

**tese UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS  
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA**

**Dissertação de Mestrado**

**Avaliação da sensibilidade de *Raphidocelis subcapitata*  
(Chlorococcales, Chlorophyta) ao sulfato de cobre e sulfato  
de zinco através de testes de toxicidade crônica e  
determinação da densidade algal por espectrofotometria.**

**LÚCIA HELENA RIBEIRO RODRIGUES**

**Porto Alegre**

**2002**

**Universidade Federal do Rio Grande do Sul  
Instituto de Biociências  
Curso de Pós-graduação em Ecologia**

**AVALIAÇÃO DA SENSIBILIDADE DE *Raphidocelis  
subcapitata* (CHLOROCOCCALES, CHLOROPHYTA) AO  
SULFATO DE COBRE E SULFATO DE ZINCO ATRAVÉS DE  
TESTES DE TOXICIDADE CRÔNICA E DETERMINAÇÃO DA  
DENSIDADE ALGAL POR ESPECTROFOTOMETRIA.**

**Dissertação de Mestrado**

**LÚCIA HELENA RIBEIRO RODRIGUES**

**Porto Alegre**

**2002**

Avaliação da sensibilidade de *Raphidocelis subcapitata* (Chlorococcales, Chlorophyta) ao sulfato de cobre e sulfato de zinco através de testes de toxicidade crônica e determinação da densidade algal por espectrofotometria.

Lúcia Helena Ribeiro Rodrigues

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ecologia, do Instituto de Biociências da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ecologia.

Orientação: Profa. Dra. Maria Teresa Raya-Rodriguez  
Co-orientação: Msc. Alexandre Arenzon

Comissão examinadora:  
Dra. Catarina Pedrozo  
Profa. Dra. Maria Beatriz Bohrer-Morel  
Profa. Dra. Vera Maria Ferrão Vargas

Porto Alegre

2002

## AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul e ao Programa de Pós Graduação em Ecologia pelo apoio e infra estrutura.

À Professora Maria Teresa Raya-Rodriguez, pela orientação e confiança.

Ao Alexandre Arenzon, pelas sugestões e correções no decorrer da execução do trabalho.

Aos colegas e amigos do Laboratório de Ecotoxicologia da UFRGS: Nade Janara Coimbra, Marianna Pilla D’Incao, Carina Michele Portela, Carlos Eduardo Güntzel, Aline Beatrici, Régis Fontana, pelo apoio, carinho e compreensão nas horas em que deixei de estar presente.

À Lisiane Leal e Elisandra Cristiane pela dedicação e ajuda prestadas na parte química dos experimentos.

À Pesquisadora Lezilda Torgan pelo auxílio na identificação taxonômica de *Raphidocelis subcapitata*.

A todos os amigos e familiares que me estimularam, dividindo comigo as ansiedades e angústias desta etapa tão decisiva de desenvolvimento profissional e pessoal.

Ao meu marido, Nelson Fontoura, pela paciência, compreensão, amor; e pelas correções e sugestões dadas ao longo do trabalho.

## RESUMO

Testes de toxicidade crônica, analisando a inibição de crescimento algáceo após 96 horas, foram realizados a fim de conhecer a sensibilidade de *Raphidocelis subcapitata* (conhecida como *Selenastrum capricornutum*), ao sulfato de cobre ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ) e do sulfato de zinco ( $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ). A inibição do crescimento algal seguiu uma tendência exponencial negativa em função do aumento de concentração das duas substâncias, sendo descrita através das seguintes equações:  $y = 6257208,7 \cdot e^{-5,581 \cdot \text{Cu}}$ ;  $y = 7003223,1 \cdot e^{-5,452 \cdot \text{Zn}}$ , onde  $y$  é o número de células de *R. subcapitata* após 96 horas de exposição a diferentes concentrações de sulfato de cobre e sulfato de zinco, respectivamente. Valores de CE(I)50 demonstraram maior sensibilidade de *R. subcapitata* ao sulfato de cobre (CE(I)50;96h=0,154  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ) quando comparada com sulfato de zinco (CE(I)50;96h=0,215  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ). A densidade algácea foi determinada através de contagem celular e por técnica espectrofotométrica. Foi obtida uma curva de calibração para estimativa de densidade algácea correlacionando valores de absorvância e número de células por contagem, em 684 nm. A curva foi determinada através de um modelo empírico:  $y = 7,2578 \cdot 10^{-8} \cdot x^{1,0219}$  ( $n=130$ ;  $r^2=0,9998$ ); onde  $y$  é a medida de absorvância e  $x$  é o número de células. A análise de resíduos demonstrou que a equação pode ser utilizada até a densidades de 5.000.000 de células e valores de absorvância até 0,5.

## ABSTRACT

Chronic toxicity tests, analyzing algal growth inhibition after 96 hours, were made to measure the sensitivity of *Raphidocelis subcapitata* (formerly known as *Selenastrum capricornutum*) to copper sulfate ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ) and zinc sulfate ( $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ). Growth inhibition followed a negative exponential pattern as a function of increasing concentration of both substances, being described by the following equations:  $y = 6257208,7 \cdot e^{-5,581 \cdot \text{Cu}}$ ;  $y = 7003223,1 \cdot e^{-5,452 \cdot \text{Zn}}$ ; where  $y$  is the number of cells after 96 hours of cultures and **Cu** and **Zn** are concentrations ( $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ) of copper sulfate and zinc sulfate, respectively. CE(I)50 values demonstrate a greater sensitivity of *R. subcapitata* to copper (CE(I)50;96h=0,154  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ) in comparison to zinc (CE(I)50;96h=0,215  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ). Cell density was determined and estimated both by direct count and through an empirical function relating cell density to spectrophotometric absorbance at 684 nm:  $y = 7,2578 \cdot 10^{-8} \cdot x^{1,0219}$  ( $n=130$ ;  $r^2=0,9998$ ); where  $y$  is the measured absorbance and  $x$  is the number of cells. Residual analyses showed that the empirical function could be used (error less than 2,5%) with up to 5.000.000 cells or 0,5 of optical absorbance.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> - <i>Raphidocelis subcapitata</i> Korschikov em cultura mono específica.....	8
<b>Figura 2</b> - Número de células de <i>Raphidocelis subcapitata</i> após 96 horas de exposição a diferentes concentrações de sulfato de cobre. ....	24
<b>Figura 3</b> - Número de células de <i>Raphidocelis subcapitata</i> após 96 horas de exposição a diferentes concentrações de sulfato de zinco. ....	24
<b>Figura 4</b> - Varredura na distribuição espectral de 600 a 800 nm, evidenciando pico máximo de absorção, em 684 nm para <i>Raphidocelis subcapitata</i> . ....	28
<b>Figura 5</b> - Valores de absorbância observados em função do número de células algais de <i>Raphidocelis subcapitata</i> por mL, onde os pontos em preto representam os valores de leitura experimental e a linha contínua, os valores previstos pela equação potência ( $y=7,2578 \cdot 10^{-8} \cdot x^{1,0219}$ ; $n=130$ ; $r^2=0,9998$ ). ....	29
<b>Figura 6</b> - Distribuição dos desvios percentuais de valores de absorbância em função do número de células de <i>Raphidocelis subcapitata</i> ( $y=7,2578 \cdot 10^{-8} \cdot x^{1,0219}$ ). ....	30
<b>Figura 7</b> - Desvios percentuais da estimativa do número de células de <i>Raphidocelis subcapitata</i> em função de valores de absorbância ( $y=7,2578 \cdot 10^{-8} \cdot x^{1,0219}$ ). ....	31

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** - Parâmetros da equação de regressão do número de células em função da concentração de sulfato de cobre. ....25
- Tabela 2** - Concentração efetiva mediana, CE(I)50; 96h, de sulfato de cobre ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ) para *R. subcapitata*. ....25
- Tabela 3** - Parâmetros da equação de regressão do número de células em função da concentração de sulfato de zinco. ....26
- Tabela 4** - Concentração efetiva mediana, CE(I)50; 96h, de sulfato de zinco ( $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) para *R. subcapitata*. ....26

## LISTA DE APÊNDICES

<b>Apêndice 1</b> - Meio de cultura utilizado nos cultivos e testes com <i>Raphidocelis subcapitata</i> .....	50
<b>Apêndice 2</b> - Planilha de registro de dados de teste da avaliação da toxicidade do sulfato de cobre para <i>R. subcapitata</i> (Teste Preliminar) .....	52
<b>Apêndice 3</b> - Planilha de registro de dados de teste da avaliação da toxicidade do sulfato de cobre para <i>R. subcapitata</i> (Teste nº: 01) .....	53
<b>Apêndice 4</b> - Planilha de registro de dados de teste da avaliação da toxicidade do sulfato de cobre para <i>R. subcapitata</i> (Teste nº: 02) .....	54
<b>Apêndice 5</b> - Planilha de registro de dados de teste da avaliação da toxicidade do sulfato de cobre para <i>R. subcapitata</i> (Teste nº: 03) .....	55
<b>Apêndice 6</b> - Planilha de registro de dados de teste da avaliação da toxicidade do sulfato de cobre para <i>R. subcapitata</i> (Teste nº: 04) .....	56
<b>Apêndice 7</b> - Planilha de registro de dados de teste da avaliação da toxicidade do sulfato de cobre para <i>R. subcapitata</i> (Teste nº: 05) .....	57
<b>Apêndice 8</b> - Planilha de registro de dados de teste da avaliação da toxicidade do sulfato de cobre para <i>R. subcapitata</i> (Teste nº: 06) .....	58
<b>Apêndice 9</b> - Planilha de registro de dados de teste da avaliação da toxicidade do sulfato de zinco para <i>R. subcapitata</i> (Teste Preliminar) .....	59
<b>Apêndice 10</b> - Planilha de registro de dados de teste da avaliação da toxicidade do sulfato de zinco para <i>R. subcapitata</i> (Teste nº: 01) .....	60
<b>Apêndice 11</b> - Planilha de registro de dados de teste da avaliação da toxicidade do sulfato de zinco para <i>R. subcapitata</i> (Teste nº: 02) .....	61

<b>Apêndice 12</b> - Planilha de registro de dados de teste da avaliação da toxicidade do sulfato de zinco para <i>R. subcapitata</i> (Teste nº: 03) .....	62
<b>Apêndice 13</b> - Planilha de registro de dados de teste da avaliação da toxicidade do sulfato de zinco para <i>R. subcapitata</i> (Teste nº: 04) .....	63
<b>Apêndice 14</b> - Planilha de registro de dados de teste da avaliação da toxicidade do sulfato de zinco para <i>R. subcapitata</i> (Teste nº: 05) .....	64
<b>Apêndice 15</b> - Planilha de registro de dados de teste da avaliação da toxicidade do sulfato de zinco para <i>R. subcapitata</i> (Teste nº: 06) .....	65
<b>Apêndice 16</b> - Determinação da CE(I)50; 96 horas do sulfato de cobre para <i>R. subcapitata</i> , através do programa ICp (Teste nº: 1) .....	66
<b>Apêndice 17</b> - Determinação da CE(I)50; 96 horas do sulfato de cobre para <i>R. subcapitata</i> , através do programa ICp (Teste nº: 2) .....	67
<b>Apêndice 18</b> - Determinação da CE(I)50; 96 horas do sulfato de cobre para <i>R. subcapitata</i> , através do programa ICp (Teste nº: 3) .....	68
<b>Apêndice 19</b> - Determinação da CE(I)50; 96 horas do sulfato de cobre para <i>R. subcapitata</i> , através do programa ICp (Teste nº: 4) .....	69
<b>Apêndice 20</b> - Determinação da CE(I)50; 96 horas do sulfato de cobre para <i>R. subcapitata</i> , através do programa ICp (Teste nº: 5) .....	70
<b>Apêndice 21</b> - Determinação da CE(I)50; 96 horas do sulfato de cobre para <i>R. subcapitata</i> , através do programa ICp (Teste nº: 6) .....	71
<b>Apêndice 22</b> - Determinação da CE(I)50; 96 horas do sulfato de zinco para <i>R. subcapitata</i> , através do programa ICp (Teste nº: 1).....	72
<b>Apêndice 23</b> - Determinação da CE(I)50; 96 horas do sulfato de zinco para <i>R. subcapitata</i> , através do programa ICp (Teste nº: 2) .....	73

<b>Apêndice 24</b> - Determinação da CE(I)50; 96 horas do sulfato de zinco para <i>R. subcapitata</i> , através do programa ICp (Teste nº: 3) .....	74
<b>Apêndice 25</b> - Determinação da CE(I)50; 96 horas do sulfato de zinco para <i>R. subcapitata</i> , através do programa ICp (Teste nº: 4) .....	75
<b>Apêndice 26</b> - Determinação da CE(I)50; 96 horas do sulfato de zinco para <i>R. subcapitata</i> , através do programa ICp (Teste nº: 5) .....	76
<b>Apêndice 27</b> - Determinação da CE(I)50; 96 horas do sulfato de zinco para <i>R. subcapitata</i> , através do programa ICp (Teste nº: 6) .....	77
<b>Apêndice 28</b> - Planilha de registro de dados de teste da avaliação da toxicidade de amostras ambientais para <i>R. subcapitata</i> (Teste nº: 1) .....	78
<b>Apêndice 29</b> - Planilha de registro de dados de teste da avaliação da toxicidade de amostras ambientais para <i>R. subcapitata</i> (Teste nº: 2) .....	79
<b>Apêndice 30</b> - Planilha de registro de dados de teste da avaliação da toxicidade de amostras ambientais para <i>R. subcapitata</i> (Teste nº: 3) .....	80
<b>Apêndice 31</b> - Planilha de registro de dados de teste da avaliação da toxicidade de amostras ambientais para <i>R. subcapitata</i> (Teste nº: 4) .....	81
<b>Apêndice 32</b> - Planilha de registro de dados de teste da avaliação da toxicidade de amostras ambientais para <i>R. subcapitata</i> (Teste nº: 5) .....	82
<b>Apêndice 33</b> - Planilha de registro de dados de teste da avaliação da toxicidade de amostras ambientais para <i>R. subcapitata</i> (Teste nº: 6) .....	83
<b>Apêndice 34</b> - Planilha de registro de dados de teste da avaliação da toxicidade de amostras ambientais para <i>R. subcapitata</i> (Teste nº: 7) .....	84

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	1
2. OBJETIVOS.....	12
2.1. Geral .....	12
2.2. Específicos.....	12
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	13
3.1. Avaliação da sensibilidade de <i>Raphidocelis subcapitata</i> ao sulfato de cobre e sulfato de zinco e definição das faixas de sensibilidade .....	13
3.2. Determinação da densidade de <i>Raphidocelis subcapitata</i> através de espectrofotometria .....	19
4. RESULTADOS.....	23
4.1. Avaliação da sensibilidade de <i>Raphidocelis subcapitata</i> ao sulfato de cobre e sulfato de zinco e definição das faixas de sensibilidade .....	23
4.2. Determinação da densidade de <i>Raphidocelis subcapitata</i> através de espectrofotometria .....	27
5. DISCUSSÃO.....	32
6. CONCLUSÕES.....	43
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	44
8. APÊNDICES .....	50

## 1. INTRODUÇÃO

Testes de toxicidade são métodos utilizados na detecção e avaliação da capacidade inerente de um agente em produzir efeitos deletérios nos organismos vivos. Consistem na exposição de organismos padronizados a diferentes concentrações de substâncias químicas, compostos químicos, efluentes ou água, por um determinado período de tempo (GHERARDI-GOLDSTEIN *et al.*, 1990).

