.....	48
Tabela 9: Valores da diferença entre a fluorescência final e inicial das algas crescidas em laboratório após retornarem do meio ambiente.....	49
Tabela 10: Diferença entre fluorescência antes da exposição e após exposição ao meio natural (sítios poluídos e não poluídos). São mostrados os valores médios da variação de fluorescência e o fator de crescimento durante o período de exposição ambiental.....	50
Tabela 11: Valores da área e largura das algas em diferentes sítios.....	53

LISTA DE QUADROS

Quadro1: Requisitos básicos e úteis para um sistema de alga immobilizada e propriedades de uma matriz ideal para immobilização.....	21
Quadro 2: Suportes de diferentes origens para immobilização de células vivas.....	23
Quadro 3: Tipo de suporte e organismo immobilizado.....	23
Quadro 4: Suportes comerciais utilizados no método de adsorção.....	25
Quadro 5: Aspecto das algas immobilizadas, quando colocadas no rio (sítio poluído e não poluído) em comparação às algas mantidas em laboratório (padrão).....	52

LISTA DE ABREVIATURAS

Siglas

APHA - American Public Health Association,
ASTM -American Society for Testing and Materials,
CETESB – Companhia de Tecnologia e Saneamento Ambiental de São Paulo,
ISO - International Standardization Organization,
OECD - Organization for Economic Cooperation and Development,
USEPA – United States Environmental Protection Agency.

Abreviaturas

CE – Concentração Efetiva
CE_{X%} - Concentração Efetiva à X %,
CL_{X%} - Concentração Letal à X %,
C.V. – Coeficiente de Variação
FT – Fator de Toxicidade
CENO - Menor concentração com efeito observado,
M – Molar,
nm – Nanômetros,
CEO - Concentração maior sem efeito observado,
pH – Potencial Hidrogeniônico,
rpm – Rotações por minuto.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
1.1	Contextualização	12
1.2	Algas.....	15
1.2.1	<i>Selenastrum capricornutum</i>	16
1.2.2	Testes de (Eco)Toxicidade Aquáticos.....	18
1.3	Imobilização.....	20
1.3.1	Métodos de Imobilização	22
1.4	Aplicação de algas imobilizadas	29
2	MATERIAIS E MÉTODOS	31
2.1	Manutenção das algas.....	31
2.2	Imobilização.....	31
2.3	Desimobilização	32
2.4	Seleção do parâmetro utilizado para contagem das algas - Curva de Calibração.....	33
2.5	Testes de Toxicidade.....	33
2.6	Testes em Campo	34
2.7	Análise de dados	36
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	38
3.1	Seleção do parâmetro utilizado para contagem das algas - Curva de Calibração.....	38
3.2	Influência da concentração de alginato no crescimento algal.....	40
3.3	Influência dos diferentes desimobilizantes no processo de desimobilização..	43
3.4	Influência da imobilização/desimobilização no crescimento algal	44
3.5	Influência da imobilização/desimobilização na sensibilidade das algas através de Testes de toxicidade	46
3.6	Aplicação das algas imobilizadas em estudo de campo.....	47
3.6.1	Estudos preliminares.....	48
3.6.2	Estudo de campo definitivo	50
4	CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	54
5	REFERÊNCIA BIBLIOGRAFICA.....	56
	ANEXOS	61
	Anexo A: solução-estoque para preparo do meio de cultivo APHA.....	61

Anexo B: Valores da fluorescência para o crescimento <i>S. capricornutum</i> fresca, taxa de crescimento, desvio padrão e coeficiente de variação.....	62
Anexo C: Valores da fluorescência para o crescimento <i>S. capricornutum</i> imobilizada por um período de tempo de 60 dias, taxa de crescimento, desvio padrão e coeficiente de variação.....	62
Anexo D: Valores da fluorescência para o crescimento <i>S. capricornutum</i> imobilizada por um período de tempo de 110 dias, taxa de crescimento, desvio padrão e coeficiente de variação.....	63
Anexo E: Valores da fluorescência para o crescimento <i>S. capricornutum</i> imobilizada por um período de tempo de 150 dias, taxa de crescimento, desvio padrão e coeficiente de variação.....	63
Anexo F: Valores da fluorescência para o crescimento <i>S. capricornutum</i> imobilizada por um período de tempo de 180 dias, taxa de crescimento, desvio padrão e coeficiente de variação.....	64

1 INTRODUÇÃO

1.1 Contextualização

A evolução industrial, uma das bases de construção da sociedade moderna, trouxe grandes benefícios à humanidade. Apesar dos grandes benefícios alcançados, os processos industriais geram resíduos e subprodutos que, com o passar dos anos, tem se configurado como problemas de saúde pública e problemas de poluição em níveis locais, regionais e globais. A maior parte dos resíduos industriais e domésticos alcançam, direta ou indiretamente, o ecossistema aquático, especialmente porque muitos dos grandes centros urbanos do planeta são adjacentes aos recursos hídricos (SOUZA, 2002). Estes resíduos, quando lançados em ambientes aquáticos podem alterar a qualidade da água, do sedimento, como também a composição da biota desse sistema. Devido a isto, o campo da Ecotoxicologia Aquática vem se desenvolvendo muito, com avanços significativos na área de prevenção e avaliação de impactos ambientais.

Dentre os resíduos mais críticos, os metais pesados (*e.g.*, cádmio, cromo, chumbo) tem sido fonte de contaminação dos mananciais aquáticos em todo o mundo. Provenientes dos mais diferentes segmentos industriais (ex. indústria de corantes) e presentes nos mais variados processos catalíticos, tais metais, potencialmente tóxicos, têm contaminado espécies vegetais e animais, incluindo o homem. Outra categoria de resíduos que causam danos ambientais são os pesticidas (PRIMEL *et al.*, 2005).

A liberação de poluentes no ambiente torna imperiosa a pesquisa de novos e eficientes meios de quantificação da poluição aquática para que se obtenham mecanismos de controle que possibilitem avaliações precisas, as quais possam subsidiar as políticas de preservação do meio ambiente. Os efeitos tóxicos potenciais dessas substâncias, no ambiente aquático, podem ser avaliados através dos testes toxicológicos.

A Toxicologia Aquática tem sido definida como o estudo dos efeitos adversos de agentes químicos e de outros produtos de natureza alheia ao ambiente sobre os organismos aquáticos. Tais estudos podem ser conduzidos através de testes de toxicidade estabelecidos de acordo com os diversos objetivos que se

procuram alcançar nestas avaliações (LOMBARDI, 2006). Uma das principais finalidades da toxicologia aquática é avaliar os riscos ecológicos o que, pela complexidade e diversidade dos sistemas naturais, é ainda uma tarefa difícil. Um novo paradigma e também desafio da toxicologia aquática é a identificação de “alvos ecológicos” – elementos ou sinais chaves que traduzam os processos de controle e suas alterações no ecossistema em risco (VIDOTTI, 2004). Por isso, testes de toxicidade aquática figuram como ferramentas importantes para avaliação da sensibilidade de organismos aquáticos a poluentes. A toxicidade pode ser avaliada em função do tempo de exposição ao poluente, assim temos testes de toxicidade aguda e crônica, que buscam indícios de danos à biota exposta aos poluentes (FERREIRA, 2003).

A origem da Toxicologia Aquática é muito discutida. Muitos dos profissionais que atuam neste ramo são de diferentes áreas. Apenas nos últimos 25 anos apareceram programas de treinamento de toxicologia aquática e suas raízes estão interligadas à toxicologia clássica e à química ambiental (SOUZA, 2002).

Nas últimas décadas, houve uma internacionalização das metodologias usadas na toxicologia aquática. Para conviver com as grandes descargas de efluentes industriais e municipais, agências de proteção ambientais de vários países como Alemanha, França, Inglaterra, Estados Unidos, Canadá, Japão e Austrália reconheceram a utilidade da aplicação de testes toxicológicos (SOUZA, 2002). Hoje, os protocolos de testes da ISO são reconhecidos e utilizados no mundo inteiro, pois os conhecimentos gerados nestes testes podem viabilizar medidas legais que normalizam o uso de fontes de águas naturais, que limitam a emissão de efluentes, assim como fornecem dados essenciais para a homologação e etiquetagem de produtos químicos utilizados no comércio em geral (FERREIRA, 2003).

Segundo Resgalla (2002), no Brasil, o uso de testes de toxicidade como ferramenta de análises de efeito ambiental vêm sendo feito desde a década de 70 e foram inicialmente implantados pela CETESB (Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental de São Paulo) utilizando organismos de água doce. Somente uma década depois foram realizados os primeiros ensaios com espécies marinhas e estuarinas. Na literatura existe um grande número de publicações utilizando microalgas em teste de toxicidade e várias organizações (APHA, ASTM, ISO e OECD) recomendam estes organismos como organismo-teste. Os métodos destas organizações são muito similares, sendo que o efeito do tóxico é determinado

pelo crescimento de uma população de algas em um meio nutriente enriquecido por um período de três ou quatro dias. Os testes são usualmente conduzidos em frascos Erlenmeyers agitados sob iluminação constante (SCHÜRMANN and MARKERT, 1997).

Para a realização de testes de toxicidade com algas é necessário manter uma cultura de algas permanente que devem ser cultivadas e mantidas em condições controladas de temperatura e luminosidade, em câmaras de culturas diferentes daquelas câmaras utilizadas nos testes, a fim de minimizar riscos de contaminação através de substâncias voláteis ou microorganismos presentes nas amostras testadas (RADETSKI *et al.* 1995).

A presente proposta de trabalho insere-se nesse contexto, uma vez que propõe o desenvolvimento de melhorias no teste de toxicidade com algas, bem como procura ampliar a aplicação deste tipo de teste no campo do monitoramento de ambientes aquáticos, através da técnica de imobilização (encapsulamento) químico.

Desta forma, pretende-se através deste trabalho coletar dados sobre a viabilidade de manter as algas imobilizadas e depois de algum tempo desimobilizá-las e avaliar se possuem a mesma sensibilidade das algas frescas.

Diferentemente do teste de algas com células livres, o teste feito com algas imobilizadas poderia expandir a utilização dos ensaios de toxicidade no campo (TURBAK *et al.*, 1986), uma vez que a alga imobilizada é exposta às amostras potencialmente tóxicas sob condições ambientais reais. Em seguida, as algas são recuperadas e analisadas em laboratório, observando-se a taxa de crescimento ou outras características fisiológicas.

Desta forma, os objetivos do presente trabalho são justamente os de avaliar:

- ❖ A influência de diferentes métodos para contagem das algas: microscopia, fluorimetria e espectrofotometria;
- ❖ A influência de diferentes concentrações de agentes imobilizantes para conservação das algas;
- ❖ A influência de três agentes desimobilizantes: citrato de sódio, diidrogênio fosfato de sódio e polifosfato de sódio na qualidade das algas desimobilizadas;

- ❖ A influência da imobilização/desimobilização no crescimento e na sensibilidade toxicológica das algas;
- ❖ A utilização das algas imobilizadas, de forma preliminar, em teste de toxicidade em campo.

Do ponto de vista técnico e ecológico, melhorar a conservação e a aplicabilidade dos testes realizados com algas é importante por serem estes organismos representativos dos produtores aquáticos primários, constituindo um elo fundamental na cadeia trófica.

Quanto ao aspecto técnico, o desenvolvimento de uma técnica de imobilização para conservação das algas evitaria a necessidade de se ter uma cultura de algas em constante manutenção, o que eleva o custo e duração do teste, bem como expõe as algas à possíveis contaminações por bactérias.

Quanto ao aspecto ecológico, a realização de testes *in situ*, sob condições reais, aumenta a representatividade ambiental do teste e isto é importante para se aproximar ao máximo do que acontece no ambiente.

1.2 Algas

As algas são organismos capazes de ocupar todos os meios que lhe ofereçam luz e umidade suficientes, temporárias ou permanentes. Assim, elas são encontradas em águas doces, na água do mar, sobre os solos úmidos ou mesmo sobre a neve. Quer sejam uni ou pluricelulares, as algas retiram todos os nutrientes que precisam do meio líquido onde estão, portanto, são organismos fundamentalmente aquáticos (VIDOTTI, 2004).

Algumas espécies de algas encontram uso na avaliação da qualidade dos sistemas aquáticos, para os quais, inclusive, já foi sugerido um “índice de poluição” baseado nos gêneros de algas presentes: quanto menos diversificadas a população, maior a poluição do sistema (TRAINOR, 1983 *apud* VIDOTTI, 2004). Outro fator marcante destes organismos é a capacidade de retirar do meio aquoso elementos químicos, o que sugere a utilização de algumas espécies de algas na recuperação de sistemas aquáticos contaminados, em especial quanto à presença de íons metálicos e de alguns compostos orgânicos. Mais recentemente, tem sido avaliado o

uso das algas como agentes concentradores de substâncias ou íons, em processos de pré-concentração na química analítica (VIDOTTI, 2004).