A utilização de testes de caráter ecotoxicológico, que venham a dar informações quanto ao efeito tóxico causado em ecossistemas por substâncias químicas nele presentes, torna-se cada dia mais importante nas avaliações de impacto ambiental (RAYA-RODRIGUEZ, 2000). Deste modo, a realização de testes de toxicidade tem sido incluída em programas de monitoramento, constituindo uma das análises indispensáveis no controle de fontes de poluição (CETESB, 1990).

Programas de monitoramento são importantes em avaliações de impacto ambiental, pois fornecem informações relevantes a respeito da extensão da poluição, do impacto ambiental provável e da deterioração ou da melhoria gerada numa escala temporal e espacial; permitem avaliar a eficiência de ações mitigadoras adotadas com o propósito de reduzir ou eliminar a origem da contaminação e podem ser utilizados na avaliação de normas ou guias que estejam em vigor, elaborados com fins de proteção ambiental (RAYA-RODRIGUEZ, 2000).

O monitoramento tradicionalmente realizado com a avaliação de parâmetros físicos e químicos, pode ser complementado com o biomonitoramento. Os parâmetros biológicos fornecem informações sobre as respostas dos organismos frente a modificações ambientais. Neste sentido, vários são os autores que têm apontado para a necessidade da inclusão do monitoramento biológico para uma real avaliação da qualidade ambiental (BOUDOU & RIBEYRE, 1989; FERNANDES, 1989; ELDER, 1990; FOWLER & AGUIAR, 1991; ARAÚJO, 1995).

As verificações de efeitos, portanto, ocupam uma posição central na estratégia de conservação dos ecossistemas. Para ARNDT *et al.* (1995) entre as ferramentas mais apropriadas para estas observações, estão os bioindicadores, cujo uso já era conhecido no século passado (GRINDON, 1859), mas que apenas nos últimos 25 anos alcançaram o estágio de desenvolvimento necessário para seu uso rotineiro. No campo da ecotoxicologia, entende-se por bioindicadores “ organismos ou comunidades de organismos que reagem à poluição com modificação de suas funções vitais normais, ou que são capazes de acumular poluentes” (ARNDT *et al.*, 1987; ARNDT & SCHWEIZER, 1991).

Segundo RAYA-RODRIGUEZ (2000), os organismos bioindicadores apresentam-se com três tipos possíveis de utilização em programas de monitoramento de impacto ambiental. Os organismos indicadores são definidos como os indivíduos ou comunidades que podem fornecer informações sobre as condições de um ecossistema frente à presença de impacto ambiental. Geralmente, neste caso, não é possível quantificar dados

numéricos a partir da utilização destes organismos ou extrair deles conclusões seguras sobre os níveis de poluentes presentes no ambiente. Sua utilização fundamenta-se na indicação espontânea das condições ambientais com a obtenção de uma resposta qualitativa. Já os organismos teste são definidos como indivíduos padronizados e cultivados em laboratório que podem fornecer informações numéricas sobre as condições de um ecossistema frente à presença de impacto ambiental. Sua utilização fundamenta-se na exposição controlada destes organismos às condições ambientais com a obtenção de uma resposta quantitativa. Existem ainda os organismos monitores, que incluem todos os organismos vivos que são utilizados para o monitoramento qualitativo e quantitativo dos níveis de poluição no ambiente e seus efeitos tóxicos nos ecossistemas.

Desta maneira, a utilização de bioindicadores em programas de monitoramento ambiental leva a dois tipos de informação adquirida: a qualitativa e a quantitativa, surgindo, então, dois tipos de monitoramento. O biomonitoramento passivo prevê a utilização de organismos-indicadores naturalmente presentes no ambiente em estudo, mais caracterizado como bioindicação. No biomonitoramento ativo ocorre a utilização de organismos-teste introduzidos e expostos ao impacto ambiental a ser avaliado (RAYA-RODRIGUEZ, 2000).

Diante disso, a realização de testes de toxicidade permite uma avaliação quantitativa e qualitativa dos efeitos tóxicos de diferentes poluentes e compostos tóxicos sobre os organismos aquáticos. A partir dos resultados obtidos neste tipo de teste, é possível estimar a concentração

mínima que não causa efeito tóxico aos organismos, o que permite estabelecer limites aceitáveis para determinados poluentes. Desta maneira, os testes de toxicidade têm sido desenvolvidos para fornecer informações diretas sobre a resposta de organismos frente a situações de estresse provocadas por degradação da qualidade ambiental.

A exposição de um organismo no ambiente natural a um agente poluente pode acontecer de maneira rápida e severa, como nos casos de derramamento de substâncias, ou a um estímulo contínuo, que pode envolver parte ou todo o seu ciclo de vida, como no caso de descarte de efluentes (RAND & PETROCELLI, 1985).

Em laboratório, é possível simular estas situações ambientais através de testes para avaliação da toxicidade aguda, onde o organismo é exposto a concentrações elevadas de um agente tóxico por um período curto de tempo em relação ao seu ciclo de vida. Se o objetivo é expor um organismo a baixas concentrações de um agente tóxico por um longo período de tempo, envolvendo uma parte significativa de seu ciclo de vida ou até mesmo várias gerações, são recomendados testes para a avaliação da toxicidade crônica.

A classificação dos testes de toxicidade em agudo e crônico está, portanto, relacionada com o ciclo de vida do organismo-teste e com o tempo de exposição dos organismos à amostra durante o teste. Em um teste agudo o efeito está geralmente associado a morte ou imobilidade do organismo. Para avaliar este tipo de efeito, em geral, utiliza-se a concentração letal ou concentração efetiva que causou morte ou imobilidade a 50% dos

organismos, representada, respectivamente, por CL(I)50 ou CE(I)50 (RAND & PETROCELLI, 1985).

No teste crônico, os efeitos nem sempre estão associados a mortalidade, relacionando-se a outros aspectos da biologia do organismo, tais como inibição do crescimento e alterações no comportamento. De modo geral, porém não exclusivo, esses efeitos são subletais e são observados em situações em que as concentrações do agente tóxico permitem a sobrevivência do organismo. Os resultados no teste crônico podem ser expressos como CENO e CEO que são, respectivamente, a maior concentração de amostra que não causa efeito deletério e a menor concentração que causa efeito deletério estatisticamente significativos sobre os organismos (RAND & PETROCELLI, 1985). Podem, também expressar a concentração efetiva que inibiu 50% do crescimento dos organismos, como nos testes com algas, sendo expressos, então, em CE(I)50 (ABNT, 1992; CETESB, 1992; EPA, 1994; EATON *et al.*, 1995). Com relação a isto, FABER *et al.* (1997) comentam que em bioensaios algais baseados em respostas fotossintéticas de curta duração para compostos tóxicos, é conveniente a determinação da concentração efetiva mediana (CE(I)50). Os autores consideram que os valores de CE(I)50, usualmente, referem-se a inibição de crescimento algácea em bioensaios e são excelentes descritores de impacto que compostos tóxicos podem ter numa população algal.

É importante considerar que ao se trabalhar com algas, deve-se levar em consideração que estes organismos são muito sensíveis a alterações no

ambiente e que seu crescimento pode ser facilmente inibido ou acelerado pela presença de diferentes substâncias químicas (PARRISH, 1985).

Quanto às espécies utilizadas como organismos-teste existem ainda critérios a serem observados para a obtenção de resultados significativos. Os organismos-teste devem ser escolhidos de acordo com a disponibilidade no ambiente, representatividade ecológica, facilidade de cultivo, faixa de sensibilidade determinada para alguma substância de referência e conhecimento de sua biologia (RAND & PETROCELLI, 1985).

Dentre os organismos mais recomendados para testes de avaliação da toxicidade aquática estão as algas, pois são produtores primários dominantes na cadeia alimentar no ambiente aquático (PFLEEGER *et al.*, 1991).

Estudos com fitoplâncton, indicam que as algas apresentam uma rápida resposta fisiológica, e, assim, efeitos deletérios provocados por compostos tóxicos podem ser detectados num curto período de tempo (SICKO-GOAD & STOERMER, 1988). Para HELLAWELL (1986) as algas podem ser utilizadas como monitores biológicos de qualidade de água e como espécies indicadoras na avaliação de impacto ambiental de poluentes. De acordo com LEWIS (1990), algas e macrófitas são mais sensíveis que invertebrados e peixes para vários tipos de detergentes surfactantes, efluentes têxteis, tintas, combustíveis sintéticos, herbicidas e uma variedade de outros compostos fitotóxicos. Outros estudos indicam ainda, que as algas têm se mostrado sensíveis para um amplo espectro de contaminantes incluindo metais (BARTLETT *et al.*, 1974; GREENE *et al.*, 1988; HICKEY *et*

*al.*, 1991), insetidas organoclorados (THOMAS *et al.*,1986) e orgânicos industriais (KLAINE & LEWIS, 1995). KLAINE & LEWIS (1995), verificaram em seus trabalhos que plantas aquáticas são mais sensíveis para um variado espectro de produtos químicos, quando comparadas com espécies de fauna. SOSAK-SWIDERSKA *et al.* (1998) consideram os testes com algas como geralmente sensíveis e eficazes, sendo as algas um grupo de organismos importante ecologicamente.

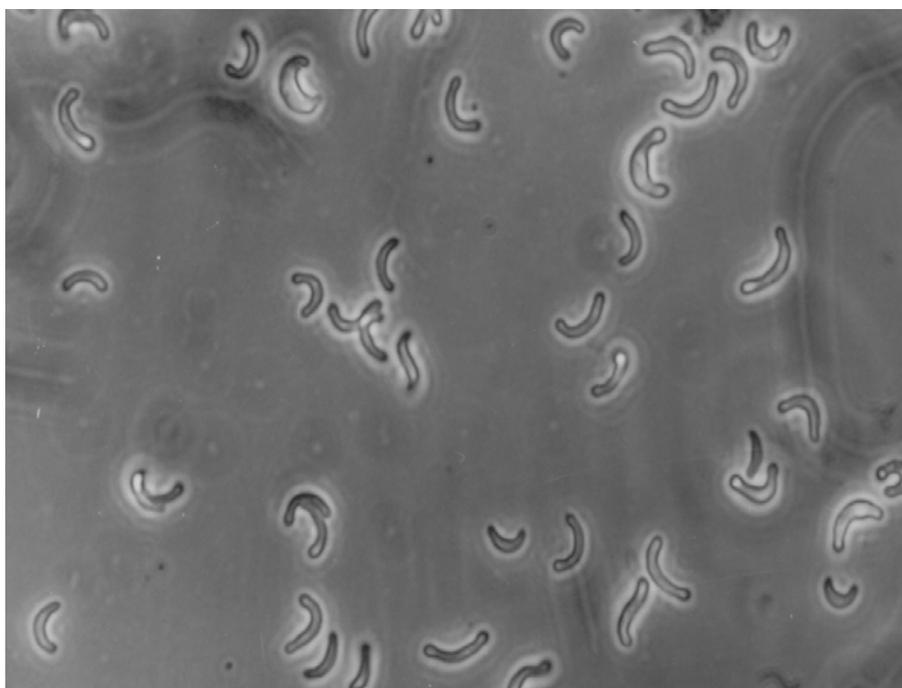
Desta maneira, devido a sua grande importância, as algas são muito utilizadas em estudos de bioindicação e em ecotoxicologia aquática, onde têm sido empregadas na avaliação da qualidade de corpos d'água e em testes com substâncias químicas (ASTM, 1981; IBAMA, 1990; CETESB, 1992).

Assim, quando se pretende utilizar uma espécie de alga para avaliar o efeito de agentes tóxicos, sua sensibilidade deve ser bem conhecida. LEWIS (1993) ressalta, ainda, que a sensibilidade de diferentes algas expostas a uma mesma substância química é muito variável. Por este motivo, a escolha da espécie de alga a ser utilizada em testes de toxicidade deve estar intimamente relacionada a sua sensibilidade.

Segundo EATON *et al.* (1995), várias espécies de microalgas têm sido utilizadas em testes de ecotoxicidade, nos quais é avaliado o potencial tóxico de efluentes industriais e substâncias específicas presentes na amostra.

*Raphidocelis subcapitata* Korschikov (figura 1) pertence a Ordem Chlorococcales, Divisão Chlorophyta (NYGAARD *et al.*, 1986). A espécie é,

provavelmente, cosmopolita e comum de ocorrer em ambientes mesotróficos a eutróficos (TORGAN, 2002). É uma alga unicelular muito recomendada para uso em testes de toxicidade (PARRISH, 1985; NYGAARD *et al.*, 1986; EPA, 1989; CETESB, 1992; COONEY, 1995; MAYER *et al.*, 1998). Esta espécie ainda é denominada por alguns centros de cultivo como “*Selenastrum capricornutum*”. É importante mencionar que *Ankistrodesmus subcapitatus* Korschikov e *Kirchneriella subcapitata* Korschikov constituem-se sinônimos de *Raphidocelis subcapitata*, segundo COMAS (1966); e HINDÁK (1988) considera esta espécie como *Kirchneria subcapitata* (Korsikov) Hindák.



**Figura 1:** *Raphidocelis subcapitata* Korschikov em cultura monoespecífica. Os indivíduos observados em cultivo apresentaram 7 a 10  $\mu\text{m}$  de comprimento; 3,0-6,0 e 9,0  $\mu\text{m}$  de distância entre os ápices e 1,0 a 2,0  $\mu\text{m}$  de largura (fotografia e medidas de TORGAN, 2002).

Alguns estudos têm sido feitos sobre a sensibilidade de espécies de algas para a toxicidade de herbicidas, metais e outros compostos tóxicos. Entre eles destacam-se os trabalhos de FAIRCHILD *et al.* (1998) que compararam a sensibilidade de espécies de algas, dentre elas, *R. subcapitata*, e de macrófitas para diferentes herbicidas. BAUN *et al.* (1998) realizaram bioensaios utilizando *R. subcapitata* e *Daphnia magna*, a fim de verificar qual o organismo que apresentava maior sensibilidade aos herbicidas testados. Com relação aos estudos desenvolvidos por ROJÍCKOVÁ-PADRTOVÁ & MARSÁLEK (1999), comparando a sensibilidade de espécies de algas a diferentes metais e herbicidas, *R. subcapitata* demonstrou ser a espécie mais sensível das algas testadas.

Testes de sensibilidade têm como objetivo verificar a qualidade das culturas de organismos a serem submetidas a testes de toxicidade. Existem vários critérios que podem ser considerados para determinar a qualidade dos organismos de uma cultura zooplantônica. EPA (1975) identifica uma cultura saudável de *Daphnia similis* e *Ceriodaphnia dubia* através da ausência de ovos efipiais. GOULDEN & HORNING (1980) salientam a quantidade de lipídios armazenados nas fêmeas, quando não estão grávidas. Também, os organismos de um cultivo, de diferentes níveis tróficos, estarão aptos para serem submetidos testes de avaliação de toxicidade, se estiverem dentro de uma faixa de sensibilidade específica para uma substância de referência. Para a utilização de algas em testes de toxicidade, não existem critérios bem determinados para verificar a qualidade dos cultivos. Em geral, a coloração e a capacidade de reproduzir-

se de maneira constante e homogênea indicam que uma cultura algácea está apta a ser submetida a testes de toxicidade. Para cada organismo, deve ser adotada a substância que apresenta maior efeito tóxico e menor variabilidade de resultado (EPA, 1989).