Os testes que utilizam algas como organismos-teste geralmente estão presentes nos estudos de impacto ambiental (NYHOLM *et al.*, 1985; KÄLLQVIST, 1973) e várias organizações ambientais, tais quais, USEPA, OCDE e ISO sugerem uma bateria de testes com vários tipos de organismos (incluindo as algas) quando da notificação de uma nova substância química em vistas de comercialização, subentendendo por aí, futura rejeição para o ambiente destes produtos. Esta recomendação de usar algas se justifica pelo papel ecológico muito importante que elas desempenham, isto é, são produtores primários que transferem energia para os níveis tróficos superiores. Assim, as alterações na composição das comunidades fitoplanctônicas podem afetar não só a estrutura, mas também o funcionamento dos níveis tróficos superiores, e por consequência de todo o ecossistema (MOSSER *et al.*, 1972). Tecnicamente, os testes de toxicidade feitos com algas são relativamente simples, rápidos e de baixo custo quando comparados aos testes realizados com peixes e (macro) invertebrados (*e.g.*, dáfias) (FERARD *et al.*, 1992). Este tipo de teste algal apresenta também uma menor variabilidade nos resultados dos testes, pois as algas são organismos com menor diversidade genética que, por exemplo, as bactérias. Além do mais, os testes com algas são geralmente mais sensíveis do que os outros testes microbiológicos frente às misturas complexas (*e.g.*, efluente industrial) (FERARD *et al.*, 1992).

1.2.1 *Selenastrum capricornutum*

Selenastrum capricornutum (renomeada *Pseudokirschiniella subcapitata*) (figura1) é provavelmente a alga mais utilizada no mundo no contexto dos ensaios biológicos, relativos aos problemas ambientais, com muitos trabalhos encontrados nos bancos de dados bibliográficos, o que constitui um verdadeiro teste de referência em estudos ambientais (LEISCHMAN *et al.*, 1979). Inicialmente esta alga foi utilizada como um organismo modelo para medir a fertilidade das águas dos rios (SKULBERG, 1967); posteriormente iniciou-se o uso em ensaios de ecotoxicidade. Assim, este teste foi adotado nos EUA pelo grupo de trabalho misto governo-indústria encarregado dos problemas de eutrofização dos rios e lagos americanos.

Em seguida, *Selenastrum capricornutum* foi escolhida como um organismo modelo na avaliação da toxicidade de substâncias puras e de meios complexos (ex.: meios receptores ou efluentes) (LEISCHMAN *et al.*, 1979). Desde então, vários países escolheram esta alga como um material biológico modelo nos estudos ambientais.

Selenastrum capricornutum é um organismo clorofiliano de água doce, representativo dos produtores primários, que se encontra nos meios oligotróficos e eutróficos. É unicelular, não possui flagelos e é facilmente reconhecida por sua forma característica em crescimento helicoidal. Apresenta dois ápices, um sendo um pouco mais largo que o outro. O tamanho das células depende mais da fase da divisão celular do que do meio de cultura, assim, o volume celular varia de 15 a 30 μm^3 para as células situadas na fase exponencial da curva de crescimento, enquanto que este volume pode atingir 60 a 70 μm^3 nas células que se encontram na fase estacionária da curva de crescimento (SKULBERG, 1967). O crescimento das culturas obedece a uma cinética de primeira ordem, sendo que a taxa de crescimento depende diretamente da quantidade de irradiação (luz), da temperatura, da presença de nutrientes minerais e da quantidade de gás carbônico. Isto significa que tendo as condições nutritivas suficientes, o desenvolvimento desta alga é estritamente dependente da quantidade de luz, com uma taxa de crescimento diretamente proporcional à duração da iluminação. As células em via de se dividir tem um diâmetro médio de 7,5 μm e uma largura média de 2 μm (NYGAARD *et al.*, 1986).

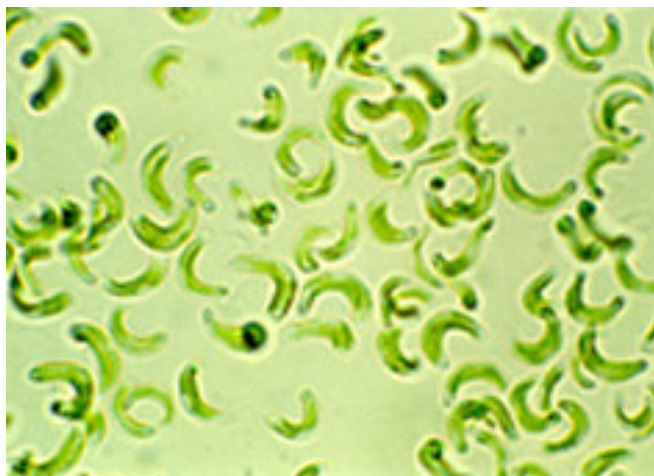


Figura 1: *Selenastrum capricornutum*

Disponível em <http://www.shonan-inet.or.jp/~gef20/gef/imagenes/mo2.jpg>

1.2.2 Testes de Toxicidade em Ambientes Aquáticos

Testes de toxicidade aquática são procedimentos no quais as respostas fisiológicas, morfológicas ou de letalidade dos organismos aquáticos são usadas para determinar e medir os efeitos de uma ou mais substância, resíduos, ou fatores ambientais, sozinhos ou em combinação, durante um determinado tempo (CESAR, 1997).

Segundo Azevedo (2003), os testes de toxicidade visam predizer o efeito de determinado xenobiótico (substância química estranha ao organismo).

Dependendo do tempo de exposição, os testes de toxicidade classificam-se em agudo (menos que 10% do ciclo de vida do organismo), sub-agudo (entre 10-30% do ciclo de vida do organismo) ou crônico (maior que 30% do ciclo de vida do organismo) sendo este último, o tipo de teste predominante na literatura (NYHOLM and KALLQVIST, 1989). O teste de toxicidade aguda fornece informação sobre a letalidade relativa de um xenobiótico, sendo delineado para determinar a concentração suficiente para dizimar 50% dos organismos testes (CL_{50}) ou inibir o crescimento em 50% (CE_{50}). Os testes com algas medem os efeitos fisiológicos ou morfológicos dos agentes tóxicos sobre estas espécies ou avaliam a sobrevivência destas após um período de 24 horas à 96 horas de exposição. Em geral, nos testes de toxicidade aguda com algas são usados cinco concentrações e um controle, com exposição de algumas horas. Para o teste ser aceitável, a sobrevivência no controle deve ser no mínimo de 90% (ABNT, 2003 *apud* JARDIM, 2004).

O teste de toxicidade crônica consiste na exposição de organismo-teste a várias diluições da amostra, por um período de 10 à 30 % do ciclo de vida do organismo. O efeito tóxico é determinado pela inibição do crescimento da biomassa nos recipientes-testes comparativamente ao crescimento nos frascos-controle (testemunhos), sob as mesmas condições de ensaio (ABNT, 2000).

Quanto à renovação da solução-teste (ou meio nutricional) os testes de toxicidade podem ser a) Estáticos, b) Semi-estáticos, c) Dinâmicos e d) Teste de Biomonitorios (KNIE e LOPES, 2004):

- a) Teste Estático: É o mais aplicado. Neste, o meio não é trocado e os organismos permanecem expostos à mesma solução-teste durante o período do ensaio. Dependendo da duração do teste e da composição do

meio, podem ocorrer mudanças químicas, por exemplo, em forma da degradação da matéria orgânica.

- b) Teste Semi-estático: É aplicado com substâncias-teste ou amostras ambientais pouco estáveis que sofrem lentamente alterações biológicas por degradação, ou abióticas por hidrólise ou fotólise, influenciando assim a composição química da solução-teste. Neste, a solução-teste é substituída em intervalos definidos por outra com as mesmas características, preparada imediatamente antes da troca.
- c) Teste Dinâmico: O método é especificamente adequado na medição de meios instáveis (por exemplo, com substâncias voláteis), de amostra com substâncias de baixa solubilidade, para estudar a questão de bioacumulação e biotransformação (no caso de substâncias submetida a elevada degradação biótica e abiótica) e para o monitoramento contínuo da qualidade de águas e efluentes. Neste, os organismos são expostos a um fluxo contínuo da solução-teste.
- d) Teste de Biomonitores: São utilizados principalmente como sistemas de alerta em estações de controle da qualidade de águas e efluentes. São sistemas de teste automatizados, nos quais os organismos são expostos permanentemente, normalmente em regime de *by-pass*, a um fluxo contínuo da água ou do efluente a ser examinado. As reações dos organismos-teste aos constituintes da água são capturadas continuamente por sensores de alta definição.

Alguns testes dinâmicos e pseudodinâmicos com algas estão descritos na literatura (BENNETT, 1988; FISHER *et al.*, 1974; JOUANY *et al.*, 1983), entretanto, estas técnicas são freqüentemente mais trabalhosas ou mais caras do que os testes estáticos e por isso, não são freqüentemente usadas para avaliações toxicológicas de rotina (RADETSKI *et al.*, 1995).

Pelo fato de outros testes de toxicidade crônica (*Lemna minor*, *Daphnia magna*, *Ceriodaphnia dubia*, *Pimephales promelas*, etc.) serem feitos sob condições tipicamente semi-estáticas (usualmente com renovação diária da solução-teste),

seria talvez mais realístico - em termos de exposição ambiental – realizar os testes com algas também sob condições semi-estáticas (RADETSKI *et al.* 1995).

A aplicação de análises estatísticas é essencial para a interpretação correta dos resultados dos testes de toxicidade. Esta análise estatística também serve para dar confiabilidade aos resultados, visto a importância das decisões que poderão ser tomadas pelos órgãos ambientais (NIPPER, 2002a).

O resultado do tratamento estatístico das relações concentrações/efeitos normalmente é expresso em concentração efetiva (CE). O valor da concentração efetiva é inversamente proporcional à toxicidade da solução-teste (ou amostra), portanto, quanto menor o valor, maior é a toxicidade da amostra. Conforme Knie e Lopes (2004), também podem ser determinadas concentrações-limite, indicando a partir de qual concentração da substância foi observado um efeito estatístico significativo através de CENO (menor concentração com efeito observado) e CEO (maior concentração sem efeito observado). Para cada experimento deve-se adotar um método estatístico apropriado, sendo que os mais empregados atualmente são os que se encontram informatizados (*e.g.*, TOXSTAT). Isto se deve à facilidade de utilização e obtenção de resultados confiáveis (CESAR, 1997). Segundo Knie e Lopes (2004), quando é exigido como resultado de teste apenas o Fator de Toxicidade (FT), um tratamento estatístico mais extensivo dos dados é dispensável. O FT é determinado diretamente dos dados obtidos no teste, sendo igual ao fator de diluição da maior concentração da amostra que não causou um efeito significativo aos organismos-teste.

1.3 Imobilização

Uma célula imobilizada é definida como uma célula que, por meios naturais ou artificiais é impedida de mover-se independentemente de sua vizinhança para todas as partes da fase aquosa do sistema sob estudo (TAMPION and TAMPION, 1987 *apud* MALLICK, 2002).

O principal interesse em imobilizar uma amostra de algas é fazer com que as mesmas permaneçam em estado de latência, sem perda de suas atividades fisiológicas. Em comparação à sua forma livre, a qual pode sofrer contaminações

adversas, a alga imobilizada está protegida das contaminações. Idealmente, a alga imobilizada e desmobilizada deverá exibir uma atividade fisiológica similar à forma livre (CHEN, 2001; LUKAVSKÝ, 1986; MALLICK, 2002). Sistemas convencionais de tratamento de água, com alga, podem ser visto como sistemas de dois componentes, consistindo da água e da alga, o qual inclui a interação entre a alga e componentes da água tais como; seleção de espécies efeito da densidade algal, aclimação e também a natureza da água. Adicionalmente, está também incluso o efeito de fatores físicos tais como a intensidade de luz, temperatura, pH, etc. A incorporação da tecnologia de imobilização de alga em sistemas de tratamento de água, entretanto, introduz um terceiro componente, a matriz gel, para o sistema. Onde ocorre a interação entre a matriz gel e a alga (MALLICK, 2002). O Quadro 1 fornece um sumário para os principais requisitos de um sistema de imobilização algal útil e eficiente e as propriedades de uma matriz ideal para imobilização.

Quadro1: Requisitos básicos e úteis para um sistema de alga imobilizada e propriedades de uma matriz ideal para imobilização.

Requisitos úteis para um sistema de alga imobilizada	Propriedades de uma matriz ideal para imobilização
Viabilidade de retenção	Não toxicidade
Habilidade para fotossintetisar	Fototransparencia
Alta densidade de células	Estabilidade em meio de crescimento
Produtividade contínua	Retenção de biomassa
Baixo vazamento de células de matriz	Resistência ao rompimento por crescimento celular

Fonte: MALLICK (2002).

Com relação aos testes ecotoxicológicos, algumas vantagens das algas imobilizadas em comparação com a forma livre são:

- a) Não há necessidade de réplicas semanais;
- b) Diminuição do consumo de nutrientes;
- c) Diminuição do espaço físico para manter as réplicas;
- d) Não há a necessidade de se fazer uma pré-cultura;
- e) Diminuição na quantidade de vidraria e lavagens;

- f) Diminuição da contaminação por bactérias.

O sucesso do emprego da técnica de imobilização/desimobilização de microalgas depende de alguns fatores que incluem a espécie da alga, matriz imobilizadora, concentração de células, aeração, tempo de imobilização, toxicidade do agente desmobilizante, entre outros cuidados (TAM, 2000). Uma substância muito utilizada para imobilização de algas é o Alginato de Cálcio (BOZEMAN *et al.*, 1989).

Uma característica das algas imobilizadas está na habilidade de acabar com problemas de análise da toxicidade de efluentes coloridos ou turvos que interferem nas medidas dos critérios de efeito (“endpoints”) (BOZEMAN *et al.*, 1989). As algas podem ficar em contato com uma amostra tóxica no escuro e então serem transferidas para o meio nutricional sob iluminação, por um determinado período de crescimento. As características favoráveis de armazenamento das algas imobilizadas poderiam permitir que o inóculo seja distribuído a partir de uma central de cultura e também promover a padronização interlaboratorial (TAMPONNET *et al.*, 1985).

Romo and Pérez-Martínez (1997) ainda ressaltam que a técnica de imobilização em alginato é muito mais fácil e mais barato que outras técnicas, tais como a criopreservação.

1.3.1 Métodos de Imobilização

A imobilização é geralmente conseguida através do contato de um material utilizado para a imobilização com as células vivas que se pretende imobilizar, mantendo-se condições de ambientes controladas. O material utilizado para a imobilização é denominado suporte (PRADELLA, 2001). As principais características de um suporte para a imobilização de células vivas são:

- a) Não ser tóxico às células;
- b) Alta capacidade de retenção;
- c) Resistência ao ataque químico e microbiano;

- d) Pouca sensibilidade às possíveis solicitações mecânicas; seja de compressão por peso, de tensões de cisalhamento ou eventuais pressões internas e externas de gases;
- e) Alta difusividade de substratos e produtos.

Quanto à origem dos suportes, o Quadro 2 mostra os mais utilizados na imobilização de células vivas.

Quadro 2: Suportes de diferentes origens para imobilização de células vivas.

Polímeros naturais	Polímeros sintéticos	Materiais inorgânicos
Alginato	Poliacrilamida	Alumina
K- carragenana	Cloreto de polivinila	Sílica
Agar	Poliestireno	Zircônia
Pectina	Poliuretano	Vidro
Celulose	Polietileno glicol	Diatomita
Dextrana		Vermiculita
Colágeno		

Fonte: Pradella (2001).

No Quadro 3 são mostrados exemplos de suportes para as respectivas células imobilizadas (PARK, 2000).

Quadro 3: Tipo de suporte e organismo imobilizado.

Suporte	Organismo
Agarose	<i>Hybridona</i>
Alginato de Cálcio	<i>Hybridona</i> <i>Saccharomyces carlabergensis</i> <i>Leuconostoc mesenteroids</i> <i>Lithospermum erythrorhizon</i> <i>Saccharomyces cerevisiae</i> <i>Aspergillus awamori/ Saccharomyces cerevisiae</i>

Suporte	Organismo
	<i>Aspergillus niger</i>
Poliacrilamida Hydrazida/ Alginato de Cálcio	Levedura
Alginato de Cálcio	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> <i>Escherichia coli</i>
Kappa- carragenana	<i>Penicillium Chrysogenum</i>
PVA/Ácido Bórico/Alginato de Cálcio	<i>Pseudomonas</i>
BIX12-alginato Hybrid	<i>Hybridoma</i>
Carragenana	<i>Bacillus subtilis</i>

Fonte: Park (2000).

Os compostos poliacrilamida e poliuretano são tóxicos para imobilização de células. O Alginato de Cálcio é muito usado para imobilização de células animais, células microbianas, mitocôndrias, cloroplastos, protoplastos e células vermelhas do sangue (PARK, 2000). A imobilização em suporte pode ocorrer basicamente através de seis tipos de métodos que podem ser distinguidos: a) Adsorção; b) Ligação covalente; c) Confinamento em emulsão líquido-líquido; d) Captura sob membrana semipermeável; e) Imobilização por afinidade e f) Envolvimento ou encapsulamento.

a) Adsorção

O procedimento de adsorção é um dos mais simples e é um dos métodos mais utilizados. Por ser um processo reversível o suporte pode ser recuperado depois que o catalisador é desnaturado. Isto tem sido adotado com sucesso em processos enzimáticos. Uma diferença importante entre enzima adsorvida e células é que esta última está ligada via ligação multiponto e, portanto, adiciona-se muito mais fortemente ao suporte adsorvente. Isso leva a uma adsorção mais eficiente, mas também, a uma dificuldade no processo de desorção (MALLICK, 2002).

O material é imobilizado em um suporte sólido por ligações de baixa energia, tais como interações de Van der Waals ou hidrofóbicas, pontes de hidrogênio, ligações iônicas, entre outras. Vários materiais podem ser usados para este propósito e a escolha de um deles depende de suas propriedades, como força mecânica, estabilidade física e química, caráter hidrofóbico/hidrofílico, capacidade de adsorção de enzima e custo (VILLENEUVE, 2000).

Alfaya (2002) coloca que o método de imobilização de enzima sobre materiais inorgânicos apresenta a grande vantagem por sua simplicidade de execução. Já Pradella (2001) ressalta que as limitações da técnica consistem no fato de que existe uma influência bastante acentuada das condições ambientais promovidas pelo meio de cultivo na capacidade de retenção das células no suporte, normalmente relacionadas com concentração iônica, pH e idade da população celular que se deseja imobilizar.

Vários materiais podem ser utilizados para imobilização por adsorção. Balcão *et al.* (1996) publicaram uma compilação de métodos de imobilização mostrando os seguintes materiais utilizados: polietileno, polipropileno, celite, resina sintética, celulose, sefadex, entre outros. Alguns exemplos de suportes comerciais utilizados no método de adsorção e suas principais características são mostrados no Quadro 4 (PRADELLA, 2001).

Quadro 4: Suportes comerciais utilizados no método de adsorção.

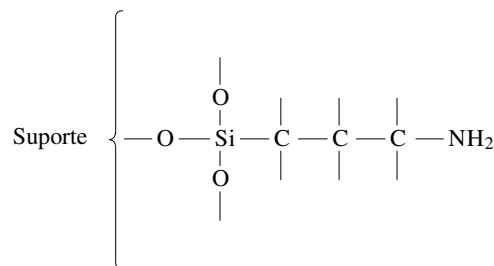
Nome comercial	Material	Célula
Cytodex	Dextrana	Mamíferos
Cytopore	Celulose	Mamíferos Microorganismos
Cytoline	Polietileno e sílica	Mamíferos Microorganismos
Siran	Vidro poroso	Microorganismos

Fonte: Pradella (2001).

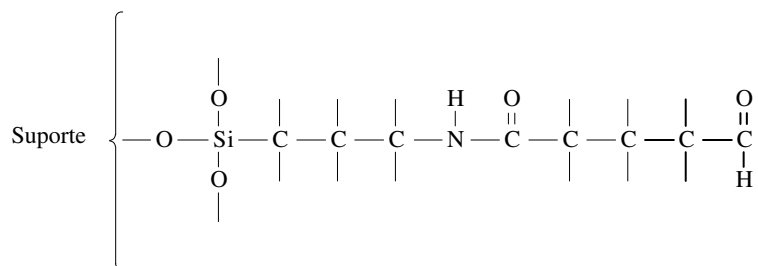
b) Ligação Covalente

É o método mais popular para a imobilização de enzimas, mas, no caso de células, poucos sistemas usando esta técnica têm sido relatados, a principal desvantagem deste processo é que as células vivas, em princípio são caracterizadas pela sua habilidade em dividir-se mesmo no estado imobilizado. Os poucos relatos nesta área são focados no uso de células mortas, ou células que estão para serem utilizadas apenas em conversões catalíticas de uma única etapa (MALLICK, 2002). Alfaya (2002) comenta que o método consiste na formação de ligações covalentes entre o suporte e o imobilizado (*e.g.*, enzima). Estas ligações são geralmente feitas

pela reação de grupos funcionais específicos da enzima, os quais não são essenciais para a sua atividade catalítica, com grupos reativos específicos presentes no suporte sendo, portanto, necessário um conhecimento prévio da estrutura química da enzima e da natureza do suporte. As grandes vantagens deste método são a minimização da lixiviação e uma maior estabilidade do complexo enzima-suporte em relação aos efeitos da variação do pH, da força iônica e/ou do solvente. Entretanto, o método apresenta alta possibilidade de perda da atividade enzimática devido à reação com grupos funcionais do centro ativo da enzima, como também pela deformação da estrutura tridimensional da mesma. Pradella (2001) descreve uma metodologia onde o suporte é primeiramente tratado com o γ -aminopropil-trietoxissilano (APTS), formando um grupamento amina que reage com glutaraldeído onde produz uma estrutura que possui um grupamento $-HC=O$ altamente reativo (figura 2), ocorrendo a interação da célula suporte através da carbonila do suporte com a amina da parede celular. Esta metodologia possui limitações para imobilização de células vivas devido o potencial tóxico do sistema, conferido pela presença do glutaraldeído.



Resultante do tratamento de APTS e suporte



Resultante do tratamento do aminoalquil-suporte com glutaraldeído

Figura 2: Suporte para imobilização de células por ligação covalente.

c) Confinamento em emulsão líquido-líquido

Mallick (2002) coloca que neste método de imobilização, as soluções aquosas de dois diferentes polímeros solúveis em água são misturadas uma à outra, ficando esta frequentemente turva. Quando deixada estabilizar, uma separação de fases ocorrerá. A composição do sistema de fases, tanto quanto a natureza química das substâncias a serem particionadas determinam em qual fase uma estrutura biológica irá se encontrar. Sistemas de fase particionam materiais de acordo com suas propriedades de superfície.

d) Captura por membrana semipermeável

As células ficam retidas e isoladas da maior parte do líquido. As células podem ser imobilizadas dentro da membrana, uma técnica frequentemente usada para a fabricação de biosensores. A membrana permite o transporte molecular de materiais solúveis para e a partir das células imobilizadas enquanto está confinada e protegendo os organismos incluídos em seu interior. Bioreatores de fibras ocas "*Hollow-fibre*", com organismos confinados em um lado dos poros da fibra e os substratos solúveis e produtos do outro lado, parecem ser os mais usados na prática. Entretanto, o crescimento deve ser controlado para prevenir um aumento excessivo de biomassa, uma vez que isso poderia causar pressão, que por sua vez poderia romper a membrana (MALLICK, 2002).

e) Imobilização por afinidade

O princípio é baseado na cromatografia por afinidade. A imobilização por afinidade não envolve reações drásticas e não expõe, realmente o meio a produtos químicos, exceto para o material absorvente. Entretanto, no caso de células, o suporte usado para imobilização por afinidade deve conter algumas estruturas capazes de interagir com estruturas na superfície das células. Este é um método suave e assim, é especialmente útil para manusear estruturas lábeis (MALLICK, 2002).

f) Envolvimento ou Encapsulamento

Pradella (2001) coloca este método como o mais utilizado para imobilização de células vivas. Esta técnica consiste no confinamento físico de uma população celular em uma matriz polimérica formadora de um gel hidrofílico como

mostra a Figura 3. Os poros da matriz formadora são menores que as células contidas em seu interior. As células são livres dentro de seus compartimentos e os poros no material permitem que substratos e produtos se difundam para e a partir das células (MALLINCK, 2002). Segundo Pradella (2001), os reagentes naturais mais utilizados para o encapsulamento são o agar, κ -carragenana, alginato e pectina que podem ser preparados em solução aquosa, em uma concentração que pode variar de 1% a 4%. A gelificação do agar é realizada pelo abaixamento de temperatura, enquanto a gelificação dos outros se dá através da ação de uma solução de um cátion mono ou bivalente, como por exemplo, K^+ ou Ca^{2+} que podem estar a uma concentração de 0,05 M a 0,5 M. Entretanto, Mallick (2002) coloca que para imobilização de algas os géis naturais mais frequentemente usados são alginato e carragenana. Segundo Vitolo (2001), tão logo as gotas de alginato de sódio entram em contato com a solução salina, forma-se uma esfera, dentro da qual as moléculas da substância a ser imobilizada ficam retidas, cuja membrana é constituída pelo polímero de alginato de cálcio. Por exemplo, Mallick (2002) comenta que gotículas de alginato podem ser estabilizadas com íons divalente, tais como Ca^{2+} e gotículas de carragenana formam, tipicamente, ligações cruzadas “cross-link” com K^{1+} .

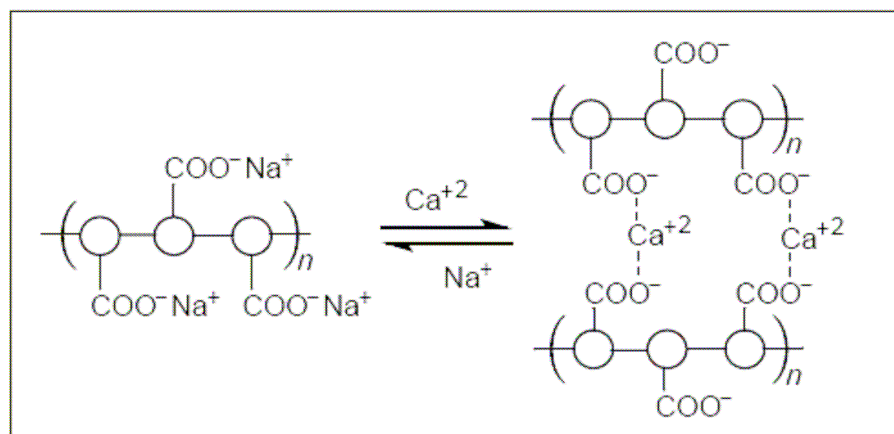


Figura 3: Alginato complexado com íon bivalente e não-complexado com íon monovalente

Fonte: Friedli and Schlager (2005).