Várias substâncias são indicadas para serem utilizadas como substância de referência, entre elas sulfato de cobre ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ), cloreto de cádmio ( $\text{CdCl}_2$ ), cloreto de potássio (KCl), sulfato de zinco ( $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ), dodecil sulfato de sódio ( $\text{C}_{12}\text{H}_{25}\text{NaSO}_4$ ), cloreto de sódio (NaCl) e dicromato de potássio ( $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ ) (EPA, 1989; LEWIS, 1995).

Neste contexto, a definição da faixa de sensibilidade de *R. subcapitata* frente a substâncias de referência é de fundamental importância no controle de qualidade de culturas, através da avaliação das condições fisiológicas ou da “saúde” dos organismos utilizados em testes de toxicidade.

Conforme MITTENZWEY *et al.* (1992), a quantificação do fitoplâncton é, via de regra, determinada através da mensuração de massa e volume, contagem celular ou análise de pigmentos. Entretanto, estes métodos são muito trabalhosos. Os métodos colorimétricos, como o espectrofotométrico, são mais práticos e permitem mensurar opticamente partículas em suspensão, como as células algais. A principal vantagem dos métodos colorimétrico e espectrofotométrico é que eles fornecem meios simples para a determinação de quantidades diminutas de substâncias.

August Beer, em 1852, estudando a influência da concentração de soluções coloridas sobre a transmissão da luz, definiu a lei fundamental da

absorciometria, conhecida como a Lei de Beer. Esta lei permite estabelecer a relação entre a absorbância e a concentração da espécie absorvente.

Beer estabeleceu, ainda, uma relação linear entre absorbância e a concentração. Portanto, mantendo-se o caminho óptico constante, pode-se determinar a concentração de uma espécie em solução através da medida de absorbância.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. GERAL

Avaliar a utilização da alga clorofícea *Raphidocelis subcapitata* como organismo-teste, sensível a impactos ambientais em ecossistemas aquáticos.

### 2.2. ESPECÍFICOS

1. Avaliar a toxicidade do sulfato do cobre e do sulfato de zinco para *R. subcapitata*.

2. Determinar faixas de sensibilidade de *R. subcapitata* ao sulfato de cobre e ao sulfato de zinco, como instrumento de avaliação da qualidade dos cultivos e testes algáceos.

3. Propor um modelo de regressão com vistas a determinar a densidade de *R. subcapitata* por espectrofotometria.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. Avaliação da sensibilidade de *Raphidocelis subcapitata* ao sulfato de cobre e sulfato de zinco e definição das faixas de sensibilidade

Visando conhecer a toxicidade do sulfato de cobre ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ) e do sulfato de zinco ( $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) para *R. subcapitata*, foram realizados testes de toxicidade crônica com esta espécie, baseado na norma EPA 1.003 (EPA, 1994). Este método permite avaliar os efeitos tóxicos de efluentes, substâncias químicas solúveis em água e amostras ambientais sobre o crescimento de uma cultura específica de algas cultivada em laboratório. A cepa utilizada neste estudo foi proveniente da Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental (CETESB), e o meio líquido de cultura, conforme recomendado por IBAMA (1990) e CETESB (1992), para cultivo de microalgas unicelulares de água doce é o L.C. Oligo. O preparo do meio L.C. Oligo está descrito no Apêndice 1.

Os testes realizados consistem na exposição de uma cultura algácea, em fase exponencial de crescimento, a diferentes concentrações de agentes químicos por um período de 96 horas, sob condições específicas de temperatura, intensidade luminosa e agitação. Os experimentos foram realizados no Laboratório de Ecotoxicologia do Centro de Ecologia da UFRGS.

Em todos os testes realizados o parâmetro considerado para determinação da toxicidade foi a inibição de crescimento algáceo. A partir

dos resultados de crescimento de *R. subcapitata* obtidos nos testes com as substâncias de referência, foram determinadas as faixas de sensibilidade, a partir do cálculo da concentração efetiva que inibiu 50% do crescimento da cultura algal, CE(I)50; 96h. Os limites superior e inferior das faixas foram estabelecidos pelo limite de 2,571 desvios padrões em relação aos valores médios obtidos para cada teste realizado ( $GL = 5$ ;  $t_{0,05} = 2,571$ ), utilizando-se a distribuição  $t$ , conforme recomendado por ZAR (1999).

Antes da realização dos testes propriamente ditos, é necessário que se prepare o inóculo algal a ser utilizado no teste. Para manter-se um estoque de algas por mais tempo isento de contaminação, foram utilizados cultivos em meio sólido (ágar), a partir do qual foram retiradas cepas para o preparo do inóculo para os testes.

A cultura algácea mantida em meio sólido foi removida com auxílio de uma alça de platina e inoculada em 100mL de meio de cultura L.C. Oligo, que foi previamente autoclavado, a 121°C por 15 min, sendo a transferência da alga realizada em capela de fluxo laminar.

Após o preparo do inóculo no meio de cultivo, a cultura algácea foi mantida em incubação por um período de sete a dez dias, em mesa de agitação contínua de 100 rpm, temperatura de 25°C ( $\pm 2^\circ\text{C}$ ), e iluminação constante de 3.500 lux. Após este período, a nova cultura foi utilizada como inóculo na montagem do teste, encontrando-se, para isto, em fase exponencial de crescimento.

Após a determinação da densidade de células, realizada através do método de contagem celular em câmara de Neubauer (McATEER & DAVIS,

1994), sob microscópio óptico Zeiss, foi possível calcular o volume de inóculo a ser adicionado nos frascos-teste. ASTM (1981), recomenda que o volume inoculado deve ser aproximadamente 1,0 mL, com uma concentração inicial entre  $1 \times 10^4$  e  $1 \times 10^5$  células.mL<sup>-1</sup>. A quantidade de inóculo a ser adicionada à amostra foi calculado da seguinte forma:

$$V_1 = C_2 \times V_2 / C_1$$

Onde :

$C_1$  = concentração do inóculo;

$V_1$  = volume necessário;

$C_2$  = concentração necessária no frasco-teste ( de  $1 \times 10^4$  a  $1 \times 10^5$ );

$V_2$  = volume de meio no frasco de cultivo.

Após calcular o volume de inóculo a ser adicionado nos frascos-teste, foram realizados os testes para avaliação da toxicidade crônica.

Inicialmente, foram realizados testes preliminares com o objetivo de estabelecer o intervalo de concentrações a serem utilizados para o preparo das soluções-teste para os testes definitivos. Os testes foram realizados em erlenmayers de 250 mL, com volume final de 100 mL.

No teste preliminar com sulfato de cobre foram utilizadas as concentrações 0,03; 0,1; 0,3 e 0,5 mg.L<sup>-1</sup> de CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O e com sulfato de zinco foram utilizadas as concentrações 0,01; 0,1; 1,0 e 2,0 mg.L<sup>-1</sup> de ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O.

A partir do resultado obtido nestes testes, preparou-se uma série de seis concentrações intermediárias, que foram as soluções-teste.

Em seguida, foram realizados os testes definitivos, em frascos-teste do tipo erlenmeyers de 250 mL, previamente autoclavados, com volume final de 100 mL, considerando que MILLER (1977) recomenda que em cultivos e testes com algas o volume máximo de líquido no frasco não deve exceder 50% da capacidade do mesmo.

Em todos os testes foram utilizadas seis concentrações-teste mais um controle, sendo que a concentração controle constituiu-se do próprio meio de cultivo. Tanto os frascos das concentrações-teste, quanto o grupo controle apresentavam quatro réplicas.

Nos seis testes com sulfato de cobre foram utilizadas as concentrações 0,03; 0,05; 0,08; 0,1; 0,2 e 0,3 mg.L<sup>-1</sup> de CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O e nos seis testes com sulfato de zinco as concentrações utilizadas foram 0,05; 0,08; 0,1; 0,2; 0,3, e 0,5 mg.L<sup>-1</sup> de ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O.

As soluções de sulfato de cobre e sulfato de zinco, utilizadas nos testes de sensibilidade algácea foram preparadas no momento da montagem dos testes e a diluição das concentrações testadas foi feita utilizando-se o próprio meio de cultivo algal.

A montagem dos testes foi realizada adicionando-se 1 mL de inóculo na concentração  $1 \times 10^7$  células.mL<sup>-1</sup> nos frascos-teste, a fim de obter-se a concentração de  $1 \times 10^5$  células em um volume final de 100 mL de solução-teste. Tanto o inóculo, quanto o meio de diluição e a solução-teste estavam

a 25°C ( $\pm$  2°C) no momento da montagem, a fim de não alterar as condições da cultura algácea.

A montagem dos experimentos ocorreu em capela de fluxo laminar, a fim de manter a cultura isenta de contaminação. Após receber o inóculo, os frascos-teste foram agitados para homogeneização das soluções-teste e fechados com tampões de algodão envoltos por gaze, que foram previamente autoclavados juntamente com os frascos que seriam utilizados no teste.

Por fim, os frascos foram distribuídos aleatoriamente na mesa agitadora, sendo as posições alteradas diariamente, de modo a diminuir possíveis diferenças de luminosidade e temperatura no crescimento das algas.

Os testes foram manipulados em condições assépticas, com temperatura controlada em 25°C ( $\pm$  2°C), sob agitação contínua de 100 rpm em mesa agitadora e iluminação permanente de 3.500 lux, por um período de 96 horas.

Ao final das 96 horas do início dos testes, os frascos foram removidos da mesa de agitação e transferidos para frascos devidamente identificados. Para que as amostras se conservassem e não continuassem a crescer retirou-se uma alíquota de 5 mL de cada amostra e foi adicionado 1 mL da solução de lugol em cada um dos frascos, sendo que estes foram mantidos sob refrigeração, a 4°C até o momento da contagem.

Após as 96 horas da duração dos testes, foram realizados testes complementares, de sete a dez dias de duração, para verificar quais as

concentrações que apenas inibiram o crescimento algáceo e quais exerceram efeito letal. Para isto foram retiradas e reinoculadas alíquotas do controle e dos frascos em que o efeito observado de inibição foi maior. Se após o período de incubação fosse observado crescimento algáceo, o efeito era considerado algistático. No caso de não ser observado crescimento nos frascos-teste, o efeito era considerado algicida.

A contagem para determinação da concentração algácea final foi efetuada em todas as amostras, retirando-se uma alíquota de 5 mL de cada réplica de cada concentração e contando-se o número de algas existentes, em câmara de Neubauer (McATEER & DAVIS, 1994), sob microscópio óptico Zeiss.

A partir da contagem, foi possível calcular a concentração de células na cultura, da seguinte forma:

$$N = (A + B) / 2 \times 10^4$$

Onde:

N = número de células por mL<sup>-1</sup>;

A = número total de células contadas no lado “A” da lâmina;

B = número total de células contadas no lado “B” da lâmina.

Nos testes realizados com as substâncias de referência, foram determinados os parâmetros das equações de regressão do número de células em função das concentrações de sulfato de cobre e sulfato de zinco,

através do modelo exponencial, empregado para descrever fenômenos com taxas instantâneas constantes de aumento ou diminuição, conforme equação que segue:

$$y = a \cdot e^{b \cdot x}$$

Onde:

$y$  = número de células.mL<sup>-1</sup> após 96 horas de crescimento algáceo;

$e$  = base dos logaritmos naturais;

$a$ ;  $b$  = parâmetros da função exponencial;

$x$  = concentração de sulfato de cobre ou sulfato de zinco.

Os resultados dos testes com substâncias de referência foram expressos em CE(I)50; 96h, que representa a concentração efetiva que inibiu 50% do crescimento algal, através do programa computacional ICp (NORBERG-KING, 1993).

### **3.2. Determinação da densidade de *Raphidocelis subcapitata* através de espectrofotometria**

Para determinar o crescimento algáceo em testes ecotoxicológicos, através de espectrofotometria, foram utilizados testes de toxicidade crônica com *R. subcapitata*, utilizando amostras ambientais de água superficial e subterrânea, rotineiramente realizados no Laboratório de Ecotoxicologia do

Centro de Ecologia da UFRGS, bem como os testes realizados com as substâncias de referência descritos neste trabalho.

A metodologia utilizada nos testes com amostras ambientais foi basicamente a mesma utilizada nos testes realizados com as substâncias de referência, descritas anteriormente, como o preparo do inóculo algáceo para o teste, a montagem e as condições de realização dos experimentos.

Especificações metodológicas referem-se ao preparo de amostras utilizadas. As amostras ambientais foram filtradas em laboratório com o auxílio de uma membrana de acetato de celulose com porosidade de  $0,22\mu\text{m}$ . A fim de eliminar-se a falta de nutrientes nas amostras, foi adicionado à amostra a mesma quantidade de nutrientes utilizados na preparação do meio de cultivo. Desta maneira, os tratamentos e o controle tiveram a mesma quantidade de nutrientes, estando, então a inibição do crescimento algáceo relacionada à toxicidade da amostra.

A preparação da amostra seguiu o mesmo procedimento de preparo que o meio de cultivo, quanto à adição dos nutrientes, porém ao invés de utilizar água destilada para a diluição, foi utilizada a própria amostra. Após a adição dos nutrientes, a amostra foi agitada por uma hora, mas não foi autoclavado, pois este processo poderia alterar as suas características.

A determinação da concentração algácea foi realizada, inicialmente, da mesma maneira descrita anteriormente, utilizando câmara de Neubauer. Em seguida, a concentração final dos ensaios foi determinada pela medida de absorbância.

Os padrões de equivalência do número de células e dos valores de absorvância, foram definidos através da quantificação do número de células em câmara de contagem e da leitura da absorvância da amostra, sendo que quanto maior a concentração de partículas em suspensão, maior a quantidade de luz absorvida, e conseqüentemente, maior o valor da absorvância.

Desta forma, para se realizar uma análise espectrofotométrica adequada, é necessário conhecer o espectro de absorção da amostra que se quer determinar. Isto é feito para se definir qual o comprimento de onda da radiação incidente que causará o máximo de absorção pela espécie a ser determinada e, assim obter-se a melhor sensibilidade na sua quantificação.

No método espectrofotométrico a leitura da absorvância em espectrofotômetro, utiliza um comprimento de onda específico para cada espécie utilizada como organismo-teste. Portanto, a determinação do comprimento de onda foi efetuada através da observação do maior valor de leitura dentro de uma faixa de 600 a 800 nm.

As leituras dos valores de absorvância foram efetuadas em todas as amostras, sem qualquer preservação, imediatamente após a retirada de uma alíquota de cada amostra e transferência desta para a cubeta do espectrofotômetro Cary 1-E (Varian). O equipamento foi calibrado com o "branco" representado pelo próprio meio de cultivo algal. No caso de amostras ambientais, o equipamento foi calibrado com o branco sendo as diferentes amostras ambientais testadas, sem o inóculo algáceo.

Através da obtenção de uma curva de calibração para estimativa de densidade algácea correlacionando valores de absorvância e o número de células obtido por contagem, foi determinado um modelo empírico que definiu uma equação de regressão, através do modelo de equação potência por se adequar melhor aos dados obtidos neste trabalho, apresentando melhor coeficiente de determinação ( $r^2$ ) e melhor distribuição de resíduos, conforme equação que segue:

$$y = a \cdot x^b$$

Onde:

**y** = valores de absorvância;

**a; b** = parâmetros da função potência;

**x** = número de células.

A estimativa do número de células a partir dos valores conhecidos de absorvância pode ser obtida ao isolar-se **x** na função anterior:

$$x = e^{(\ln y - \ln a)/b}$$

A fim de evitar-se interferências quanto aos valores de absorvância das substâncias de referência, foi também realizada uma varredura na distribuição espectral de 600 a 800 nm, quanto aos comprimentos de onda referentes aos valores de absorção de sulfato de cobre e sulfato de zinco.