As partículas formadas têm diâmetro de 0,5 a 5 mm e imobilizam organismos com densidade populacional de até cerca de 250 mg de biomassa seca por grama de matriz (VITOLLO, 2001). Pradella (2001) ainda descreve como células

vivas encapsuladas conseguem absorver nutrientes. As células encapsuladas em contato com o meio de cultura estabelecem um fluxo de nutrientes para dentro das partículas do gel, onde são consumidas pela população imobilizada. Os produtos formados no interior da matriz difundem-se através do gel e se acumulam no meio de cultura.

1.4 Aplicação de algas imobilizadas

Várias aplicações de microalgas imobilizadas são mostradas na literatura. Assim, Mallick, (2002) descreve que os primeiros relatos envolvendo o estudo de alga imobilizada foi publicado em 1966 (Park *et al*, 1966 *apud* MALLICK, 2002), onde eles usaram células de *Chlorella* fixadas quimicamente para a medida da reação de Hill. Subsequentemente, Hillier and Park (1969, *apud* MALLICK, 2002), também demonstraram que *Anacystis nidulans*, *Porphyridium cruentum* e *Chlorella pyrenoidosa* imobilizadas em glutaraldeído foram capazes de realizar produção de O₂ luz dependendo na presença de aceptores de elétrons apropriados. Entretanto, o Professor de La Noüe e seus colaboradores da Universidade de Laval, Quebec, Canadá, são os pioneiros na introdução da tecnologia da imobilização de algas em estudos de remoção de nitrogênio e fósforo de água. De fato, desde 1990, 50% de todos os relatos abordando algas imobilizadas envolvem seu uso em tratamento de água.

Bozeman *et al.* (1989) observou que o uso das algas imobilizadas em testes de toxicidade é viável, pois a inibição do crescimento das algas frescas e imobilizadas em diferentes tóxicos mostrou similaridade entre as sensibilidades.

Abdel-Hamid (1996) em seu artigo estuda a aplicação de *Selenastrum capricornutum* para teste de toxicidade onde comparou a CE₅₀ de algas frescas e imobilizadas, constatando valores similares.

Chen (2001) em seu artigo menciona a aplicação das algas imobilizadas para tratamento de água e relata que a técnica de imobilização pode ser utilizada para preservação das espécies de alga em laboratório e utiliza *Scenedesmus quadricauda* para diminuir a concentração de amônio na cultura de peixes (Tilápia).

Chen (2003) aplicou a alga marinha *Isochrysis galbana* imobilizadas na qualidade da alimentação e da água nas culturas de molusco. As algas imobilizadas

foram fontes de alimentação para os moluscos e o autor conclui que a Imobilização de *Isochrysis galbana* pode ser usada para a preservação à longo prazo para estoque de laboratório e ainda ser aplicada às culturas dos moluscos.

Moreira- Santos *et al.* (2002, 2004) relata em seus artigos que a imobilização mostrou ser uma metodologia aplicável para expor as algas planctônicas às mudanças contínuas das condições de campo, sem risco de serem lavadas ou perdidas por predação ou sedimentação.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Manutenção das algas

Para a realização dos trabalhos uma cepa da microalga *Selenastrum capricornutum* de sensibilidade conhecida foi mantida em cultura não axênica no Laboratório de Microbiologia Aplicada da UNIVALI seguindo as seguintes condições: $T = 20^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, fotoperíodo 12:12 (APHA *et al.*, 1999). A densidade algal inicial para o teste foi ajustada para aproximadamente 10^4 cél.L⁻¹. Macro e micronutrientes foram utilizados na preparação do meio de cultura das algas na forma de soluções estoques, conforme o meio APHA (APHA *et al.*, 1999).

As algas foram repicadas semanalmente para assegurar o suprimento de células viáveis. Isso foi feito pela transferência de 4 mL de meio de crescimento para um novo meio.

O Anexo A apresenta os compostos utilizados para o preparo das soluções-estoque para o meio de cultura usado na cultura de *S. capricornutum*.

2.2 Imobilização

Como imobilizante utilizou-se alginato de sódio (SIGMA A-7128 High viscosity). Foram testadas diferentes concentrações: 0,3%; 0,6%; 1,0% e 1,4%. O método de preparo do imobilizante foi o mesmo em todas as concentrações. Assim, em um béquer adicionou-se alginato em meio de cultura com agitação mecânica até total dissolução do alginato. Após dissolução, foi adicionado o mesmo volume de cultura algal à solução de alginato. Agitou-se vigorosamente com um bastão de vidro, por um período de cinco minutos. Esta mistura foi colocada em uma bureta. Logo após, gotejou-se esta mistura em uma solução de cloreto de cálcio diidratado à 2%. Formaram-se pequenas esferas de algas imobilizadas que ficaram imersas na solução de cloreto de cálcio por um período de 50-60 minutos. Após este período a solução de cloreto de cálcio foi retirada e as algas imobilizadas foram lavadas três vezes com meio de cultura e guardadas na geladeira em uma temperatura de 4^oC (obscuridade), imersas em meio de cultura. Um esquema da imobilização é

mostrado na Figura 3. Para cada concentração foram realizadas três réplicas. As algas ficaram imobilizadas durante vários períodos 10, 15, 30, 60, 110, 150 e 180 dias.

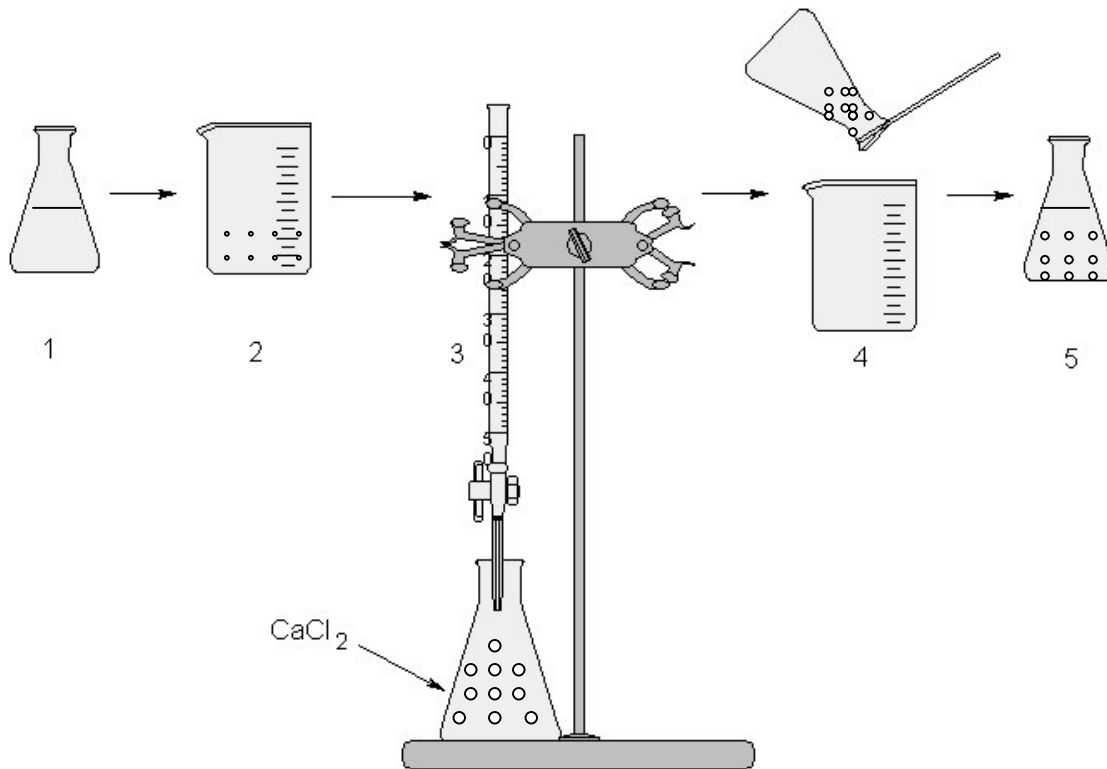


Figura 4: Processo de imobilização das algas em alginato; 1 - cultura algal, 2 - solução de alginato em meio de cultura, 3 - precipitação das esferas de alginato com células em CaCl_2 , 4 - separação e lavagem das algas com meio de cultura e 5 - conservação das algas imobilizadas em meio de cultura.

2.3 Desimobilização

Foram utilizados como desimobilizantes três substâncias.

As substâncias desimobilizantes foram: citrato de sódio P.A. (VETEC) à 0,1M; diidrogênio fosfato de sódio P.A. (NUCLEAR) à 0,1M com ajuste de pH= 7,5 e o polifosfato de sódio (NUCLEAR) à 1%. As soluções dos desimobilizantes foram preparadas em água destilada autoclavada.

Para todos os desimobilizantes a quantidade da mistura (alga + alginato) desimobilizada foi de 30 mL.

O método de desmobilização foi o mesmo para os três desmobilizantes: (1ª) etapa de dissolução e a (2ª) etapa de lavagem.

1ª etapa: Dissolução

Iniciou-se o procedimento retirando o meio de cultura em que as algas estavam imersas. Depois foram adicionadas frações de 10 mL de desmobilizante sob agitação mecânica até a completa desmobilização. A duração da desmobilização dependeu do desmobilizante testado.

2ª etapa: Lavagem

A mistura (alga + alginato + desmobilizante) foi centrifugada à 3000 rpm (Excelsa modelo 206BL) durante dez minutos. O sobrenadante foi eliminado e as algas foram recuperadas no meio de cultura e colocadas para crescer.

2.4 Seleção do parâmetro utilizado para contagem das algas - Curva de Calibração

A curva de calibração foi preparada a partir de amostra de células de *S. capricornutum* em crescimento exponencial, as quais foram centrifugadas por aproximadamente dois minutos à 400 rpm. A contagem microscópica das algas feita em câmara de Sedwig-Rafter mostrou uma densidade algal média de 5532 cel./ μ L ou 5.532.000 cel/mL que foram realizadas em quintuplicatas. A partir dessa concentração foram preparadas as doze diluições para as leituras simultâneas no fluorímetro (FLUOROMETER TD 700) e no espectrofotômetro visível do tipo UVIKON no comprimento de onda de 750 nm.

2.5 Testes de Toxicidade

A metodologia empregada seguiu a norma ISO (1989). Como tóxicos foram utilizados Gamit, Carbofuram, e zinco nos testes de sensibilidade, os quais foram utilizadas nos testes logo após o preparo.

Um volume de 150 mL de solução do tóxico e 3 mL de alga, medidos em pipeta automática, foram colocados nos erlenmeyers. Foram realizadas triplicatas para cada concentração e seis réplicas para o controle. A densidade inicial de células para cada erlenmeyer foi medida em fluorímetro (FLUOROMETER TD 750). O teste de toxicidade foi realizado com frasco erlenmeyer cobertos com filme de PVC transparente de acordo com a recomendação da norma ISO 8692 (ISO, 1989). A distribuição dos erlenmeyer na mesa de agitação foi feita aleatoriamente. Foram colocadas sob iluminação constante luz fluorescente branca (tipo luz do dia plus, F20W) e intensidade luminosa de $24 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (400 – 700 nm) a uma temperatura de $20^{\circ}\text{C} \pm 2$, por um período de 72 horas. Terminado o tempo de exposição, a contagem das células em cada Erlenmeyer foi feita através da análise de clorofila “a” *in vivo* em fluorímetro.

2.6 Testes em Campo

Os pontos de estudo foram selecionados tendo em vista a facilidade de acesso e a localização de pontos a montante e a jusante do lançamento de esgoto sanitário no rio Pau do Barco localizado no Bairro Monte Verde em Florianópolis (figuras 5). A seguir são apresentadas às coordenadas geográficas (segundo Google Earth) das áreas de estudo onde as algas imobilizadas foram colocadas.

Sítio Não poluído: $27^{\circ} 33'45''.27$ S e $48^{\circ} 29'25''.31$ W

Sítio Poluído: $27^{\circ} 33'31''.70$ S e $48^{\circ} 29'37''.06$ W



Figura 5: Local onde as algas imobilizadas foram colocadas – Rio Pau do Barco.

As amostras foram colocadas e retiradas sempre no período da manhã, em torno das 8 horas, aproximadamente. Foram realizados três ensaios com intervalos de tempo de dois, quatro e sete dias para os testes preliminares.

Foram utilizados 100 mL de uma amostra de alga com fluorescência inicial de 980 unidades. A esta amostra foi misturada 100 mL de alginato fazendo

com que a concentração algal diminuísse pela metade. Dessa mistura foram feitas 6 réplicas (e mais duas réplicas com 30 mL cada) contendo 300 esferas. Foi medido o volume médio ocupado por 100 esferas, o qual foi de 5,8 mL. Portanto, em cada réplica a concentração algal inicial foi equivalente a uma fluorescência de 42,6 unidades.

Das seis réplicas, três foram colocadas no sítio poluído e três foram colocadas no sítio não poluído.

As esferas de algas imobilizadas foram colocadas dentro de uma bolsinha feita com pano de rede de nylon de 25 micra com dimensões de 5 x 14 cm. Estas bolsas foram fechadas e levadas até os sítios de estudo imersas em meio de cultura. No rio, as bolsinhas foram presas com linha de pesca e deixadas por um período com intervalos de 2, 4 e 7 dias. Após cada período, as bolsinhas de algas foram levadas ao laboratório imersas nas amostras de águas coletadas nos sítios. No laboratório foram desmobilizadas e colocadas para crescer em 100 mL de meio de cultura.