## 4. RESULTADOS

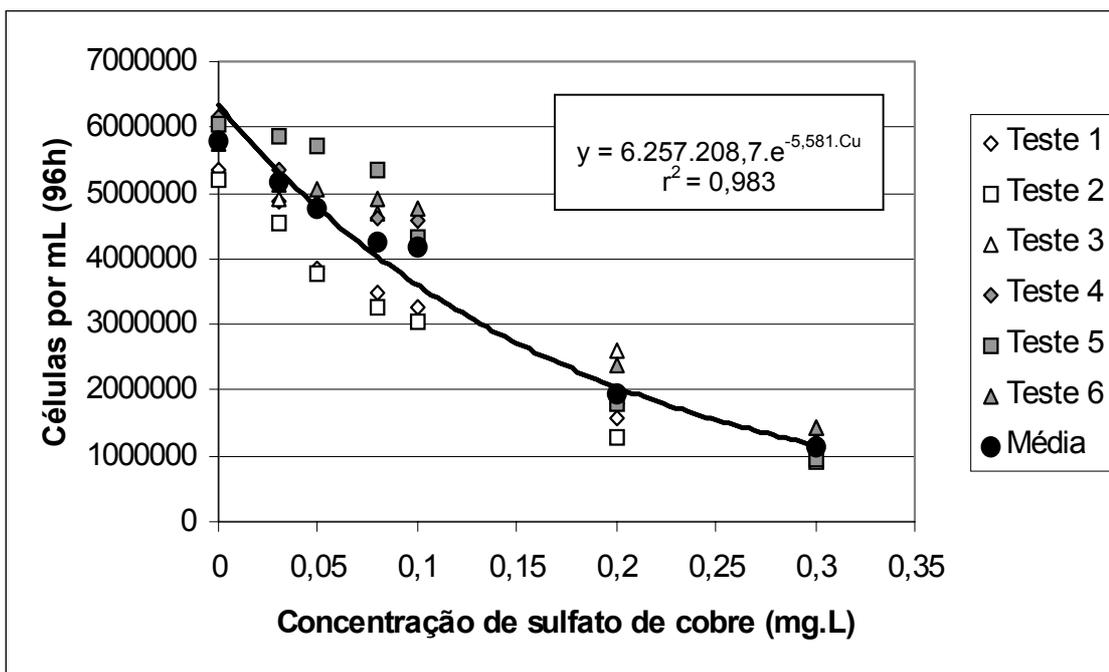
### 4. 1. Avaliação da sensibilidade de *Raphidocelis subcapitata* ao sulfato de cobre e sulfato de zinco e definição das faixas de sensibilidade

O crescimento algáceo obtido nos testes realizados com sulfato de cobre e sulfato de zinco, podem ser vistos nas figuras 2 e 3, respectivamente. As planilhas de registro dos dados brutos de crescimento algáceo obtidos nos testes são apresentadas do Apêndice 2 ao Apêndice 15. Tanto nos testes com sulfato de cobre quanto sulfato de zinco, observa-se uma inibição acentuada do número de células de *R. subcapitata*, quando expostas a concentrações crescentes destas substâncias-teste.

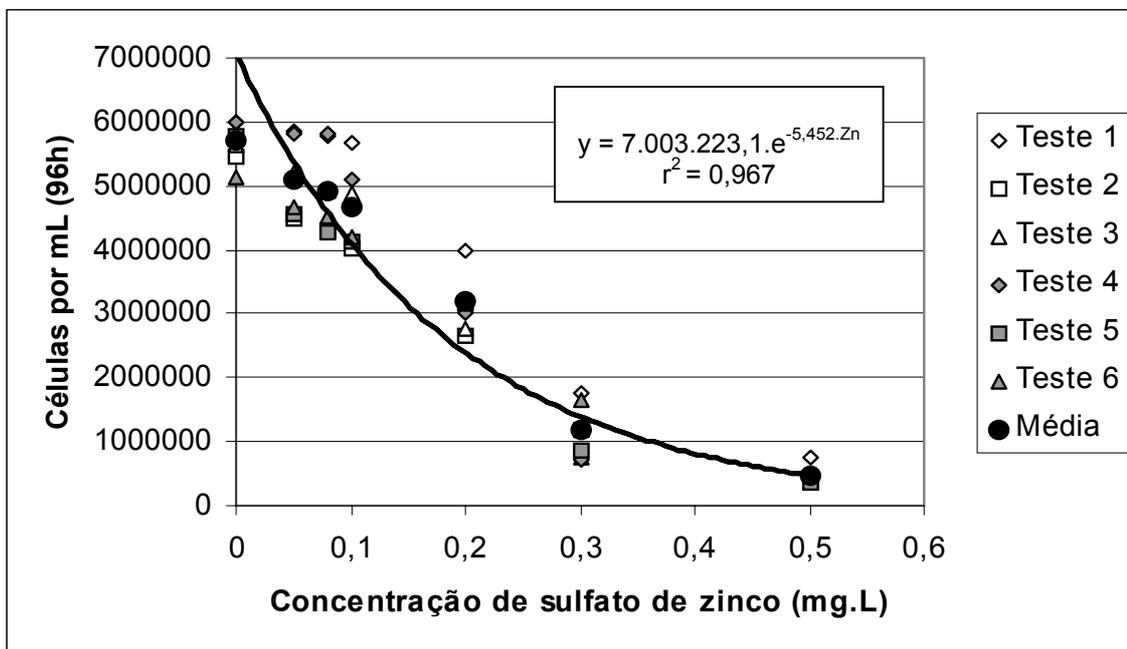
Os parâmetros das equações de regressão, obtidas através das curvas de crescimento de *R. subcapitata* nos testes realizados com sulfato de cobre e sulfato de zinco, são apresentadas nas tabelas 1 e 3, respectivamente.

A CE(I)50; 96h do sulfato de cobre para *R. subcapitata* foi calculada a partir dos resultados obtidos nos seis testes definitivos (Apêndice 16 a 21), apresentando um valor médio de  $0,154 \text{ mg.L}^{-1}$  de  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  e um coeficiente de variação de 13,75% (Tabela 2).

Para os seis testes definitivos realizados com sulfato de zinco, obteve-se um valor médio para a CE(I)50; 96h de  $0,215 \text{ mg.L}^{-1}$  de  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (Apêndice 22 a 27), e um coeficiente de variação de 9,45% (Tabela 4).



**Figura 2:** Número de células de *Raphidocelis subcapitata* após 96 horas de exposição a diferentes concentrações de sulfato de cobre.



**Figura 3:** Número de células de *Raphidocelis subcapitata* após 96 horas de exposição a diferentes concentrações de sulfato de zinco.

**Tabela 1** - Parâmetros das equações de regressão do número de células em função da concentração de sulfato de cobre ( $y = a \cdot e^{b \cdot x}$ ).

Teste	b	Erro Padrão de b	a	Erro Padrão de a	r <sup>2</sup>
1	-5,908	0,151	5.510.391	27.765,9	0,983
2	-6,163	0,182	5.258.185	32.062	0,978
3	-4,6	0,18	6.166.000,9	36.756,5	0,962
4	-5,788	0,258	6.651.075	56.644,6	0,951
5	-6,203	0,277	7.489.660,9	67.991,8	0,958
6	-4,822	0,204	6.467.939,3	43.609,3	0,956
Média	-5,581		6.257.208,7		
Erro Padrão	0,695		810.256,8		

**Tabela 2** - Concentração efetiva mediana, CE(I)50; 96h, de sulfato de cobre (CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O) para *R. subcapitata*.

Teste nº	CE(I)50; 96h (mg.L <sup>-1</sup> )
1	0,135
2	0,124
3	0,184
4	0,153
5	0,151
6	0,177
Média	0,154
Erro Padrão	0,021
Limite Inferior	0,099
Limite Superior	0,209
Coefficiente de Variação	13,75%

**Tabela 3** - Parâmetros das equações de regressão do número de células em função da concentração de sulfato de zinco ( $y = a \cdot e^{b \cdot x}$ ).

Teste	b	Erro Padrão de b	a	Erro Padrão de a	r <sup>2</sup>
1	-4,537	0,199	7.680.465,7	82.262,2	0,953
2	-5,332	0,148	6.280.753,8	50.754,4	0,980
3	-5893	0,291	7.046.557,9	111.044,9	0,941
4	-6,193	0,347	7.862.284,4	146.749,4	0,925
5	-5,843	0,255	6.689.007,5	92.716,3	0,953
6	-4,914	0,209	6.460.269,2	73.460,8	0,955
Média	-5,452		7.003.223,1		
Erro Padrão	0,639		650.232,9		

**Tabela 4** - Concentração efetiva mediana, CE(I)50; 96h, de sulfato de zinco ( $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ ) para *R. subcapitata*.

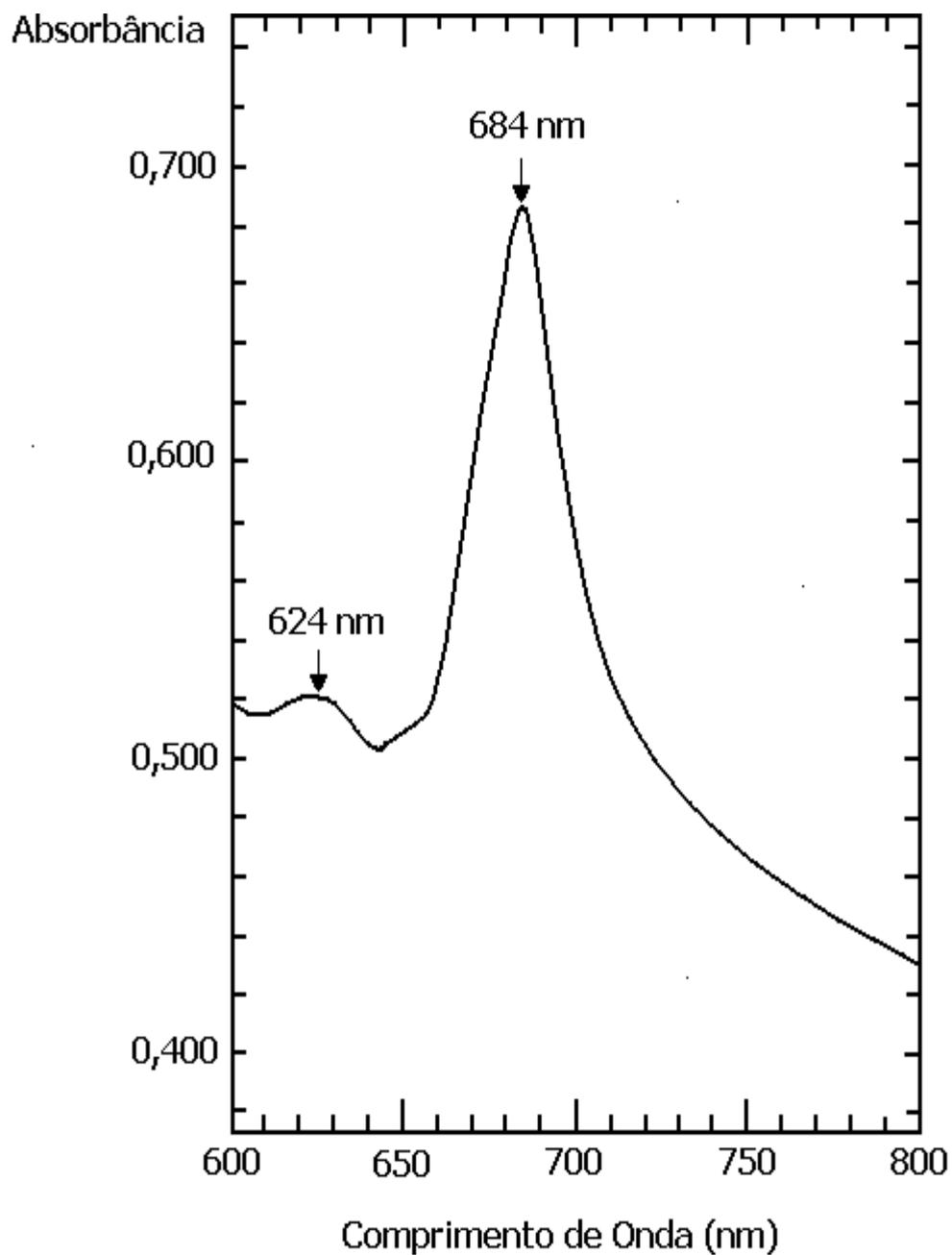
Teste nº	CE(I)50; 96h (mg.L <sup>-1</sup> )
1	0,244
2	0,196
3	0,198
4	0,201
5	0,211
6	0,242
Média	0,215
Erro Padrão	0,020
Limite Inferior	0,163
Limite Superior	0,267
Coefficiente de Variação	9,45%

Nos testes complementares realizados para a determinação do efeito algistático ou algicida das substâncias de referência utilizadas sobre *R. subcapitata*, tanto o sulfato de cobre quanto o sulfato de zinco, nas condições testadas, não apresentaram efeito algicida, sendo observado crescimento algáceo após sete dias de incubação.

#### **4.2. Determinação da densidade de *Raphidocelis subcapitata* através de espectrofotometria**

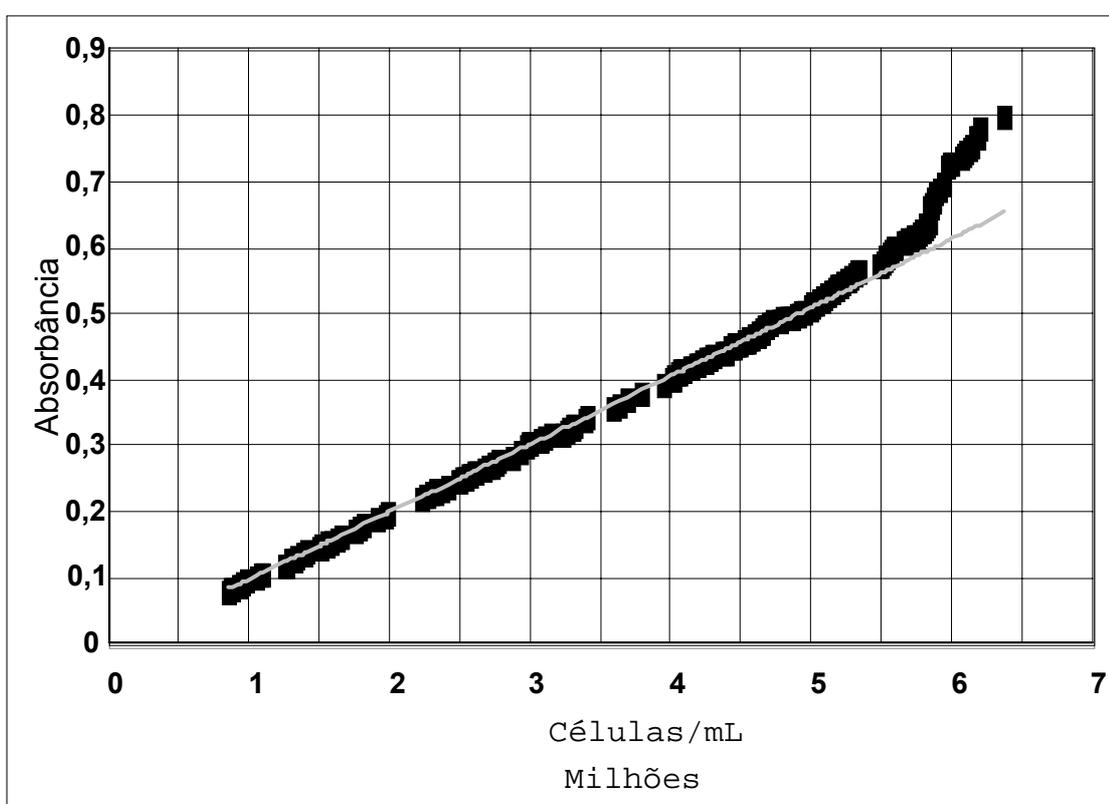
As planilhas de registro dos dados brutos de crescimento algáceo obtidos nos testes com amostras ambientais, com as concentrações finais de *R. subcapitata* expressas em número de células e valores de absorbância são apresentadas do Apêndice 28 ao Apêndice 34.

A figura 4 apresenta a varredura espectral realizada na faixa entre 600 e 800nm. A partir do comprimento de onda de 624nm já se observa um suave pico de absorção, que é seguido de uma leve queda. Em seguida, nota-se uma tendência acentuada de aumento da absorção, atingindo o comprimento de 684nm, onde obteve-se o maior valor de absorbância, representando a máxima sensibilidade da espécie com relação à sua quantificação.



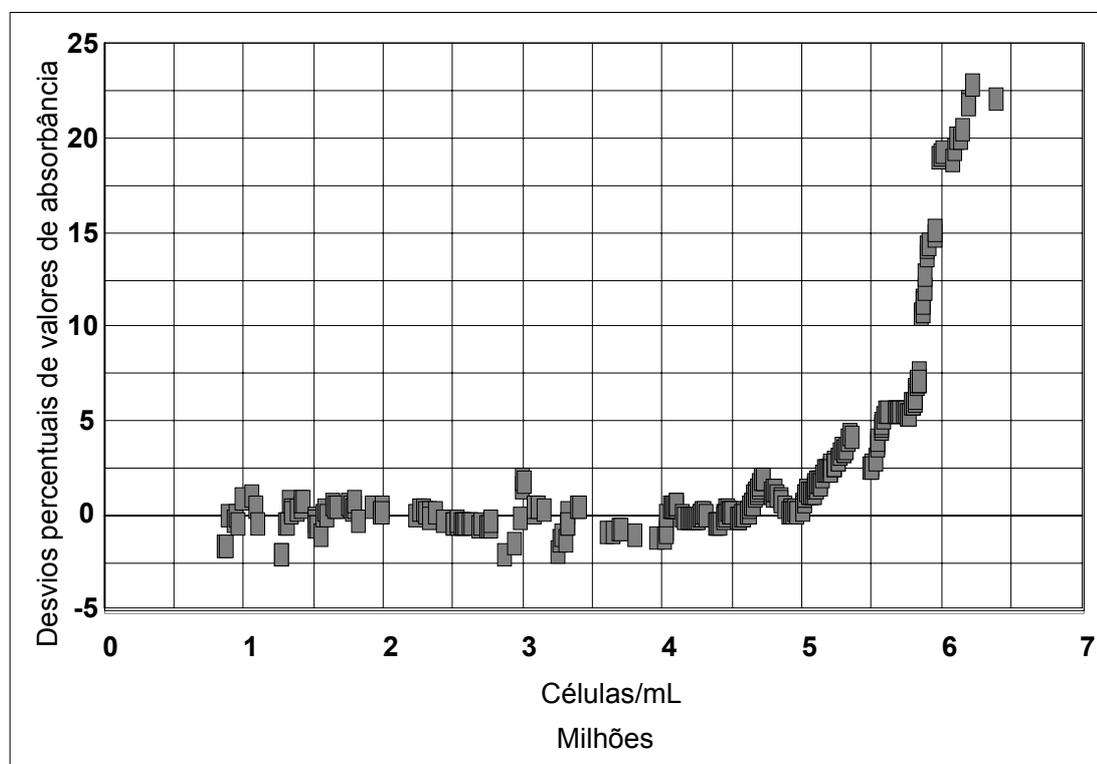
**Figura 4:** Varredura na distribuição espectral de 600 a 800 nm, evidenciando pico máximo de absorção, em 684 nm para *Raphidocelis subcapitata*.

A figura 5 apresenta a relação entre os valores de absorvância e o número de células de *Raphidocelis subcapitata* por mL, sendo descrita pela seguinte equação:  $y = 7,2578 \cdot 10^{-8} \cdot x^{1,0219}$ , ( $n=130$ ;  $r^2=0,9998$ ) onde  $y$  é a absorvância esperada em função de  $x$  células da amostra. A fim de estimar-se o número de células de uma dada amostra para um determinado valor lido de absorvância, isola-se  $x$  da função anterior:  $x = e^{(\ln(y) - 16,4383)/1,0219}$ .



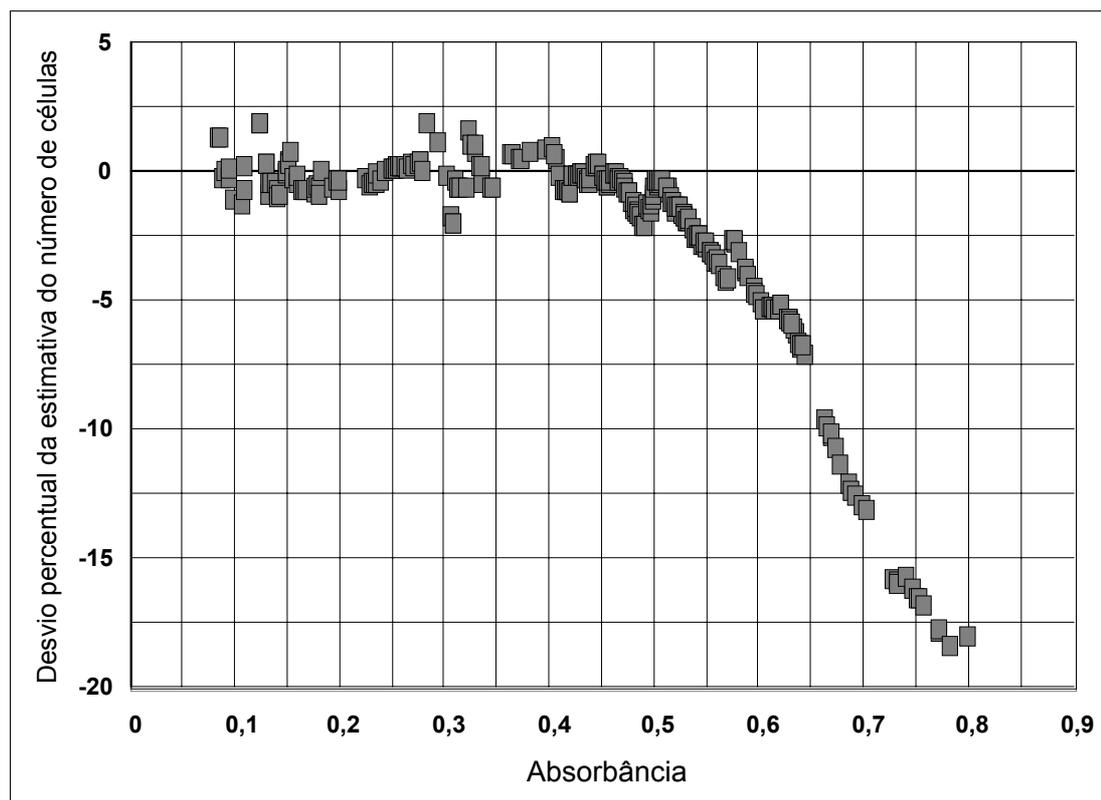
**Figura 5:** Valores de absorvância observados em função do número de células algais de *Raphidocelis subcapitata* por mL, onde os pontos em preto representam os valores de leitura experimental e a linha contínua, os valores previstos pela equação potência ( $y=7,2578 \cdot 10^{-8} \cdot x^{1,0219}$ ;  $n=130$ ;  $r^2=0,9998$ ).

A figura 6 apresenta a distribuição dos desvios percentuais dos valores de absorvância em função do número de células de *R. subcapitata*, representando a diferença dos valores de absorvância obtidos em função de um determinado número de células. Observa-se que até a concentração de 5 milhões de células/mL os desvios encontram-se sempre inferiores a 2,5% e a partir de 5 milhões de células/mL ocorre um desvio crescente na densidade algácea.



**Figura 6:** Distribuição dos desvios percentuais de valores de absorvância em função do número de células de *Raphidocelis subcapitata* ( $y=7,2578 \cdot 10^{-8} \cdot x^{1,0219}$ ).

A figura 7 mostra a distribuição dos desvios percentuais da estimativa do número de células de *R. subcapitata* em função dos valores de absorvância. Verifica-se que a partir do valor de absorvância de 0,5; os desvios apresentam-se crescentes.



**Figura 7:** Desvios percentuais da estimativa do número de células de *Raphidocelis subcapitata* em função de valores de absorvância ( $y=7,2578 \cdot 10^{-8} \cdot x^{1,0219}$ ).

A varredura realizada na distribuição espectral de 600 a 800 nm, quanto aos valores de absorvância das substâncias de referência, revelou que os comprimentos de onda referentes aos valores de absorção de sulfato de cobre e sulfato de zinco não interferem nas leituras das amostras contendo *R. subcapitata*, ficando muito próximas de zero. Assim, as amostras podem ser lidas diretamente, sem interferências na absorção.

## 5. DISCUSSÃO

A utilização de testes de toxicidade como ferramenta para o biomonitoramento na avaliação da qualidade da água é reconhecida como bastante eficaz (RODGHER & ROCHA, 1999). Assim, para que os testes de toxicidade utilizando algas possam ser realizados com confiabilidade, é de fundamental importância, como instrumento de avaliação da qualidade dos cultivos e testes algáceos, que se estabeleça uma faixa de sensibilidade a pelo menos uma substância de referência para *R. subcapitata*.

De acordo com RODGHER & ROCHA (1999), uma das formas de se avaliar as condições fisiológicas dos organismos-teste é através de testes de sensibilidade com uma substância tóxica de referência. Estes testes consistem em submeter os organismos a diferentes concentrações da substância, e desta maneira, obter a faixa de sensibilidade para posterior realização de bioensaios. Valores fora desta faixa de sensibilidade não garantem que os organismos se encontrem em condições para serem utilizados.

Espécies rotineiramente submetidas a testes de toxicidade, que já possuem uma faixa de sensibilidade definida para uma substância de referência, devem ter sua sensibilidade ao tóxico de referência avaliada pelo menos uma vez por mês. O objetivo destas avaliações é o controle de qualidade dos cultivos e dos testes realizados. Se a CL(I)50, ou a CE(I)50, estiverem fora da faixa esperada, a sensibilidade dos organismos e toda a

credibilidade do sistema dos testes são questionadas. Neste caso, os procedimentos do cultivo e do teste devem ser revisados (EPA, 1991).

Embora *R. subcapitata* venha sendo empregada em um grande número de avaliações de toxicidade (PARRISH, 1985; EPA, 1989; CETESB, 1992 e COONEY, 1995), poucos dados têm sido publicados em relação à sensibilidade desta espécie frente a substâncias de referência.

No presente trabalho, a realização de testes de toxicidade com *R. subcapitata*, apresentou como objetivo a obtenção de dados referentes à sensibilidade da espécie frente a substâncias de referência rotineiramente utilizadas em testes para avaliação da sensibilidade de organismos de outros níveis tróficos. Neste trabalho, os testes realizados utilizando sulfato de cobre mostraram a maior toxicidade desta substância de referência a *R. subcapitata*, nas condições testadas, quando comparada com sulfato de zinco, que apresentou concentrações mais elevadas para determinar a CE(I)50; 96h. EPA (1989) recomenda que para cada organismo, deve ser adotada a substância que apresenta maior efeito tóxico e menor variabilidade de resultado. Neste sentido, é importante considerar o efeito do tóxico de referência para a pessoa que manipula a substância e o impacto de seu descarte no ambiente. Assim, substâncias como o cádmio têm sido substituídas por outras substâncias com potencial menos tóxico para o operador do ensaio. Os testes realizados com sulfato de zinco apresentaram um valor de CE(I)50; 96h superior ao valor obtido para os testes realizados com sulfato de cobre, necessitando, assim, de uma maior quantidade desta substância para impactar o ambiente. Os resultados dos testes realizados

com sulfato de zinco também apresentaram menor coeficiente de variação, 9,45%; quando comparados com os valores obtidos para os testes realizados com sulfato de cobre, 13,75%. Desta maneira, os testes realizados com sulfato de zinco demonstraram menor variabilidade dos resultados, expresso através do baixo coeficiente de variação, logo, maior estabilidade da substância de referência e um potencial menos tóxico desta substância, tanto para o operador do ensaio quanto para o ambiente.

A maior toxicidade do cobre também foi observada por PICKERING & HENDERSON (1966), que realizaram experimentos com várias espécies de peixes testando metais como zinco, cobre, cádmio, níquel, chumbo e cromo, sendo que o cobre foi o metal mais tóxico para todas as espécies.

BRANCO (1960) realizou algumas experiências com cobre e zinco, motivado pela ocorrência periódica de morte de peixes mantidos em água de abastecimento e que a causa não era devida à presença de cloro. O autor verificou que diferentes sais de zinco apresentavam toxicidade diversa sobre a mesma espécie e que, provavelmente, a ação física da agitação da água contribui para uma maior eficiência de coagulação de substâncias protéicas nas branquias, provocando mortandade em concentrações menores do que em águas paradas.

A sensibilidade dos peixes *Brachydanio rerio* e *Poecilia reticulata* ao sulfato de cobre e sulfato de zinco foi verificada por NAVAS-PEREIRA *et al.* (1987), com objetivo foi determinar a CL(I)50; 96h. O valor obtido de sulfato de cobre para *B. rerio* foi 0,371 mg.L<sup>-1</sup> e para *P. reticulata* foi 0,31 mg.L<sup>-1</sup> de CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O. O sulfato de zinco apresentou valores de CL(I)50; 96h bem

superiores. Para *B. rerio* o valor foi de 93,5 mg.L<sup>-1</sup> e para *P. reticulata* foi de 123,6 mg.L<sup>-1</sup> de ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O. Mesmo determinando a CL(I)50; 96h, os valores obtidos nos experimentos de NAVAS-PEREIRA *et al.* (1987), mostraram a maior toxicidade do sulfato de cobre quando comparado com o sulfato de zinco para diferentes espécies de peixes; desempenho similar ao observado no presente trabalho.

CRANDALL & GOOD-NIGHT (1962), também avaliaram a toxicidade do zinco para *Poecilia reticulata*, em condições de efeito subletal, CE(I)50; 96h, e obtiveram a concentração de 1,15 mg.L<sup>-1</sup> em zinco como capaz de retardar o crescimento, maturidade sexual e afetar a taxa de mortalidade. Esta concentração é bastante alta comparada à obtida no presente trabalho, em que a CE(I)50; 96h foi determinada em 0,215 mg.L<sup>-1</sup> de ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, ou seja, 0,049 mg.L<sup>-1</sup> em zinco, o que reforça a idéia de que, segundo WALSH & MERRIL (1984), as algas podem ser mais sensíveis que outros organismos da biota aquática, quando expostas a um mesmo agente.

A maior sensibilidade das algas, também foi observada por BAUN *et al.* (1998), que realizaram ensaios ecotoxicológicos utilizando testes de inibição de crescimento algal com *R. subcapitata* e testes de imobilização com *Daphnia magna*. Neste experimento, monitorando água superficial e determinando a toxicidade de pesticidas, *R. subcapitata* provou ser mais sensível que *D. magna* para todas as amostras estudadas.