Para os estudos complementares a metodologia foi a mesma utilizada para os estudos preliminares mudando, somente, o tempo de exposição das algas no rio, que passou para 2 e 4 dias, com três réplicas por dia.

2.7 Análise de dados

Os dados foram armazenados em planilha eletrônica do software Microsoft Excel®, onde foram avaliados os valores de CE_{50} obtidos 72 horas após o início do teste através do método de linearização PROBIT. Os resultados dos testes de toxicidade foram quantificados em termos das taxa de crescimento e da porcentagem de inibição, calculados pela medida de clorofila “a” *in vivo*, através das fórmulas.

$$\text{Taxa de crescimento} \quad \mu = \frac{\ln N_n - \ln N_0}{t_n}$$

Onde:

N_n : densidade celular final;

N_0 : densidade celular inicial nominal;

t_0 : tempo da medida final após o início do teste.

$$\text{Porcentagem de inibição } I_{\mu i} = \frac{\mu_c - \mu_i}{\mu_c} \times 10$$

Onde:

$I_{\mu i}$: porcentagem de inibição do crescimento para a concentração-teste i ;

μ_c : taxa de crescimento média para o controle;

μ_i : taxa de crescimento média para a concentração i .

A comparação do crescimento de algas entre os diferentes períodos de imobilização foi feita por Análise de Variância, seguida pelo teste de comparação múltipla de Tukey no programa TOXSTAT (Versão 3.0). Este teste foi utilizado porque desejava-se comparar os grupos entre si e os resultados dos testes preencheram as premissas de normalidade e homogeneidade. Como cumpriram as premissas, os mesmos puderam ser submetidos à análise de variância e análise de comparações múltiplas paramétricas. Foi escolhido o método de Tukey, em especial, já que este método compara todos os resultados entre si e segundo Nipper (2002b) freqüentemente se usa este teste para a análise de testes com amostras de campo.

As imagens das algas imobilizadas foram feitas com auxílio do software Image-Pro Plus do Laboratório de Oceanografia Biológica do CTTMar/UNIVALI.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Seleção do parâmetro utilizado para contagem das algas - Curva de Calibração

Dos três métodos que podem ser utilizados para a determinação da contagem das algas, *i.e.*, espectrofotometria, fluorimetria e microscopia, a avaliação da contagem das algas pelo método fluorimétrico demonstrou proporcionar uma maior praticidade e detectabilidade em relação à absorvância e a microscopia. Assim, a alternativa fluorimétrica é útil para redução do tempo de análise laboratorial comparada também com a contagem manual (Tabela 1). Isto está de acordo com o estudo de Geis *et al.* (2000), o qual observou que a fluorescência mostrou ser uma técnica muito mais sensível para medir baixas concentrações de clorofila. A absorvância não é tão sensível, sendo inadequada para medir baixo crescimento algal ou baixa concentração de clorofila “a” .

Tabela 1: Comparação da sensibilidade para contagem algal por diferentes técnicas.

Contagem microscópica	Parâmetros		
	Absorvância	Fluorescência	Clorofila <i>a</i>
2766000	0,306	1336	637,12
1383000	0,164	765	364,8
691500	0,076	349,4	166,62
345750	0,038	177,9	84,84
172875	0,022	87,1	41,54
86437	0,009	43,1	20,56
43218	0,009	24,7	11,78
21609	0,003	10,5	5,07
10804	-	5,8	2,77
5402	-	2,2	1,05
2701	-	0,9	0,43
1350	-	0,2	0,09

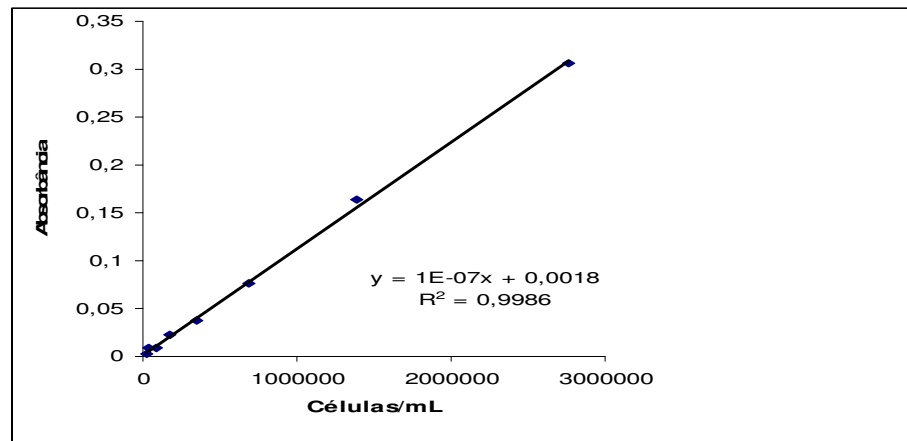
Observando os dados da Tabela 1 é possível observar que o método fluorimétrico é mais sensível, uma vez que pode ser detectado uma quantidade algal de 1350 cel/mL, comparado com o método espectrométrico que mostrou ser menos sensível, uma vez que só pode ser detectado uma quantidade algal de 21609 cel/mL. Assim, a fluorimetria mostrou um nível de detectabilidade 16 vezes maior que o método espectrofotométrico.

Desta forma o presente estudo mostra que o método fluorimétrico se mostra uma possibilidade de normatização para uma análise sensível e rápida da quantidade de algas.

Para avaliar a qualidade dos dados gerados, plotou-se em gráfico os valores de fluorescência e absorbância em função do número de algas (Figura 6).

Assim, a Figura 6 nos mostra que o coeficiente de correlação linear foi melhor para o método espectrofotométrico (radiação visível). Contudo, esse método não é sensível para baixas concentrações de algas.

Já para o método fluorimétrico e da contagem da clorofila *a*, os coeficientes foram iguais, pois o princípio da medida é o mesmo.



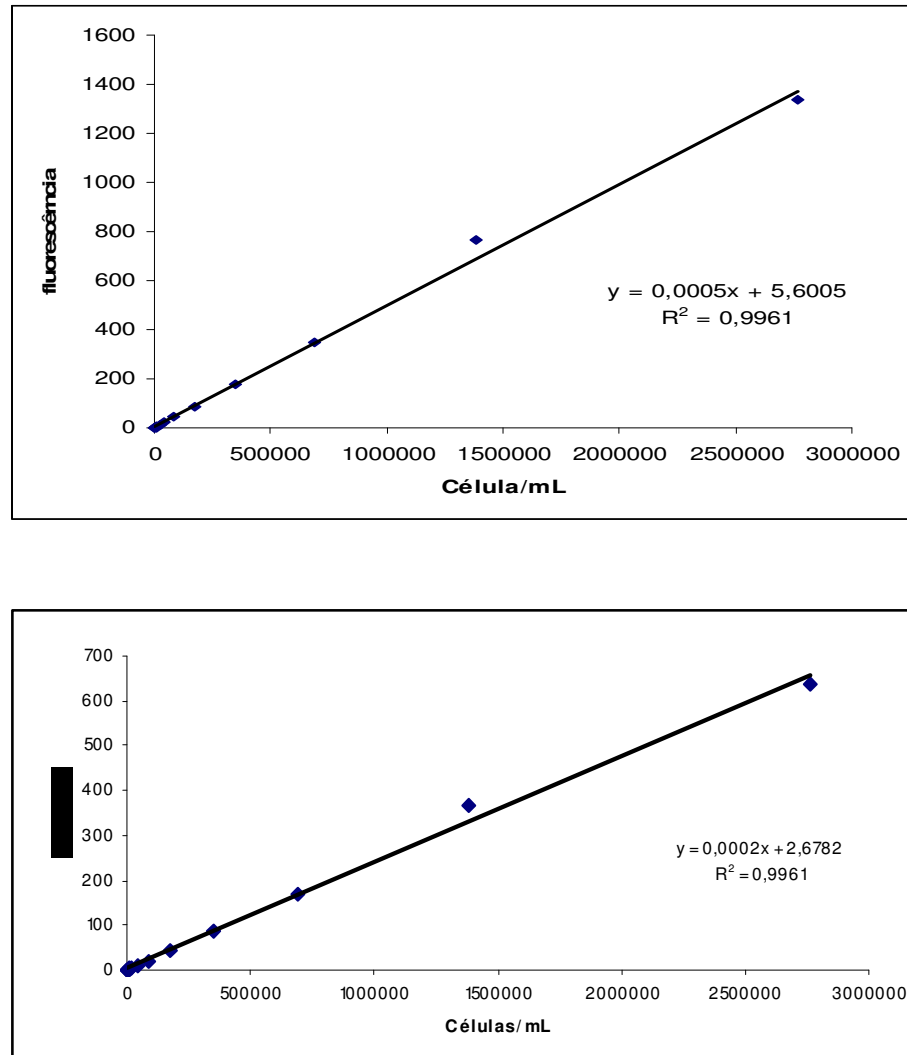


Figura 6: Correlação entre o número de células de algas e os parâmetros utilizados para contagem.

3.2 Influência da concentração de alginato no crescimento algal

Conforme mostra a Tabela 2, houve diferença no crescimento das algas dependendo da concentração do alginato utilizado na imobilização. As concentrações de 0,3% e 0,6% mostraram um crescimento inferior ao da concentração 1% e 1,4%. Além do mais, não houve crescimento das algas imobilizadas depois de 10 dias de imobilização nessas duas concentrações inferiores de alginato, pois a fluorescência inicial foi maior que a fluorescência final, indicando haver um dano sério nas algas.

Tabela 2: Escolha da concentração de alginato em função do crescimento algal. Os dados apresentados são médias e coeficientes de variação (n= 3).

Algas frescas	Algas imobilizadas 0,3 %	Algas imobilizadas 0,6 %	Algas imobilizadas 1,0 %	Algas imobilizadas 1,4 %
766,43	-231,1	-321,7	860*	987,8*
5,00	-26,13	-15,71	2,27	10,50

*Diferença estatisticamente significativa entre algas imobilizadas e frescas ($p=0,05$ – teste de Tukey).

Foi observado que durante o período de imobilização, na concentração de 0,3% houve uma diminuição nítida do tamanho das esferas. Isto pôde ser comprovado após a desimobilização, pois as algas que estavam nesta concentração (e também na concentração de 0,6 %) não apresentaram crescimento igual ao das algas frescas ou imobilizadas em alginato nas concentrações de 1,0% e 1,4%.

Duas concentrações poderiam ser escolhidas para imobilização 1% e 1,4% já que as duas, conforme mostra a Tabela 2, mantiveram um crescimento exponencial (e estatisticamente superior ao das algas frescas) após a desimobilização. A escolha foi feita pela concentração 1,4% levando-se em consideração as concentrações/tipo de alginato usado na literatura e, principalmente, a concentração que propiciou o maior crescimento das algas após a imobilização. Na Figura 7 são mostradas as algas imobilizadas na concentração escolhida de alginato (1,4%). Concentrações maiores que 1,4% não puderam ser utilizadas, já que o tipo de alginato utilizado no experimento foi o de alta viscosidade, o que dificultava a formação das esferas no momento da imobilização.

Na literatura existem publicações com aplicações em concentrações de alginato de sódio parecidas ou maiores e nenhuma com alta viscosidade como a utilizada no nosso experimento. Por exemplo, Moreira dos Santos *et al.* (2004) estudaram a imobilização de duas espécies de microalgas verdes *Selenastrum capricornutum* e *Chlorella vulgaris* usando alginato de sódio 1,3% (m/V). Já Moreira dos Santos *et al.* (2002) estudaram a imobilização da alga marinha *Phaeodactylum tricornutum* usando alginato de sódio 1,25% (m/v). Em ambos os estudos, as concentrações utilizadas pelos autores propiciaram o uso das algas imobilizadas. Bozeman *et al.* (1989) e Abdel-Hamid (1996) estudaram a imobilização de *Selenastrum capricornutum* em alginato de sódio à 4% e também concluíram sobre

a viabilidade de se usar o alginato a 4 % para imobilizar esta espécie de alga. Além disso, Abdel-Hamid (1996) concluiu que a técnica de imobilização é fácil, rápida e barata, sugerindo que as algas frescas poderiam ser substituídas pelas algas imobilizadas nos testes toxicidade.

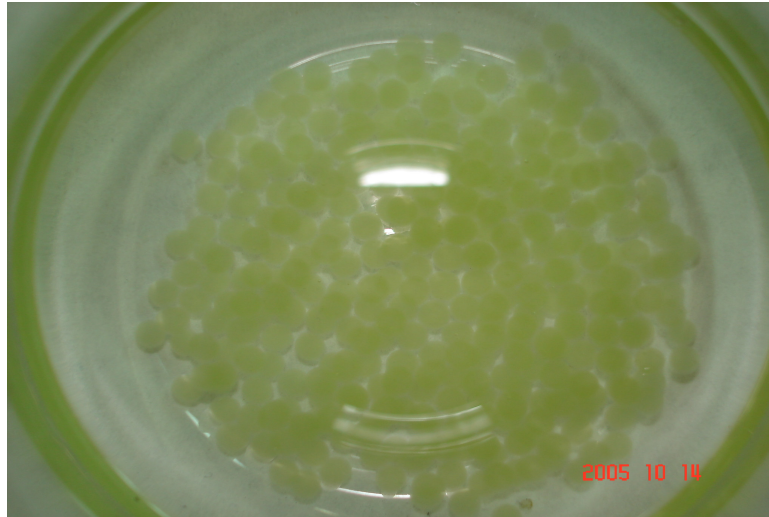


Figura 7: *Selenastrum capricornutum* imobilizadas em esferas de alginatos 1,4%.

Hertzberg e Jensen (1989) estudaram a imobilização de sete espécies de algas marinhas (*Phaeodactylum tricornutum*, *Skeletonema costatum*, *Chaetoseris ceratosporum*, *Emiliana huxleyi*, *Thalassiosira pseudinana*, *Amphidinium carterae* e *Acrippsiella trochoidea*) em uma solução de alginato, a qual foi preparada da seguinte maneira: dissolveram 1,5 g de alginato de sódio em 66 mL de água em agitação por 4-6 horas e depois foi adicionado a solução 2g de NaCl e 30,5g de água. Dessa forma, os autores observaram que a técnica usada de imobilização das microalgas marinhas em alginato pode ser usada para estoque de cultura das algas.

Romo and Pérez-Martínez (1997) estudaram a imobilização de *Pseudanabaena Galeata* (cianobactéria) em alginato de sódio a 3%. Estes autores concluíram que o processo é útil no gerenciamento e conservação das algas e que também é mais fácil e barato do que outros métodos de conservação.

Chen (2003) estudou a imobilização de microalga marinha *Isochrysis galbana* em alginato de sódio a 3% e observou que o método pôde reduzir os custos da cultura dos moluscos comparados aos métodos tradicionais de cultura. Conseqüentemente, a imobilização *Isochrysis galbana* pode ser usado para a

preservação em longo prazo do estoque algal no laboratório e ser aplicada nas culturas dos moluscos. Chen (2001) testou a praticabilidade de usar a técnica para a imobilização da espécie *Scenedesmus quadricauda* em alginato de sódio a 3% com o propósito de conservação da alga, sua viabilidade após um período de tempo e utilização no controle da água da cultura de peixes.

Lukavský *et al.* (1986), estudou as mudanças morfológicas assim como as mudanças ultraestruturais de *Clorella kessleri* e *Scenedesmus quadricauda* quando imobilizadas em alginato de sódio 1% e observou que a imobilização não interfere no estado fisiológico dessas algas após desimobilização.

3.3 Influência dos diferentes desmobilizantes no processo de desmobilização.

Os desmobilizantes testados foram citrato de sódio 0,1M, diidrogênio fosfato de sódio 0,1M e o polifosfato de sódio 1%. Na Tabela 3 são mostrados os tipos de desmobilizantes utilizados e os tempos que levaram cada desmobilização.

Para o citrato de sódio, foi observado uma diminuição no tempo de desmobilização e também foi necessário um menor volume para a desmobilização, comparativamente aos outros desmobilizantes. Com o desmobilizante KH_2PO_4 (diidrogenofosfato de sódio) além do maior tempo utilizado na desmobilização, a quantidade de solução utilizada foi muito grande (60 -100 mL). Com os outros desmobilizantes a quantidade de solução não foi tão grande (25-40 mL).

Tabela 3: Tempo de desmobilização e volume de desmobilizante usado.

Desmobilizante	Tempo	Volume
KH_2PO_4 0,1M	~90 min.	60 -100 mL
Citrato de sódio 0,1M	30 min.	25-40 mL
Polifosfato de sódio 1%	50 min.	25-40 mL

Assim, o citrato de sódio foi escolhido como desmobilizante por levar menos tempo na desmobilização e ser necessário pouca quantidade para efetivar a desmobilização.

Na literatura existem várias publicações com aplicações dos desmobilizantes e suas respectivas concentrações. Por exemplo, Moreira dos Santos *et al.* (2004) estudaram a desmobilização de duas espécies de microalgas verdes *Selenastrum capricornutum* e *Chlorella vulgaris* usando citrato trisódio 6% (m/V), enquanto que Moreira dos Santos *et al.* (2002) estudaram a desmobilização da alga marinha *Phaeodactylum tricornutum* usando citrato trisódio 3% (m/v), sendo que em ambos os casos, a desmobilização foi efetiva e não prejudicou as algas.

Hertzberg and Jensen (1989) estudaram a desmobilização de sete espécies de algas marinhas (*Phaeodactylum tricornutum*, *Skeletonema costatum*, *Chaetoseris ceratosporum*, *Emiliana huxleyi*, *Thalassiosira pseudinana*, *Amphidinium carterae* e *Acripsiella trochoidea*) e Tam and Wong (2000) a de *Chlorella vulgaris* com o desmobilizante citrato de sódio 0,1 M. Os resultados mostraram que todas as espécies algais retomaram normalmente o crescimento depois desse processo de desmobilização.

Alguns autores usaram como desmobilizante o hexametáfosfato de sódio à 5%. Assim, Romo and Pérez-Martínez (1997) estudaram a desmobilização de *Pseudanabaena Galeata* (cianobactéria), Chen (2003) estudou a desmobilização de microalga marinha *Isochrysis galbana* e Chen (2001) estudou a desmobilização de *Scenedesmus quadricauda*. Este desmobilizante se mostrou eficiente, porém apresenta toxicidade para os seres humanos.

3.4 Influência da imobilização/desmobilização no crescimento algal

Os valores das taxas de crescimento das algas frescas e das algas imobilizadas nos períodos de tempo de 60; 110; 150 e 180 dias são mostrados nos anexos B, C, D, E e F. Esses valores foram plotados resultando na Figura 8. O experimento demonstra que após serem desmobilizadas, as algas estavam aptas para serem usadas em testes de rotina em laboratório, visto que apresentam altas taxas de crescimento.

Assim, a análise da Tabela 4 evidencia que a técnica de imobilização/desmobilização não tem influência direta no crescimento das algas de acordo com uma Análise de variância (ANOVA), seguida pelo teste de comparação múltipla de Tukey ($P \leq 0,05$). Assim, observa-se que após diferentes períodos de

imobilização e posterior cultura de crescimento em meio nutricional (três dias), as algas mantiveram uma taxa de crescimento similar (60 d) ou superior (110 d, 150 d e 180 d) ao crescimento das algas frescas, evidenciando que esta técnica pode ser usada para preservação de algas. Estes resultados estão de acordo com os estudos de Pane (1998); Chen (2001); Chen (2003); Romo and Pérez-Martínez (1997), os quais observaram que as algas imobilizadas durante variados períodos de tempo, armazenadas a temperatura baixa e na ausência de luz, podem recomeçar o crescimento normal a qualquer momento, após proceder a desimobilização. Esses estudos demonstram que isto é possível porque as algas mantêm suas atividades respiratórias e fotossintética mesmo durante o período de imobilização. Romo and Pérez-Martínez (1997) ainda ressaltam que a preservação das algas em esferas de alginato é mais fácil, mais barata e mais prontamente disponível do que outras técnicas de conservação, como, por exemplo, a criopreservação.

Tabela 4: Comparação da média dos valores de crescimentos das algas fresca e imobilizadas em diferentes períodos de tempo (n=5).

Alga fresca	Imobilizada 60 dias	Imobilizada 110 dias	Imobilizada 150 dias	Imobilizada 180 dias
0,782	0,895	1,051*	1,065*	1,029*

*Diferença estatisticamente significativa (teste de Tukey, $P=0,05$).

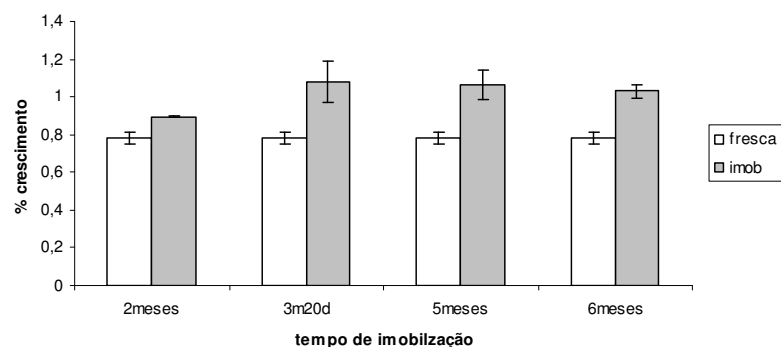


Figura 8: Comparação do crescimento das algas frescas e imobilizadas em diferentes tempos relacionando o desvio padrão.

3.5 Influência da imobilização/desimobilização na sensibilidade das algas através de Testes de toxicidade

Os testes com as substâncias zinco, gamit e carbofuram foram realizados com o objetivo de acompanhar e comparar a sensibilidade da alga fresca com relação à alga imobilizada, através da determinação da CE_{50} em 72h.

Os resultados obtidos (Tabela 5) demonstraram que a sensibilidade das algas imobilizadas é praticamente a mesma que a das algas frescas para os tóxicos testados. Estes dados não foram gerados com réplicas, impossibilitando assim uma análise estatística.

Tabela 5: Comparação dos valores da CE_{50} (72 hs), para alga fresca e imobilizada/desimobilizada.

Tóxico	CE_{50} (72hs) (mg/L) alga fresca	CE_{50} (72hs) (mg/L) imob. 110 d
Zinco	20	24
Carbofuram	26	28
Gamit	42	48

Quanto à sensibilidade das algas imobilizadas, Bozeman *et al.* (1989) estudaram a sensibilidade de *Selenastrum capricornutum* imobilizada em alginato de sódio à 4% em testes de toxicidade com cobre, cádmio, pentaclorofenol, Hidrotol, Glifosato e Paraquat. Estes autores observaram que os resultados de CE_{50} foram similares para o cobre, cádmio e pentaclorofenol e Glifosato. Contudo, as algas imobilizadas ficaram muito mais sensíveis à toxicidade do Hidrotol, Paraquat, e Glifosate (Tabela 6).

Tabela 6: Comparação dos valores de CE_{50} entre algas frescas e imobilizadas, segundo Bozeman *et al.* (1989).

Tóxico	CE_{50} (72hs) (mg/L) alga fresca	CE_{50} (72hs) (mg/L) Imobilizada
Cádmio	12,9 ± 1,3	10,5 ± 0,87
Cobre	6,0 ± 0,60	6,7 ± 0,15
Glifosate	26,3 ± 1,5	7,8 ± 1,5
Hidrotol	0,39 ± 0,10	0,055 ± 0,036
Paraquat	7,8 ± 2,4	1,8 ± 0,29
Pentaclorofenol	0,19 ± 0,008	0,17 ± 0,041

A explicação dada pelo autor para a diferença de sensibilidade com relação aos tóxicos Hidrotol e Paraquat é que a matriz alginato interagiu, em termos de adsorção com os tóxicos.

3.6 Aplicação das algas imobilizadas em estudo de campo

A imobilização de algas em esferas de alginato de sódio oferece várias vantagens nas investigações ecotoxicológicas (BOZEMAN *et al.*, 1989; ABDEL-HAMID, 1996). As células de algas podem ser expostas sob condições reais que acontecem no meio ambiente, sem sofrer perdas devido à lavagem, ingeridas ou sedimentadas. Assim, foram realizadas duas séries de experimentos para se avaliar a viabilidade de se utilizar as algas imobilizadas no monitoramento da qualidade das águas de um rio. Para tanto, as algas imobilizadas foram expostas às condições ambientais sem poluição e com poluição por esgotos sanitários.

3.6.1 Estudos preliminares

A Tabela 7 nos mostra a fluorescência das algas que foram expostas às condições ambientais durante 2, 4 e 7 dias, após a desmobilização.

Tabela 7: Valores da fluorescência para as algas imobilizadas expostas no rio.

Tempo no rio	Fluorescência- não poluído	Fluorescência – poluído
2 dias	216,4	292,8
4 dias	205,0	139,0
7 dias	35,8	129,4

Percebe-se, na Tabela 7, que o crescimento das algas variou *intra* e *inter* sítios. Assim, as algas expostas ao sítio não poluído foram sendo danificadas com o passar do tempo, principalmente, no tempo de exposição de 7 dias. Já, para o sítio poluído, após um incremento no crescimento das algas (depois de 2 dias no meio ambiente), as algas começaram a sentir um impacto negativo, pois houve efeito algicida nestas (depois de 4 e 7 dias de exposição), o que fez cair a fluorescência para valores bem menores.

Quando se compara o crescimento das algas nos sítios não-poluído e poluído, constata-se que após 2 dias de exposição, as algas presentes no sítio poluído cresceram mais do que as algas do sítio não-poluído. Isto provavelmente aconteceu pelo fato das algas disporem de mais nutrientes, presentes nos esgotos sanitários.

Após 4 dias de exposição, a toxicidade dos constituintes do esgoto sanitário foi maior do que o efeito benéfico dos nutrientes provocando, assim, uma diminuição na quantidade de algas.

Após 7 dias de exposição ambiental, a quantidade de algas no sítio não poluído diminuiu consideravelmente, provavelmente, devido à exaustão dos nutrientes da matriz e à pobreza de nutrientes nas águas do rio. No sítio poluído, a quantidade de algas foi parecida com a quantidade presente após 4 dias, o que pode ser explicado pela presença de nutrientes no meio ambiente, provavelmente nitratos e fosfatos.