A precisão analítica dos testes de toxicidade, dentre os quais estão os testes de sensibilidade, é avaliada através da variação entre os resultados, medida através do coeficiente de variação. É importante que se conheça a

precisão analítica destes testes, de modo a avaliar a variabilidade dos resultados obtidos, evidenciando desta forma a confiabilidade dos métodos utilizados (BERTOLETTI *et al.*, 1989).

De acordo com EPA (1991), o coeficiente de variação entre os resultados dos testes de toxicidade deve estar compreendido na faixa de 8 a 41%. A variabilidade encontrada entre os resultados dos testes de sensibilidade ao sulfato de cobre e sulfato de zinco realizados com *R. subcapitata* neste trabalho foi bastante baixa. O coeficiente de variação dos testes realizados com sulfato de cobre foi de 13,75% e dos testes realizados com sulfato de zinco foi de 9,45%. Já nos testes com amostras ambientais, o coeficiente de variação máximo obtido entre as réplicas de uma amostra foi de 17,74%. Estes baixos coeficientes de variação, indicam a manutenção de condições uniformes tanto nos cultivos quanto nos testes utilizando *R. subcapitata*.

Neste contexto, a constância de respostas em testes de toxicidade com substâncias de referência deve ser um dos critérios considerados na seleção da espécie-teste e da própria substância de referência, constância esta que foi observada nos testes realizados tanto com o sulfato de cobre quanto com o sulfato de zinco para *R. subcapitata*.

BOHRER (1995), salienta que as condições nas quais os organismos são cultivados podem afetar os resultados dos testes. Desta maneira, fatores como o meio de cultura, fotoperíodo, temperatura e intensidade luminosa são importantes na manutenção dos organismos para os testes. Assim, tanto

os cultivos quanto os testes devem ser realizados em condições próximas ao ótimo para a espécie.

MAYER *et al.* (1998) comentam, ainda, a influência das condições de teste no resultado dos testes de inibição do crescimento algal. Fatores como pH, temperatura e intensidade luminosa podem interferir nos resultados. O autor afirma que *R. subcapitata* é tolerante a uma faixa de pH de 6 a 9. Quanto à temperatura, a taxa de crescimento e a morfologia celular de *R. subcapitata* são dependentes da temperatura, sendo que *R. subcapitata* pode crescer em temperaturas de 6 a 33°C, com temperatura ótima de aproximadamente 28°C. No que se refere à intensidade luminosa, MAYER *et al.* (1998) salientam que o crescimento algal está diretamente correlacionado com a luz disponível para fotossíntese e a taxa de crescimento normalmente aumenta ao longo da curva de saturação.

Neste sentido, GHERARDI-GOLDSTEIN *et al.* (1990), chamam atenção, ainda, que o resultado dos testes de toxicidade e sua confiabilidade dependem do controle adequado das condições de teste. No presente trabalho, tanto os cultivos quanto os testes com *R. subcapitata* foram realizados com pH ajustado para 7,0 ( $\pm 0,2$ ); temperatura de 25°C ( $\pm 2^\circ\text{C}$ ) e iluminação contínua com intensidade luminosa de 3.500 lux.

A comparação dos resultados obtidos neste trabalho com os encontrados em literatura, nem sempre foi possível, devido às diferenças das condições de teste, tais como o tempo de exposição à substância de referência, a espécie testada, a natureza da substância-teste e o tipo de resposta que se pretende obter.

Alguns estudos têm sido feitos sobre a sensibilidade de espécies de algas para a toxicidade de herbicidas, metais e outros compostos tóxicos. FAIRCHILD *et al.* (1998) realizaram experimentos comparando a sensibilidade relativa de seis espécies de algas e cinco espécies de macrófitas para diferentes herbicidas. Das espécies de algas testadas, *R. subcapitata* foi a espécie que apresentou maior sensibilidade relativa aos herbicidas avaliados. Com relação aos estudos desenvolvidos por ROJÍCKOVÁ-PADRTOVÁ & MARSÁLEK (1999), comparando a sensibilidade de sete espécies de algas a diferentes metais e herbicidas, foi observado que *R. subcapitata* demonstrou ser a espécie mais sensível das algas testadas. O valor obtido para a CE(I)50;96h foi de 0,164 mg.L<sup>-1</sup> de CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O, valor muito semelhante ao encontrado no presente trabalho, que foi de 0,154 mg.L<sup>-1</sup> de CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O.

KOMÁREK & MARVAN (1979) consideram a morfologia das algas, a ecofisiologia e propriedades do cultivo como critérios para a seleção de algas como organismo-teste. Isso inclui a classificação taxonômica e adequado crescimento em culturas. Assim, o trabalho realizado por ROJÍCKOVÁ-PADRTOVÁ & MARSÁLEK (1999) indicou que a filogenia algal pode ser relacionada à sensibilidade algácea. Neste estudo, após análise de componentes principais (PCA), foi separado um grupo de estratos de cianobactérias procariontes e outro de algas verdes eucariontes. Também, WÄNGBERG & BLANCK (1988) observaram que muitas diferenças na fisiologia celular entre Cyanophyta e Chlorococcales são toxicologicamente relevantes. FAIRCHILD *et al.*, 1998 verificaram que algas verdes, como

*Raphidocelis* e *Scenedesmus* são tipicamente mais sensíveis que cianobactérias, como *Microcystis* e *Anabaena*.

Quanto à análise dos resultados utilizada em ensaios ecotoxicológicos, MARKLE *et al.* (2000) avaliaram a toxicidade de efluentes para *R. subcapitata* através de duas metodologias estatísticas. Neste trabalho os autores analisaram os resultados dos testes utilizando CENO e CEO que são, respectivamente, a maior concentração de amostra que não causa efeito deletério e a menor concentração que causa efeito deletério estatisticamente significativos sobre os organismos; e a concentração de inibição percentual (ICp), também conhecida como concentração efetiva da amostra (CE) que pode inibir o crescimento dos organismos em diferentes percentagens. Os autores concluíram que ICp (através do cálculo da IC25 em testes crônicos utilizando *R. subcapitata*) apresenta-se como uma ferramenta muito melhor para avaliar a sensibilidade de espécies quando comparada aos resultados obtidos em testes utilizando como resposta valores de CENO e CEO. No presente trabalho foi utilizado o cálculo da IC50, expresso através da CE50 para *R. subcapitata*, similar ao realizado por FABER *et al.* (1997) em bioensaios algais. Da mesma maneira como realizado no presente trabalho, os autores consideram que os valores de CE(I)50 referem-se a inibição de crescimento algáceo em bioensaios e são excelentes descritores de impacto que compostos tóxicos podem ter numa população algal. Neste sentido, sempre que possível os testes de toxicidade devem expressar valores de concentrações efetivas das amostras para a

cultura algal utilizada no ensaio, mostrando um resultado quantitativo do potencial impacto à população algal.

Na utilização de algas em testes de toxicidade, a determinação da concentração algácea deve ser realizada através de contagem celular, conteúdo de clorofila, turbidez ou absorvância (EPA, 1994).

No caso de utilizar-se a absorvância, o comprimento de onda recomendado para leitura de amostras utilizando *R. subcapitata* é de 750 nm, segundo EPA (1994) e EATON *et al.* (1995). Entretanto, ao determinar-se a curva de absorvância na distribuição espectral de 600 a 800 nm, foi obtido o pico máximo de absorção de luz no comprimento de 684 nm, comprimento de onda em que foram realizadas as leituras.

Vários são os autores que têm utilizado o comprimento de onda de 680 nm, como pico de absorção para leitura de suas amostras (ROJÍCKOVÁ-PADRTOVÁ & MARSÁLEK, 1999; GEIS *et al.* 2000; MARKLE *et al.*, 2000). VALER & GLOCK (1998) em seus experimentos correlacionando biomassas algais com valores de absorvância, obtiveram um pico máximo de absorção em 687 nm. Todos os valores encontrados na literatura e o valor obtido no presente trabalho, são muito próximos e, de acordo com HERSH & CRUMPTON (1987), FARGASOVÁ (1996) e ROJÍCKOVÁ-PADRTOVÁ *et al.* (1998), estão associados a concentrações de pigmentos clorofilados, que apresentam como valor de leitura o comprimento de onda em torno de 664 nm.

ABNT (1992), CETESB (1992) e EPA (1994) recomendam que se espectrofotometria ou fluorimetria forem os métodos escolhidos para

determinar a concentração algal dos ensaios, curvas de regressão devem ser obtidas a fim de estabelecer a relação entre a unidade de leitura e o número de células/mL. Assim, no presente trabalho foram testadas diferentes equações com a finalidade de correlacionar número de células algais e valores de absorvância. Os modelos de regressão linear e exponencial, não se adequaram aos dados obtidos neste trabalho. Desta maneira, foi utilizado o modelo de equação potência por apresentar o melhor coeficiente de determinação ( $r^2$ ) e melhor distribuição de resíduos.

A equação apresentada neste trabalho, permite determinar a concentração algácea a partir de valores de absorvância, na faixa de 800.000 a 5.000.000 de células/mL de *R. subcapitata*, com precisão e rapidez, considerando que testes ecotoxicológicos, geralmente, exigem resultados imediatos. Em concentrações até 5 milhões de células/mL os desvios encontram-se sempre inferiores a 2,5% e em densidades superiores a 5.000.000 células/mL, observou-se um desvio crescente, indicando a necessidade do emprego de modelos de regressão mais complexos ou diluição das amostras para leitura. O método proposto não é recomendado para leituras com absorvância superior a 0,5; uma vez que a sobreposição de células pode levar a uma subestimativa da densidade algácea mensurada.

Os experimentos de VALER & GLOCK (1998) definiram equações para determinar concentrações algais de clorófitas na ordem de  $10^4$  a  $10^5$  células/mL. Os autores recomendam que concentrações fora deste intervalo,

devem ter realizada nova análise de regressão, conforme parâmetros redefinidos.

GEIS *et al.* (2000), em seus experimentos com determinação do crescimento algal, concluíram que fluorescência e absorvância apresentam menor coeficiente de variação do que resultados determinados por contagem celular. No presente trabalho isto não foi observado, sendo visto, inclusive, maior coeficiente de variação de resultados obtidos por valores de absorvância do que por contagem celular. De qualquer modo, tais informações não comprometem os resultados determinados por espectrofotometria, pois estes apresentam coeficientes de variação dos resultados dentro do limite aceitável e são obtidos de forma mais rápida, do que quando utilizada contagem celular em microscopia.

## 6. CONCLUSÕES

⇒ A alga clorofícea *Raphidocelis subcapitata* pode ser considerada um bom organismo-teste indicador de impactos ambientais, apresentando-se sensível aos metais testados, podendo ser inclusive, mais sensível que outros organismos da biota aquática, quando expostos a um mesmo agente, de acordo com os resultados obtidos neste trabalho.

⇒ Os testes realizados utilizando sulfato de zinco mostraram a menor toxicidade desta substância a *R. subcapitata*, e também menor variabilidade dos resultados, quando comparada com os testes realizados com sulfato de cobre, apresentando-se como uma boa substância de referência a ser utilizada na determinação de faixas de sensibilidade de *R. subcapitata*.

⇒ A faixa de sensibilidade de *R. subcapitata* (CE(I)50; 96h) para o sulfato de cobre situa-se no intervalo de 0,099 a 0,209 mg.L<sup>-1</sup> de CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O.

⇒ A faixa de sensibilidade de *R. subcapitata* (CE(I)50; 96h) para o sulfato de zinco situa-se no intervalo de 0,163 a 0,267 mg.L<sup>-1</sup> de ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O.

⇒ A utilização do método espectrofotométrico para determinação de densidade algal é eficaz e recomendada, desde que seja previamente definida a equação de regressão, utilizados os parâmetros adequados e determinadas as curvas de regressão a fim de relacionar a unidade de leitura e o número de células/mL.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABNT. Associação Brasileira de Normas Técnicas. Água – Ensaio de toxicidade com *Chlorella vulgaris* (Chlorophyceae). Rio de Janeiro, 1992. **NBR 12648**. 8p.
- ARAÚJO, P.R.P. Biomonitoramento da qualidade da água do Guandu e do Paraíba. **Revista FEEMA**, Secretaria do Meio Ambiente do Estado do Rio de Janeiro - RJ, ano IV, n. 18. pp. 22-25, 1995.
- ARNDT, U.; NOBEL, W.; SCHWEIZER, B. **Bioindikatoren – Möglichkeiten, Grenzen und neue Erkenntnisse**. Stuttgart: Ulmer Verlag, p. 388, 1987.
- ARNDT, U.; SCHWEIZER, B. The use of bioindicators for environmental monitoring in tropical and subtropical countries. In: ELLENBERG JR., H.; RUTHSATZ, B.; WEY, H.; BRETTHAUER, R.; ARNDT, U.; SCHWEIZER, B.; STEUBING, L.; BIERMANN, J.; DEBUS, R.: **Biological Monitoring, Signals from the Environment**. Braunschweig: Vieweg & Sohn Verlagsgesellschaft, p. 318, 1991.
- ARNDT, U.; FLORES, F.; WEINSTEIN, L. **Efeitos do flúor sobre as plantas: diagnose de danos na vegetação do Brasil**. Porto Alegre: Ed. da Universidade - UFRGS, 1995.
- ASTM - American Society for Testing and Materials. **Standard practice for algal growth potencial testing with *Selenastrum capricornutum***. Annual Book of ASTM Standards, 1981. 32p. D 3978-80.
- BARTLETT, L.; RABE, R.W.; FUNK, W.H. Effects of copper, zinc and cadmium on *Selenastrum capricornutum*. **Water Research**, 8: 179 – 185, 1974.
- BAUN, A.; BUSSARAWIT, N.; NYHOLM, N. Screening of pesticide toxicity in surface water from na agricultural area at Phuket Island (Thailand). **Environmental Pollution**, 102. pp. 185 – 190, 1998.
- BERTOLETTI, E.; GOLDSTEIN, E.G.; ZAGATTO, P.A. Variabilidade de testes de toxicidade com peixes. **Ambiente**, v. 3, n. 1, pp. 52-58, 1989.
- BOHRER, M.B.C. **Biomonitoramento das lagoas de tratamento terciário do Sistema de Tratamento de Efluentes Líquidos Industriais (SITEL) do Pólo Petroquímico do Sul, Triunfo, RS, através da comunidade zooplancônica**. São Carlos: UFSCar, 1995. 469p. Tese (Doutorado em Ciências, Área de Concentração em Ecologia e Recursos Naturais. Universidade Federal de São Carlos, 1995.

- BOUDOU, A.; RIBEYRE, F. Fundamental concepts in aquatic ecotoxicology. In: BOUDOU, A., F. RIBEYRE (Eds). **Aquatic ecotoxicology: fundamental concepts and methodologies**. Flórida: CRC Press Inc., 1989. v.1, cap.3, pp. 35-75.
- BRANCO, S.M. Observações sobre o comportamento de peixes em presença de certos compostos metálicos dissolvidos na água. **Revista DAE**, n. 37: 1-5, 1960.
- CETESB. Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental. **Considerações preliminares sobre toxicidade aos organismos aquáticos**. n. 3. 1990. 11p. Informativo Técnico.
- CETESB. Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental. **Métodos de avaliação da toxicidade de poluentes a organismos aquáticos**. São Paulo: CETESB, 1992.
- COMAS, A. G. **Las Chlorococcales dulciaquícolas de Cuba**. Bibliotheca Phycologica v. 99, J. Cramer, 1966.
- COONEY, J.D. Freshwater tests. In RAND, G. M. **Fundamentals of aquatic toxicology. Effects, environmental fate and risk assessment**. Washington: Taylor & Francis, pp.71 – 102, 1995.
- CRANDALL, C.A.; GOOD-NIGHT, C.J. Effects of sublethal concentrations of several toxicants on growth of common guppy, *Lebistes reticulatus*. **Limnol. Oceanogr.**, 1962.
- EATON, A.D.; CLESCERI, L.S.; GREENBERG, A.E. **Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater**. 19. ed. American Public Health Association, Washington. 1040p, 1995.
- ELDER, J.F. Applicability of ambient toxicity to national or regional water-quality assessment. **U.S. Geological survey circular**, n. 1049, 49p, 1990.
- EPA. **Methods for acute toxicity with Fish, Macroinvertebrates and Amphibians**. Cincinnati, OH.: U.S. Environmental Protection Agency, 1975. EPA 660/3-75/009.
- EPA. **Short-term methods for measuring the chronic toxicity of effluents and receivingwaters to freshwater organisms**. 2ª ed. Cincinnati, OH.: U.S. Environmental Protection Agency, 1989. EPA 600/4- 89/001.
- EPA. **Methods for measuring the acute toxicity of effluents and receiving waters to freshwater ang marine organisms**. 4ª ed. Washington,DC: U.S. Environmental Protection Agency, 1991. EPA 600/4-90/027.

- EPA. **Short-term methods for measuring the chronic toxicity of effluents and receiving waters to freshwater organisms**. 3<sup>a</sup> ed. Cincinnati, OH.: U.S. Environmental Protection Agency, 1994. EPA 600/4-91/002.
- FABER, M.J.; SMITH, L.M.J.; BOERMANS, H.J.; STEPHENSON, G.R.; THOMPSON, D.G.; SOLOMON, K.R. Cryopreservation of fluorescent marker-labeled algae (*Selenastrum capricornutum*) for toxicity testing using flow cytometry. **Environmental Toxicology and Chemistry**, 16: 1059 - 1067, 1997.
- FAIRCHILD, J.F.; RUESSLER, D.S.; CARLSON, A.R. Comparative sensitivity of five species of macrophytes and six species of algae to atrazine, metribuzin, alachlor, and metolachlor. **Environmental Toxicology and Chemistry**, 17: 1830 – 1834, 1998.
- FARGASOVÁ, A. Inhibitive effect of organotin compounds on the chlorophyll content of the green fresh water alga *Scenedesmus quadriculata*. **Environmental Contam. Toxicol.** 57: 99 – 106, 1996.
- FERNANDES, L.M. **Modelo de biomonitoramento de efluentes industriais para preservação dos recursos pesqueiros**. Recife: Departamento de Pesca da UFRPer, 1989. Relatório Técnico.
- FOWLER, H.G.; AGUIAR, A.M. A integração da teoria ecológica na análise ambiental. In: TAUKE, S.M., GOBBI, N., FOWLER, H.G. (organizadores). **Análise ambiental: uma visão multidisciplinar**. São Paulo: Editora UNESP, 1991. pp.133 - 141.
- 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. **Environmental Toxicology and Chemistry**, 19: 36-41, 2000.
- GHERARDI-GOLDSTEIN, E.; BERTOLETTI, E.; ZAGATTO, P.A.; ARAÚJO, P.R.A.; RAMOS, M.L.L.C. **Procedimentos para a utilização de testes de toxicidade no controle de efluentes líquidos**. São Paulo: CETESB, 1990. 17p.
- GOULDEN, C.E. & HORNING, L.L. Population oscillations and energy reserves in planktonic Cladocera and their consequences to competition. **Proc. Natn. Acad. Sci.**, v. 77, p. 1716 - 1720, 1980.
- GREENE, J.C.; MILLER, W.E.; DEBACON, M.; LONG, M.A.; BARTELS, C.L. Use of *Selenastrum capricornutum* to assess the toxicity potential of surface and ground water contamination caused by chromium waste. **Environmental Toxicology and Chemistry**. 7: 35 – 39, 1988.
- GRINDON, L. H. **The Manchester Flora**. London, pp. 510 – 519, 1859.

- HELLAWELL, J.M. **Biological Indicators of Freshwater Pollution and Environmental Management**, (Pollution Monitoring Series), p. 509, Elsevier Applied Science Publishers, London and New York, 1986.
- HERSH, C.M.; CRUMPTON, W.G. Determination of growth rate depression of some of green algae by atrazine. **Environmental Contam. Toxicol.**, 39: 1041 – 1048, 1987.
- HICKEY, C.W.; BLAISE, C.; COSTAN, G. Microtesting appraisal of ATP and cell recovery toxicity end points after acute exposure of *Selenastrum capricornutum* to selected chemicals. **Environ. Toxicol. Water Qual.**, 1: 383 - 403, 1991.
- HINDÁK, F. **Studies on the chlorococcal Algae (Chlorophyceae)**. IV. Biol. Prace, v. 34 ( ½), p. 1-263, 1988.
- IBAMA. **Manual de testes para avaliação da ecotoxicidade de agentes químicos**. Ministério do Interior. Secretaria Especial do Meio Ambiente. Secretaria de Tecnologia e Controle Ambiental. Coordenadoria de Toxicologia Ambiental. Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e Recursos Renováveis. Brasília, 1990. p. 351.
- KLAINE, S.J.; LEWIS, M.A. Algal and plant toxicity testing. In: HOFFMAN, D.J., RATTNER, B.A., BURTON, G.A. Jr., CAIRNS, J. Jr. Eds., **Handbook of Ecotoxicology**. CRC, Boca Raton, Flórida, USA. 1995, pp. 163-184.
- KOMÁREK, J.; MARVAN, P. Selection and registration of strains of algae as assay organisms. In: **Algal assays and monitoring eutrophication** (Edited by MARVAN, P., PRIBIL, S., LHOTSKY, O.), pp. 87 - 102. E. Schweizerbart. Verlagsbuch., Stuttgart, 1979.
- LEWIS, M.A. Are laboratory-derived toxicity data for fresh-water algae worth effort? **Environmental Toxicology and Chemistry**, 9: 1279 – 1284, 1990.
- LEWIS, M.A. Freshwater primary procedures. In CALOW, P. **Handbook of Ecotoxicology**, V. 1. Oxford: Blackell Scientific Publications, 1993.
- LEWIS, M.A. Algae and vascular plants tests. In: RAND, G.M. (ed.) **Fundamentals of aquatic toxicity. Effects, environmental fate and risk assessment**. Washington: Taylor & Francis, 1995. p. 135 - 169.
- McATEER, J.; DAVIS, J. Basic cell culture technique and the maintenance of cell lines. In: DAVIS, J. **Basic cell culture - A practical approach**. Oxford: IRL Press. (The Practical Approach Series). 1994.
- MARKLE, P.J.; GULLY, J.R.; BAIRD, R.B.; NAKADA, K.M.; BOTTOMLEY, J.P. Effects of several variables on whole effluent toxicity test

- performance and interpretation. **Environmental Toxicology and Chemistry**, 19: 123-132. 2000.
- MAYER, P.; FRICKMANN, J.; CHRISTENSEN, E.R.; NNYHOLM, N. Influence of growth conditions on the results obtained in algal toxicity tests. **Environmental Toxicology and Chemistry**, 17: 1091 – 1098, 1998.
- MILLER, W.E. **The *Selenastrum capricornutum* Printz algae assay bottle test**. Corwallis: US-EPA, 1977, 12p. EPA 600019-78-018.
- MITTENZWEY, K.H.; ULLRICH, S.; GITELSON, A.A.; KONDRATIEV, K.Y. Determination of chlorophyll-a of inland waters on the basis of spectral reflectance. **Limnol.Oceanogr.**, 37 (1): 147 – 149, 1992.
- NAVAS-PEREIRA, D.; GHERARDI-GOLDSTEIN, E.; ZAGATTO, P.A.; SASSI, R. Bioensaios: um programa a serviço do controle da poluição. Resultados iniciais. **Ambiente**, 1 (1) pp. 32 - 36, 1987.
- NYGAARD, G. J.; KOMÁREK, J.; KRISTIANSEN, J. ; SKULBERG, O. M. Taxonomic designations of the bioassay alga NIVA-CHL 1 (*Selenastrum capricornutum*) and some related strains. **Opera bot.** v. 90, p. 1-46, 1986.
- NORBERG-KING, T.J. **A Linear Interpolation Method for Sublethal Toxicity: The Inhibition Concentration (ICp) Approach**. Version 2.0 U.S. Environmental Protection Agency - Environmental Research Laboratory. Duluth, MN 55804. 1993.
- PARRISH, P.R. Acute toxicity tests. In: RAND, G.M., PETROCELLI, R.R. **Fundamentals of aquatic toxicity**. Washington: Hemisphere Publishing Corporation, 1985. pp. 31 - 57
- PFLEEGER, T.; McFARLANE, J.C.; SHERMAN, R.; VOLK, G. A short-term bioassay for whole plant toxicity. In: GORSUCH, J.W., LOWER, W.R., WANG, W., LEWIS, M.A., eds, **Plants for toxicity assessment**, Vol. 2. STP 1115. American Society for Testing and Materials, Philadelphia, PA, pp 355 – 364, 1991.
- PICKERING, Q.H.; HENDERSON, N.C. The acute toxicity of some heavy metals to different species of warmwater fishes, **Air and Water Pollution International Journal**, n. 10, pp. 453 - 463, 1966.
- RAND, G.M.; PETROCELLI, J.R. **Fundamentals of aquatic toxicity**. McGraw Hill International Book Company, 1985. 666p.
- RAYA-RODRIGUEZ, M.T. O uso de bioindicadores para avaliação da qualidade do ar de Porto Alegre. In: ZURITA, M.L.L. (Org.), TOLFO, A.M. (Org.) **A qualidade do ar em Porto Alegre**. Porto Alegre: Secretaria Municipal de Meio Ambiente, 2000. pp. 68 - 76.

- RODGHER,S.; ROCHA, O. Estudo da sensibilidade de organismos aquáticos a uma substância de referência, o cloreto de sódio (NaCl). In: **Congresso Brasileiro de Limnologia**, 1999, Florianópolis, Santa Catarina, Anais..., 1999. pp. 527.
- ROJÍCKOVÁ-PADRTOVÁ, R.; MARSÁLEK, B. Selection and sensitivity comparisons of algal species for toxicity testin. **Chemosphere**, 38: 3329 – 3338, 1999.
- ROJÍCKOVÁ-PADRTOVÁ, R.; MARSÁLEK, B.; HOLOUBEK, I. Evaluation of alternative and standard toxicity assays for screening of environmental samples: Selection of an optimal test battery. **Chemosphere**, 37: 495 - 507, 1998.
- SICKO-GOAD; STOERMER. In: **Toxic contaminants and ecosystem health: A great lakes focus**, 1988. Evans, M.S. (editor). Vol 21. Advances in environmental science and technology. THODE. pp. 19 – 52, 1988.
- SOSAK-SWIDERSKA, B.; TYRAWKA, D.; MASLIKOWSKA, B. Microalgal ecotoxicity test with 3,4 dichloroaniline. **Chemosphere**, 37: 2975 - 2982, 1998.
- THOMAS, J.M., et al. Characterization of chemical waste site contamination and determination of its extent using bioassays. **Environmental Toxicology and Chemistry**, 5: 487 - 501, 1986.
- TORGAN, L. C. **Identificação de microalga (Chlorophyceae-Chlorococcales) do banco de cultivo do Departamento de Ecologia/UFRGS**. Porto Alegre, Fundação Zoobotânica, RS, 2002. Relatório Técnico.
- WALSH, F.E.; MERRIL, R.G. Algal bioassays of industrial and energy process effluents. In: SHUBERT, L.E. (ed.) **Algae as ecological indicators**. London. Academic Press, 1984. 434p.
- WÄNGBERG, S.A.; BLANCK, H. Multivariate patterns of algal sensitivity to chemicals in relation to phylogeny. **Ecotox. Environ. Saf.**, 16: 72 – 82, 1988.
- VALER, R.M.; GLOCK, L. Quantificação de algas clorofíceas de interesse ecotoxicológico através do método espectrofotométrico. **Acta Limnologica Brasiliensia**, 11 (2): 149 – 156, 1998.
- ZAR, J.H. **Biostatistical Analysis**. 4ª ed. Prendice-Hall, p. 663, 1999.

## Apêndice 1 - Meio de cultura utilizado nos cultivos e testes com *Raphidocelis subcapitata*.

Preparo do meio de cultura L.C. Oligo (CETESB, 1992)

### A. Preparo das soluções

#### Solução 1

Nitrato de Cálcio ( $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ )	4 g
Volume final da solução	100 mL

#### Solução 2

Nitrato de Potássio ( $\text{KNO}_3$ )	10 g
Volume final da solução	100 mL

#### Solução 3

Sulfato de Magnésio ( $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ )	3 g
Volume final da solução	100 mL

#### Solução 4

Fosfato de potássio bibásico ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ )	4 g
Volume final da solução	100 mL

#### Solução 5

Sulfato de cobre ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ )	30 mg
Molibdato de amônia ( $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ )	60 mg
Sulfato de Zinco ( $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ )	60 mg
Nitrato de manganês ( $\text{Mn}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ )	60 mg
Ácido cítrico ( $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ )	60 mg
Ácido bórico ( $\text{H}_3\text{BO}_3$ )	60 mg
Volume final da solução	1000 mL

#### Solução 6

Citrato de ferro ( $\text{C}_6\text{H}_5\text{FeO}_7 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ )	1,625 g
Cloreto de ferro ( $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ )	0,625 g
Sulfato de ferro ( $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ )	0,625 g
Volume final da solução	1000 mL

#### Solução 7

Bicarbonato de sódio ( $\text{NaHCO}_3$ )	15 g
Volume final da solução	1000 mL

Após devidamente identificadas, estas soluções podem ser estocadas em geladeira por um período máximo de 3 meses.

## B. Procedimentos

Colocar 500 mL de água destilada ou bideionizada em um balão volumétrica e adicionar as soluções na seguinte ordem:

Solução 1	1,0 mL
Solução 2	1,0 mL
Solução 3	1,0 mL
Solução 4	1,0 mL
Solução 5	0,5 mL
Solução 6	0,5 mL
Solução 7	1,0 mL

Completar até 1.000 mL com água destilada ou bideionizada e ajustar o pH do meio para ficar 7,0 (+/-0,2), com o auxílio de ácido clorídrico (HCl 0,1N) ou hidróxido de sódio (NaOH 0,1N); agitar por 1 hora e autoclavar por 15 minutos a 121°C.