Estas algas desmobilizadas foram postas em cultura no laboratório durante 5 dias para avaliarmos o crescimento das mesmas. Os resultados do crescimento em cultura laboratorial são mostrados na Tabela 8.

Tabela 8: Valores da fluorescência das algas após 5 dias de crescimento em laboratório.

Tempo no rio	Fluorescência - não poluído	Fluorescência – poluído
2 dias	779,4	931,7
4 dias	921,5	734,3
7 dias	722,3	627,6

A análise comparativa dos valores observados de fluorescência, dispostos nas Tabelas 7 e 8, demonstra, conforme exposto na Tabela 9, que os danos sofridos pelas algas devem relacionar-se à falta de nutrientes e/ou efeito tóxicos, pois, em meio de cultura, os indivíduos oriundos da exposição ambiental (nos 2 sítios) cresceram de forma relativamente semelhante (com exceção do tempo 7 dias), o que pode ser percebido fazendo-se o cálculo do fator de crescimento das algas.

Tabela 9: Valores da diferença entre a fluorescência final e inicial das algas crescidas em laboratório após retornarem do meio ambiente.

Tempo no rio	Fluorescência - não poluído	Fluorescência – poluído
2 dias	563,4 (3,6)	638,9 (3,2)
4 dias	716,5 (4,6)	595,3 (5,5)
7 dias	686,5 (23,7)	498,2 (12,5)
Média	655,5	577,5
C.V.	12,4	12,5

A comparação estatística dos valores das algas dos dois sítios mostra que não há uma diferença significativa entre os mesmos (teste “t” Student, $P \leq 0,01$).

Estes resultados preliminares nos levaram a fazer um estudo mais aprofundado em termos estatísticos, *i.e.*, a realização de testes com triplicatas.

3.6.2 Estudo de campo definitivo

Este estudo seguiu os mesmos passos do estudo preliminar descrito acima, mas agora com triplicatas e com duração de exposição menor, até 4 dias.

Os valores da variação da fluorescência (diferença entre fluorescência antes da exposição e após exposição ao meio natural), juntamente com os valores das taxas de crescimento são mostrados na Tabela 10.

Tabela 10: Diferença entre fluorescência antes da exposição e após exposição ao meio natural (sítios poluídos e não poluídos). São mostrados os valores médios da variação de fluorescência e o fator de crescimento durante o período de exposição ambiental.

Tempo no rio	Fluorescência - não poluído	Taxa de crescimento	Fluorescência - poluído	Taxa de crescimento
2 dias	364,9	3,8	631,4	4,1
4 dias	379,0	3,2	427,0	2,9
Média	371,9	3,5	529,2	3,5
C.V. (%)	12,9	13,4	23,2	19,2

Após a realização do teste de Tukey de comparação múltipla ($P \leq 0,05$), pode-se concluir que, em termos de emissão de fluorescência, as algas expostas ao sítio poluído cresceram de forma estatisticamente superior às algas do sítio não poluído. Para o mesmo sítio, não houve diferença estatisticamente significativa entre os dois períodos de exposição. Os coeficientes de variação apresentados são aceitáveis para um estudo de campo.

Quando se comparam as taxas de crescimento, não há diferença estatisticamente significativa entre os períodos de exposição no sítio não poluído. Já no sítio poluído, as algas expostas durante 2 dias cresceram de forma estatisticamente superior às algas que foram expostas durante 4 dias. As algas

expostas no sítio poluído durante 4 dias tiveram um fator de crescimento igual ao das algas expostas ao sítio não poluído.

Assim, as conclusões tiradas no estudo preliminar foram confirmadas neste outro estudo, *i.e.*, as algas do sítio poluído crescem bastante em um primeiro momento (2 dias de exposição), sendo que em seguida começam a diminuir o crescimento (4 dias de exposição), mas sem mostrar sinais de estarem sofrendo. Portanto, as algas imobilizadas podem ser usadas para avaliar o grau de trofia (quantidade de nutrientes) do meio aquático e se este contiver poluentes, com o passar do tempo haverá uma inibição no crescimento das algas expostas.

Outro fator muito importante observado nas algas, expostas aos sítios poluído e não poluído, foi o aspecto destas após o tempo de exposição no rio. Pudemos comparar o aspecto das algas imobilizadas que estavam em sítios diferentes, bem como com as amostras que estavam no laboratório. As observações quanto ao aspecto das algas são mostrados no Quadro 5.

Quadro 5: Aspecto das algas imobilizadas, quando colocadas no rio (sítio poluído e não poluído), em comparação às algas mantidas em (padrão).

Tempo no rio	Algas padrão (laboratório)	Algas no sítio poluído	Algas no sítio não poluído
2 dias	As esferas apresentavam volume constante, rigidez e coloração verde.	As esferas apresentavam maior volume, rigidez e estavam muito mais verdes.	As esferas apresentavam maior volume, rigidez e coloração verde.
4 dias	As esferas apresentavam volume constante, rigidez e coloração verde.	As esferas apresentavam maior volume, não tão rígidas e não tão verdes com muitas unidades se desintegrando. Aspecto geral ruim.	As esferas apresentavam maior volume, não tão rígidas coloração verde. Com algumas unidades se desintegrando. Aspecto geral satisfatório.
7 dias	As esferas apresentavam volume constante, rigidez e coloração verde.	As esferas apresentavam estar muito mais debilitadas em comparação aos dias anteriores. Aspecto geral muito ruim.	As esferas apresentavam estar muito mais debilitadas em comparação aos dias anteriores. Aspecto geral ruim.

Devido às observações do Quadro 5, foi realizada a comparação entre as imagens das algas expostas aos diferentes sítios e aquelas do laboratório no analisador de imagem Image-Pro Plus. Esse método mostrou os valores da área e da largura das algas nas diferentes situações de exposição, conforme a Tabela 11.

Esses resultados estão de acordo com as observações do Quadro 5 mostrando que as algas nos sítios poluído e não poluído apresentavam maior tamanho.

A comparação da coloração das algas pode ser observada na Figura 9, que evidencia maior intensidade da coloração verde, naquelas submetidas ao sítio poluído.

Tabela 11: Valores da área e largura das algas em diferentes sítios.

Tamanho (μm)	Não poluída	Poluída	Laboratório
Área	16,38	13,12	8,99
Largura	4,61	4,11	3,51

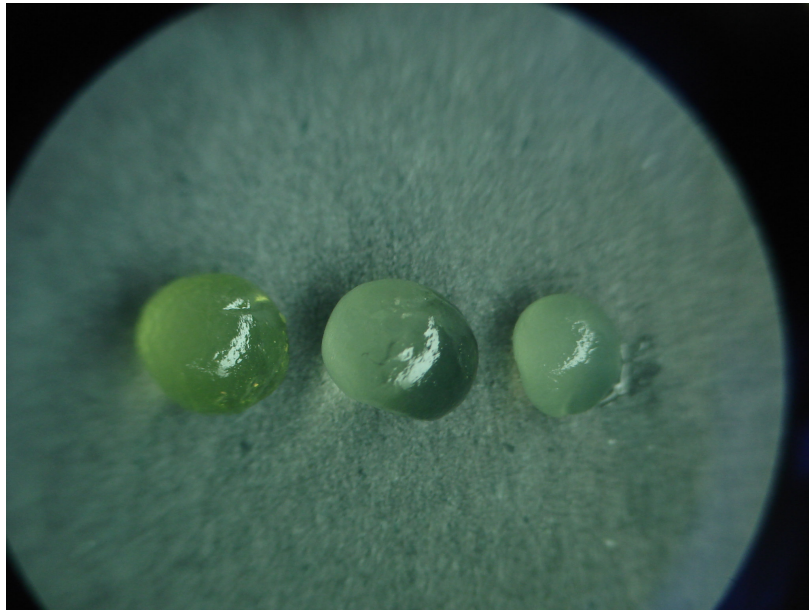


Figura 9: Imagem das algas apresentadas na seqüência (da esquerda para direita): alga no sítio poluído, alga no sítio não poluído e alga no laboratório.

4 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

O método fluorimétrico mostrou-se mais adequado para avaliar a contagem das algas visto que proporciona maior detectabilidade em relação aos outros métodos testados (absorbância e microscopia), facilitando assim a prática laboratorial. Mais especificamente, o nível de detectabilidade fluorimétrica foi 16 vezes maior que o método espectrofotométrico.

Duas concentrações de alginato de sódio poderiam ser escolhidas para imobilização, *i.e.*, 1% e 1,4%, já que as duas mantiveram um crescimento exponencial (e estatisticamente superior ao das algas frescas) após a desmobilização. A escolha foi feita pela concentração 1,4% levando-se em consideração a concentração que propiciou o maior crescimento das algas após a imobilização/desmobilização.

Para a escolha do agente desmobilizante deve-se observar o tipo de imobilizante utilizado. O estudo mostrou que, devido à alta viscosidade do alginato usado, não foi adequado utilizar os desmobilizantes polifosfato de sódio e diidrogênio fosfato de sódio já que, para esses desmobilizantes, o tempo e o volume utilizados foram maiores do que o volume e o tempo necessário para proceder à desmobilização com citrato de sódio 0,1 M.

Através dos testes de crescimento foi possível avaliar que o processo de imobilização/desmobilização não inibe o crescimento das algas mostrando propiciar um crescimento até maior comparado com o de algas frescas. Para melhor entender o motivo do aumento do crescimento das algas imobilizadas comparadas com as algas frescas estudos referentes à fisiologia das algas durante o processo de imobilização deverão ser realizados.

Os dados toxicológicos das algas que passaram pelo processo de imobilização/desmobilização frente aos tóxicos Gamit, Zinco e Carbofuran mostraram que estas algas tem sensibilidade muito parecida comparativamente às algas frescas que não passaram por este processo.

Os estudos preliminares da utilização das algas imobilizadas em testes de toxicidade em campo mostrou que esta técnica é viável em termos de sensibilidade, além de ser uma maneira rápida, barata, de fácil aplicação e muito mais representativa das condições reais comparada aos testes normais de laboratório.

De uma maneira global, o método de conservação de algas por imobilização diminui o risco de contaminação, uma vez que as repicagens semanais não são necessárias. Adicionalmente, o procedimento não afeta o crescimento das algas o que, do contrário, seria uma variável interveniente nos testes de toxicidade. Em termos econômicos, esta técnica de conservação proporciona a diminuição da necessidade de preparação de grandes quantidades de meio de cultura mostrando ser um meio fácil, barato e prático para manter culturas de algas.

Estudos posteriores para melhor quantificação do tempo em que as algas podem ficar imobilizadas deverão ser realizados. Desta maneira teremos uma melhor avaliação da qualidade do crescimento/sensibilidade das algas imobilizadas em diferentes períodos de tempo.

O estudo da fisiologia das algas durante o tempo de imobilização também é uma temática que poderá ser explorada em estudos futuros.

Os estudos de métodos/técnicas para o monitoramento da qualidade de rejeitos industriais e domésticos estão sempre em desenvolvimento, buscando sempre metodologias viáveis tecnicamente e que apresentem uma relação custo/benefício atraente para poderem ser largamente aplicáveis.

5 REFERÊNCIA BIBLIOGRAFICA

ABDEL-HAMID, M. I. Development and application of a simple procedure for toxicity testing using immobilized algae. **Wat. Sci. Tech.** **33**:129-138.1996.

ALFAYA, A. A. S.; KUBOTA, L. T. A utilização de materiais obtidos pelo processo de sol-gel na construção de biossensores. **Química Nova** **25**: 835-841.2002.

APHA, AWWA, WPCF. **Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater**. American Public Health Association, American Water Works Association and Water Pollution Control Federation, 19th ed., Section 8220, Washington, DC. 1995.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 12648** – Ecotoxicidade aquática – toxicidade crônica – Métodos de ensaio com algas (*chlorophyceae*).3. 2000.

AZEVEDO, F. A.; CHASIN, A. A. M. **As Bases Toxicológicas da Ecotoxicologia**. São Carlos: RiMa.4-5. 2003.

BALCÃO, V. M.; PAIVA, A. L.; MALCATA, F. X. Boreactors with immobilized lipase: state of the art. **Enzyme Microb. Technol.** **18**: 392-416.1996.

BENNETT, W. N. Assessment of selenium toxicity in algae using turbidostat culture. **Water Res.** **22**: 939 – 942. 1988.

BOZEMAN, J.; KOOPMAN, B.; BITTON, G. Toxicity testing using immobilized algae. **Aquatic Toxicology.** **14**: 345-352. 1989.

CESAR, A.; SILVA, S. R.; SANTOS, A. R. Testes de toxicidade aquática no controle de poluição. **Laboratório de ecotoxicologia da Universidade de Santa Cecília**. 4.ed.Santos:1997.

CHEN, Y. C. Immobilized microalga *Scenedesmus quadricauda* (chlorophyta, Chlorococcales) for long-term storage and for application in fish culture water quality control. **Aquaculture** **195.1-2**:71-80.2001.

CHEN, Y. C. immobilized *Isochrysis galbana* (Haptophyta) for long-term storage and applications for feed and water quality control in clam (*Meretrix lusoria*) cultures. **J. Appl. Phycol.** **15**:439-444.2003.

FERARD, J. F.; COSTAN, G.; BERMINGHAM, N.; BLAISE, C. Comparative assessment of effluents with the ceriodaphnia dubia and *Selenastrum capricornutum* chronic tests. **Communication faite au 2^{ème} Congrès SETAC**. Postdam (Germany), Europa. 21-24. 1992.

FERREIRA, C. M. Testes de toxicidade aquática para monitoramento ambiental. **Biológico**. v.65, n.1/2. São Paulo: 17-18.2003. Disponível em: www.aquicultura.br/analises_complementares.htm>(acesso dezembro 2005).

FISHER, N. S.; CARPENTER, E. J. ; RENSEM, C. C.; WURSTER, C. F. Effects of PCB on interspecific competition in natural and gnotobiotic phytoplankton communities in continuous and batch cultures. **Microb. Ecol.** 1: 39 – 50. 1974.

FRIEDLI, A. C. and SCHLAGER, I. R. Demonstrating Encapsulation and Release: A New Take on Alginate Complexation and the Nylon Rope Trick. **Journal of Chemical Education**. 82: (7) 1017-1020. 2005.

GEIS, S. W.; FLEMING, K. L.; KORTHALS, E. T.; SEARLE, G.; REYNOLDS, L.; KARNER, D. A. Modifications to the algal growth inhibition test for use as a regulatory assay. **Environ. Toxicol. Chem.**:19 36-41. 2000.

HERTZBERG, S. AND JENSEN, A. Studies of Alginate-Immobilized marine Microalgae. **Botanica Marina** 32: 267-273. 1989.

INTERNATIONAL STANDARD ORGANIZATION. **Water quality- Freshwater algal growth inhibition test with *Scenedesmus subspicatus* and *Selenastrum capricornutum***. International Standard 8692: 1989 (E). Genève, Switzerland.1989

JARDIM, G. M. **Estudos Ecotoxicológicos da Água e do Sedimento do Rio Corumbataí, S.P.** Dissertação (mestrado). Escola Superior de Agricultura “Luz de Queroz”. Piracicaba. S.P.. 2004.

JOUANY , J. M.; FERARD, J. F.; VASSEUR, P.; GEA, J.; TRUHAUT, R. ; RAST, C. Interest of dynamic testes in acute ecolotoxixity assessment in algae. **Ecotoxicol. Environ. Saf.** 7: 216 – 226. 1983.

KÄLLQVIST, T. Algal assay procedure (bottle test) at the Norwegian Institute for Water Research.- Nordic Symposium on algae assays in Water pollution research. **Nordforsk Publ.** 2: 5-7 . 1973.

KNIE, J. L. W. ; LOPES, E. W. B. **Testes Ecotoxicológicos: Métodos, Técnicas e Aplicações**. Florianópolis: FATMA/GTZ. 144-175. 2004.

LEISCHMAN, A.; GREENE, J.; MILLER, E. Bibliography of literature pertaining to the genus *Selenastrum*. **U.S. Environmental Protection Agency** . Rapport 600/ 9-79-021. 1-192. 1979.

LOMBARDI, J. V. Fundamentos de toxicologia aquática. Disponível em: http://www.aquicultura.br/conceitos_fundamentais.htm. acesso em: jan. 2006.

LUKAVSKÝ, j.; KOMÁREK, J.; LUKAVSKÁ, A.; LUDVÍK, J. and POKORNÝ, J. Metabolic activity and cell structure of immobilized algal cells (*Chlorella*, *Scenedesmus*). **Arch. Hydrobiol. Suppl.****73:2**.261-279. 1986.

MALLICK, N. Biotechnological potential of immobilized algae for wastewater N, P and metal removal: A review. **BioMetals** **15**: 377-390.2002.

MOREIRA-SANTOS, M.; GARRIDO-MORENO, I.; GONÇALVES, F. ;SOARES A. M. V. M.; RIBEIRO,R. An in Biossay for Estuarione Environments using the Microalga *Phaeodactylum tricornutum*. **Environ. Toxic. Chem.** **21**: 567-574. 2002.

MOREIRA-SANTOS, M.; SOARES, A. M. V. M.; RIBEIRO, R. A Phytoplankton groth assay for routile in situ environmental assessments. **Environ. Toxic. Chem.** **23**:1549-1560. 2004.

MOSSER, J. L.; FISCHER, N. S.; WURSTER, C. F. Polychlorinated biphenyls and DDT alter species composition in mixed cultures of algae. **Science** **176**: 533-535. 1972.

NIPPER, M. Avaliação de toxicidade com os copépodos calanóides *Acartia lilljeborgi* (Giesbrecht, 1892) e *Temora stylifera* (Dana, 1852).IN: NASCIMENTO, I. A.; SOUZA, E. C. P. M.; NIPPER, M. (editores).**Métodos em Ecotoxicologia Marinha: Aplicações no Brasil**. São Paulo. Editora Artes Gráficas e Indústria Ltda:141-149. 2002a.

NIPPER, M. Testes Estatísticos para a Análise de Resultados de Testes de Toxicidade com Amostras Líquidas e S edimentos. Capítulo XXI. IN: NASCIMENTO, I. A.; SOUZA, E. C. P. M.; NIPPER, M. (editores).**Métodos em Ecotoxicologia Marinha: Aplicações no Brasil**. São Paulo. Editora Artes Gráficas e Indústria Ltda:141-149. 2002b.

NYGAARD, G.; KOMAREK, J.; KRISTIANSEN, J.; SKULBERG, O. L. Taxonomic designations of the bioassay alga Niva-CHL1 (*Selenastrum capricornutum*) and some related strains. **Opera Botanica** **90**: 1-46. 1986.

NYHOLM, N. Response variable in algal growth inhibition tests – biomass or growth rate? **Water Res.** **19**: 273-279. 1985.

NYHOLM, N. & KALLQVIST. Methods for growth inhibition toxicity test with freshwater algae. **Environ. Toxic. Chem.** **8**: 689-703. 1989.

PARK, J. K. and CHANG, H. N. Microencapsulation of microbial cells. **Biotechnology Advances** **18**. 303-319. 2000.

PRADELLA, J. G. C. Reatores com células imobilizadas. IN: SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. (coord.). **Biotecnologia Industrial v.2**, 1.ed. Edgard Blücher Ltda: 355-359. 2001

PRIMEL, E. G.; ZANELLA, R.; KURZ, M. H. S.; GONÇALVES, F. F.; MACHADO, S. O.; MARCHEZAN, E. Poluição das águas por herbicidas utilizados no cultivo do arroz irrigado na região central do estado do Rio Grande do Sul, Brasil: Predição teórica e monitorada. **Química Nova** **28**:4, 605-609. 2005.

RADETSKI, C. M.; FERARD, J.; BLAISE, C. A. Semistatec microplate – based phytotoxicity test. **Environ. Toxic. Chem.** **14**: 299-302. 1995.

RESGALLA JR., C. & LAITANO, K. S. Sensibilidade dos organismos marinhos utilizados em testes de toxicidade no Brasil. **Notas Técnicas FACIMAR**, **6**: 153-163, 2002.

ROMO, S. & PÉREZ-MARTÍNEZ, C. The use of immobilization in alginate beads for long-term storage of *Pseudanabaena galeata* (cyanobacteria) in the laboratory. **J. Phycol.** **33**:1073-1076. 1997.

SCHÜÜRMAN, G. & MARKERT, B. A. **Ecotoxicology : ecological fundamentals, chemical exposure, and biological effects**. Wiley and Spektrum:1997.

SKULBERG, O. L. Algal cultures as a means to assess the fertilizing influence of pollution, 1. Int. Conf. Wat. Pollut. Res. 3, Munich. Water Pollution Control Federation ed. Washington D.C.: 113-127.1967.

SOUZA, E. C. P. M., **Métodos em Ecotoxicologia Marinha: Aplicações no Brasil**. São Paulo: Editora Artes Gráficas e Indústria Ltda., 9-15.2002.

TAM, N. F. Y. & WONG, Y. S. Effectt of immobilized microalgal bead concentrations on wastewater nutrient removal. **Environmental Pollution 107**: 145-151. 2000.

TAMPION, J. & TAMPION, M. D. **Immobilized cells: Principles and Applications**. Cambridge UK: Cambridge University Press. IN: MALLICK, N. Biotechnological potential of immobilized algae for wastewater N, P and metal removal: A review. **BioMetals 15**: 377-390.2002.

TAMPONNET, C.; CONSTANTINO, F., BARBOTIN, J. N.; CALVAYRAC, R. Cytological and physiological behaviour of *Euglena gracilis* cells entrapped in a calcium alginate gel. **Physiol. Planet. 63**: 277-283. 1985.

TURBAK, S. C.; OLSON, S. B.; MCFETERS, G. A. Comparison of algal assay systems for detercting waterborne herbicides and metals. **Water Res. 20**: 91-96. 1986.

VIDOTTI, E. C. And ROLLEMBERG, M. C. Algas:Da economia nos ambientes aquáticos à bioremediação e à química analítica. **Química Nova.27, 1**: 139 – 145.2004.

VILLENEUVE, P.; MUDERHWA, J. M.; GRAILLE, J.; HOSS, M. J.; **J. Mol. Catal. B: Enzym.9.113**. 2000.

VITOLO, M. Imobilização de enzima. IN: SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. (coord.). **Biotechnologia Industrial. Processos fermentativos e enzimáticos. v.3,1.ed.** Edgard Blücher Ltda: 355-359.2001.

ANEXOS

Anexo A: solução-estoque para preparo do meio de cultivo APHA.

Solução-estoque	Substância	mg/1000mL de água destilada	Quantidade para 1000mL de meio.
Macronutriente 1	CaCl ₂ .2H ₂ O	4,41	1mL
2	MgSO ₄ .7H ₂ O	14,7	1mL
3	NaHCO ₃	15	1mL
4	K ₂ HPO ₄	1,04	1mL
5	NaNO ₃	25,5	1mL
6	MgCl ₂	5,7	1mL
Micronutrientes 7*			0,4mL

Fonte: APHA (1999).

*Solução de micronutrientes

Substância	1000 mL de água destilada
Na ₂ – EDTA	300 µg
H ₃ BO ₃	186µg
CuCl ₂	0,009 µg
ZnCl ₂	3,27 µg
CoCl ₂	20,780 µg
MnCl ₂	264 µg
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	7,26 µg
FeCl ₃	96,0 µg

Anexo B: Valores da fluorescência para o crescimento *S. capricornutum* fresca, taxa de crescimento, desvio padrão e coeficiente de variação.

	Fluorescência inicial	Fluorescência final (72h)	Taxa de crescimento
	34,5	403,1	0,8194
	35,4	376,1	0,7877
	34,8	386,2	0,8022
	37,8	351,2	0,7430
	36,3	354,0	0,4591
Média	35,8	374,1	0,7823
Desvio padrão	± 1,3315	± 21,9079	± 0,0312
Coeficiente de variação	3,7193 %	5,8562 %	3,9827 %

Anexo C: Valores da fluorescência para o crescimento *S. capricornutum* imobilizada por um período de tempo de 60 dias, taxa de crescimento, desvio padrão e coeficiente de variação.

	Fluorescência inicial	Fluorescência final (72h)	Taxa de crescimento
	24,3	344,9	0,8842
	23,3	338,5	0,8920
	22,7	336,1	0,8983
	22,4	334,6	0,9013
	22,0	327,0	0,8996
Média	22,9	336,2	0,8951
Desvio padrão	± 0,8961	± 6,4844	± 0,007008
Coeficiente de variação	3,9131 %	1,9287 %	0,7830 %

Anexo D: Valores da fluorescência para o crescimento *S. capricornutum* imobilizada por um período de tempo de 110 dias, taxa de crescimento, desvio padrão e coeficiente de variação.

	Fluorescência inicial	Fluorescência final (72h)	Taxa de crescimento
	16,4	320,0	0,9903
	15,0	294,3	0,9921
	15,2	502,8	1,1662
	16,0	290,7	0,9666
	14,0	537,2	1,2158
	13,4	409,3	1,1397
Média	15,0	392,4	1,0784
Desvio padrão	± 1,1454	± 108,30	± 0,1077
Coeficiente de variação	7,6360 %	27,5994 %	9,9870%

Anexo E: Valores da fluorescência para o crescimento *S. capricornutum* imobilizada por um período de tempo de 150 dias, taxa de crescimento, desvio padrão e coeficiente de variação.

	Fluorescência inicial	Fluorescência final (72h)	Taxa de crescimento
	11,6	343,4	1,1293
	11,2	312,8	1,1099
	11,7	297,0	1,0780
	12,3	200,4	0,9302
	12,2	309,4	1,0777
Média	11,8	292,6	1,0650
Desvio padrão	± 0,4528	± 54,29	± 0,07849
Coeficiente de variação	3,8372 %	18,5543 %	7,3699 %

Anexo F: Valores da fluorescência para o crescimento *S. capricornutum* imobilizada por um período de tempo de 180 dias, taxa de crescimento, desvio padrão e coeficiente de variação

	Fluorescência inicial	Fluorescência final (72h)	Taxa de crescimento
	19,1	359,9	0,9787
	14,4	337,1	1,0510
	14,4	329,8	1,0437
	13,7	344,2	1,0746
	13,6	270,0	0,9961
	14,3	312,1	1,0277
Média	14,9	325,5	1,0286
Desvio padrão	± 2,0798	± 31,4512	± 0,03576
Coeficiente de variação	13,9584 %	9,6624 %	3,4766 %

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](#)