**Apêndice 2 - Planilha de registro de dados de teste da avaliação da toxicidade do sulfato de cobre para *R. subcapitata*. (Teste preliminar)**

Substância: sulfato de cobre (CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O)

Data do teste: 23.05.2000 a 27.05.2000

Concentração inicial de células *R. subcapitata*: 100.000 células/mL

Nº de réplicas	Concentração final (Nº de células)	Coefficiente de variação
<b>Controle</b>		
1	5.280.000	4,63%
2	5.790.000	
3	5.870.000	
4	5.690.000	
<b>0,03 mg.L<sup>-1</sup></b>		
1	5.000.000	4,59%
2	5.470.000	
3	5.340.000	
4	5.560.000	
<b>0,1 mg.L<sup>-1</sup></b>		
1	4.100.000	3,60%
2	4.160.000	
3	4.240.000	
4	4.450.000	
<b>0,3 mg.L<sup>-1</sup></b>		
1	600.000	5,26%
2	530.000	
3	560.000	
4	580.000	
<b>0,5 mg.L<sup>-1</sup></b>		
1	360.000	8,87%
2	320.000	
3	290.000	
4	330.000	

**Apêndice 3 - Planilha de registro de dados de teste da avaliação da toxicidade do sulfato de cobre para *R. subcapitata*. (Teste nº: 01)\***

Substância: sulfato de cobre (CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O)

Data do teste: 27.07.2000 a 31.07.2000

Concentração inicial de células *R. subcapitata*: 100.000 células/mL

Nº de réplicas	Concentração final (Nº de células)	Coefficiente de variação
<b>Controle</b>		
1	5.260.000	
2	5.320.000	2,59%
3	5.280.000	
4	5.560.000	
<b>0,03 mg.L<sup>-1</sup></b>		
1	5.000.000	
2	4.920.000	2,26%
3	4.800.000	
4	4.760.000	
<b>0,05 mg.L<sup>-1</sup></b>		
1	3.660.000	
2	3.890.000	3,62%
3	3.980.000	
4	3.920.000	
<b>0,08 mg.L<sup>-1</sup></b>		
1	3.670.000	
2	3.400.000	4,97%
3	3.290.000	
4	3.590.000	
<b>0,1 mg.L<sup>-1</sup></b>		
1	3.140.000	
2	3.240.000	3,04%
3	3.280.000	
4	3.380.000	
<b>0,2 mg.L<sup>-1</sup></b>		
1	1.670.000	
2	1.790.000	9,92%
3	1.580.000	
4	1.410.000	
<b>0,3 mg.L<sup>-1</sup></b>		
1	980.000	
2	950.000	7,74%
3	1.050.000	
4	870.000	

\* Nos testes nº 1 e 2 não foi realizada leitura da absorbância.

**Apêndice 4 - Planilha de registro de dados de teste da avaliação da toxicidade do sulfato de cobre para *R. subcapitata*. (Teste nº: 02)\***

Substância: sulfato de cobre ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ )

Data do teste: 19.08.2000 a 23.08.2000

Concentração inicial de células *R. subcapitata*: 100.000 células/mL

Nº de réplicas	Concentração final (Nº de células)	Coefficiente de variação
<b>Controle</b>		
1	5.390.000	
2	5.090.000	2,40%
3	5.230.000	
4	5.180.000	
<b>0,03 mg.L<sup>-1</sup></b>		
1	4.680.000	
2	4.340.000	3,35%
3	4.480.000	
4	4.620.000	
<b>0,05 mg.L<sup>-1</sup></b>		
1	3.780.000	
2	3.580.000	3,53%
3	3.880.000	
4	3.840.000	
<b>0,08 mg.L<sup>-1</sup></b>		
1	3.020.000	
2	3.450.000	5,57%
3	3.330.000	
4	3.240.000	
<b>0,1 mg.L<sup>-1</sup></b>		
1	2.990.000	
2	2.980.000	1,89%
3	3.100.000	
4	3.060.000	
<b>0,2 mg.L<sup>-1</sup></b>		
1	1.140.000	
2	1.340.000	8,60%
3	1.290.000	
4	1.400.000	
<b>0,3 mg.L<sup>-1</sup></b>		
1	970.000	
2	920.000	5,57%
3	850.000	
4	890.000	

**Apêndice 5 - Planilha de registro de dados de teste da avaliação da toxicidade do sulfato de cobre para *R. subcapitata*. (Teste nº: 03)**

Substância: sulfato de cobre ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ )

Data do teste: 21.09.2000 a 25.09.2000

Concentração inicial de células *R. subcapitata*: 100.000 células/mL

Nº de réplicas	Concentr. final (Nº de células)	Coeficiente de variação	Concentr. final (Absorbância)	Coeficiente de variação
Controle			Controle	
1	5.750.000		0,6193	
2	5.580.000	2,43%	0,6001	6,56%
3	5.860.000		0,6773	
4	5.890.000		0,6860	
0,03 mg.L <sup>-1</sup>			0,03 mg.L <sup>-1</sup>	
1	5.200.000		0,5452	
2	4.440.000	6,67%	0,4528	7,70%
3	5.030.000		0,5199	
4	4.960.000		0,5062	
0,05 mg.L <sup>-1</sup>			0,05 mg.L <sup>-1</sup>	
1	5.090.000		0,5269	
2	4.620.000	4,68%	0,4720	4,99%
3	5.010.000		0,5159	
4	4.710.000		0,4890	
0,08 mg.L <sup>-1</sup>			0,08 mg.L <sup>-1</sup>	
1	4.580.000		0,4661	
2	4.850.000	3,76%	0,4974	4,33%
3	4.800.000		0,4957	
4	4.480.000		0,4564	
0,1 mg.L <sup>-1</sup>			0,1 mg.L <sup>-1</sup>	
1	4.280.000		0,4356	
2	4.460.000	4,04%	0,4548	3,96%
3	4.470.000		0,4552	
4	4.100.000		0,4187	
0,2 mg.L <sup>-1</sup>			0,2 mg.L <sup>-1</sup>	
1	2.770.000		0,2781	
2	2.620.000	6,67%	0,2623	6,52%
3	2.370.000		0,2385	
4	2.700.000		0,2703	
0,3 mg.L <sup>-1</sup>			0,3 mg.L <sup>-1</sup>	
1	1.400.000		0,1395	
2	1.380.000	3,81%	0,1371	3,59%
3	1.500.000		0,1487	
4	1.400.000		0,1399	

**Apêndice 6 - Planilha de registro de dados de teste da avaliação da toxicidade do sulfato de cobre para *R. subcapitata*. (Teste nº: 04)**

Substância: sulfato de cobre ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ )

Data do teste: 30.11.2000 a 04.12.2000

Concentração inicial de células *R. subcapitata*: 100.000 células/mL

Nº de réplicas	Concentr. final (Nº de células)	Coeficiente de variação	Concentr. final (Absorbância)	Coeficiente de variação
Controle			Controle	
1	6.380.000		0,7986	
2	6.000.000	2,63%	0,7321	3,92%
3	6.210.000		0,7811	
4	6.100.000		0,7496	
0,03 mg.L <sup>-1</sup>			0,03 mg.L <sup>-1</sup>	
1	5.190.000		0,5421	
2	4.700.000	9,36%	0,4876	11,44%
3	5.790.000		0,6271	
4	5.680.000		0,6129	
0,05 mg.L <sup>-1</sup>			0,05 mg.L <sup>-1</sup>	
1	5.090.000		0,5272	
2	4.450.000	5,64%	0,4537	6,19%
3	4.780.000		0,4920	
4	4.920.000		0,5028	
0,08 mg.L <sup>-1</sup>			0,08 mg.L <sup>-1</sup>	
1	4.100.000		0,4185	
2	5.000.000	9,60%	0,5119	9,82%
3	4.380.000		0,4437	
4	4.960.000		0,5061	
0,1 mg.L <sup>-1</sup>			0,1 mg.L <sup>-1</sup>	
1	5.190.000		0,5427	
2	4.600.000	9,41%	0,4688	10,82%
3	4.290.000		0,4368	
4	4.260.000		0,4327	
0,2 mg.L <sup>-1</sup>			0,2 mg.L <sup>-1</sup>	
1	1.920.000		0,1924	
2	1.790.000	8,04%	0,1797	8,24%
3	1.580.000		0,1574	
4	1.820.000		0,1810	
0,3 mg.L <sup>-1</sup>			0,3 mg.L <sup>-1</sup>	
1	1.210.000		0,1167	
2	1.180.000	3,35%	0,1116	4,63%
3	1.170.000		0,1103	
4	1.260.000		0,1220	

**Apêndice 7 - Planilha de registro de dados de teste da avaliação da toxicidade do sulfato de cobre para *R. subcapitata*. (Teste nº: 05)**

Substância: sulfato de cobre ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ )

Data do teste: 08.12.2000 a 12.12.2000

Concentração inicial de células *R. subcapitata*: 100.000 células/mL

Nº de réplicas	Concentr. final (Nº de células)	Coeficiente de variação	Concentr. final (Absorbância)	Coeficiente de variação
Controle			Controle	
1	6.180.000		0,7719	
2	5.970.000	1,96%	0,7265	4,52%
3	5.910.000		0,6917	
4	6.070.000		0,7385	
0,03 mg.L <sup>-1</sup>			0,03 mg.L <sup>-1</sup>	
1	5.840.000		0,6423	
2	5.940.000	0,99%	0,6982	4,68%
3	5.810.000		0,6320	
4	5.830.000		0,6387	
0,05 mg.L <sup>-1</sup>			0,05 mg.L <sup>-1</sup>	
1	5.790.000		0,6276	
2	5.690.000	1,01%	0,6135	1,32%
3	5.680.000		0,6122	
4	5.780.000		0,6265	
0,08 mg.L <sup>-1</sup>			0,08 mg.L <sup>-1</sup>	
1	5.310.000		0,5612	
2	5.290.000	1,69%	0,5582	1,39%
3	5.490.000		0,5759	
4	5.340.000		0,5682	
0,1 mg.L <sup>-1</sup>			0,1 mg.L <sup>-1</sup>	
1	4.570.000		0,4654	
2	4.280.000	5,47%	0,4351	5,67%
3	4.470.000		0,4554	
4	4.030.000		0,4087	
0,2 mg.L <sup>-1</sup>			0,2 mg.L <sup>-1</sup>	
1	1.790.000		0,1791	
2	1.980.000	9,97%	0,1988	10,76%
3	1.750.000		0,1753	
4	1.550.000		0,1525	
0,3 mg.L <sup>-1</sup>			0,3 mg.L <sup>-1</sup>	
1	940.000		0,0924	
2	880.000	7,82%	0,0864	8,50%
3	980.000		0,0972	
4	1.060.000		0,1056	

**Apêndice 8 - Planilha de registro de dados de teste da avaliação da toxicidade do sulfato de cobre para *R. subcapitata*. (Teste nº: 06)**

Substância: sulfato de cobre ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ )

Data do teste: 09.07.2001 a 13.07.2001

Concentração inicial de células *R. subcapitata*: 100.000 células/mL

Nº de réplicas	Concentr. final (Nº de células)	Coeficiente de variação	Concentr. final (Absorbância)	Coeficiente de variação
Controle			Controle	
1	5.860.000		0,6647	
2	5.870.000	0,66%	0,6728	3,45%
3	5.810.000		0,6336	
4	5.790.000		0,6275	
0,03 mg.L <sup>-1</sup>			0,03 mg.L <sup>-1</sup>	
1	5.080.000		0,5258	
2	5.220.000	3,36%	0,5468	4,83%
3	4.900.000		0,4999	
4	5.290.000		0,5585	
0,05 mg.L <sup>-1</sup>			0,05 mg.L <sup>-1</sup>	
1	5.120.000		0,5316	
2	5.080.000	1,13%	0,5269	1,77%
3	5.010.000		0,5146	
4	5.000.000		0,5127	
0,08 mg.L <sup>-1</sup>			0,08 mg.L <sup>-1</sup>	
1	4.830.000		0,4976	
2	5.000.000	1,43%	0,5115	1,14%
3	4.940.000		0,5046	
4	4.920.000		0,5023	
0,1 mg.L <sup>-1</sup>			0,1 mg.L <sup>-1</sup>	
1	4.960.000		0,5062	
2	4.690.000	3,15%	0,4844	3,12%
3	4.770.000		0,4912	
4	4.610.000		0,4695	
0,2 mg.L <sup>-1</sup>			0,2 mg.L <sup>-1</sup>	
1	2.420.000		0,2422	
2	2.280.000	4,59%	0,2234	5,34%
3	2.530.000		0,2532	
4	2.330.000		0,2331	
0,3 mg.L <sup>-1</sup>			0,3 mg.L <sup>-1</sup>	
1	1.320.000		0,1316	
2	1.500.000	6,31%	0,1485	5,87%
3	1.420.000		0,1418	
4	1.520.000		0,1501	

**Apêndice 9 - Planilha de registro de dados de teste da avaliação da toxicidade do sulfato de zinco para *R. subcapitata*. (Teste preliminar)**

Substância: sulfato de zinco ( $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ )

Data do teste: 08.03.2001 a 12.03.2001

Concentração inicial de células *R. subcapitata*: 100.000 células/mL

Nº de réplicas	Concentração final (Nº de células)	Coefficiente de variação
<b>Controle</b>		
1	5.020.000	4,32%
2	5.280.000	
3	5.000.000	
4	5.470.000	
<b>0,01 mg.L<sup>-1</sup></b>		
1	4.880.000	2,27%
2	5.050.000	
3	4.920.000	
4	4.780.000	
<b>0,1 mg.L<sup>-1</sup></b>		
1	3.730.000	3,05%
2	3.980.000	
3	3.750.000	
4	3.880.000	
<b>1,0 mg.L<sup>-1</sup></b>		
1	240.000	7,85%
2	200.000	
3	210.000	
4	220.000	
<b>2,0 mg.L<sup>-1</sup></b>		
1	160.000	10,19%
2	150.000	
3	170.000	
4	190.000	

**Apêndice 10 - Planilha de registro de dados de teste da avaliação da toxicidade do sulfato de zinco para *R. subcapitata*. (Teste nº: 01)**

Substância: sulfato de zinco ( $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ )

Data do teste: 06.04.2001 a 10.04.2001

Concentração inicial de células *R. subcapitata*: 100.000 células/mL

Nº de réplicas	Concentr. final (Nº de células)	Coeficiente de variação	Concentr. final (Absorbância)	Coeficiente de variação
Controle			Controle	
1	6.190.000		0,7722	
2	5.850.000	3,04%	0,6626	8,42%
3	6.140.000		0,7570	
4	5.850.000		0,6601	
0,05 mg.L <sup>-1</sup>			0,05 mg.L <sup>-1</sup>	
1	5.890.000		0,6888	
2	6.130.000	2,52%	0,7532	8,35%
3	5.810.000		0,6315	
4	5.820.000		0,6379	
0,08 mg.L <sup>-1</sup>			0,08 mg.L <sup>-1</sup>	
1	5.820.000		0,6382	
2	5.730.000	1,01%	0,6182	3,56%
3	5.860.000		0,6672	
4	5.760.000		0,6203	
0,1 mg.L <sup>-1</sup>			0,1 mg.L <sup>-1</sup>	
1	5.660.000		0,6101	
2	5.810.000	3,79%	0,6335	4,79%
3	5.350.000		0,5693	
4	5.800.000		0,6291	
0,2 mg.L <sup>-1</sup>			0,2 mg.L <sup>-1</sup>	
1	4.060.000		0,4107	
2	3.800.000	3,25%	0,3815	3,60%
3	4.030.000		0,4044	
4	4.080.000		0,4131	
0,3 mg.L <sup>-1</sup>			0,3 mg.L <sup>-1</sup>	
1	1.840.000		0,1843	
2	1.600.000	8,03%	0,1586	8,59%
3	1.670.000		0,1664	
4	1.900.000		0,1904	
0,5 mg.L <sup>-1</sup>			0,5 mg.L <sup>-1</sup>	
1	680.000		0,060	
2	780.000	8,09%	0,074	10,34%
3	710.000		0,068	
4	810.000		0,076	

**Apêndice 11 - Planilha de registro de dados de teste da avaliação da toxicidade do sulfato de zinco para *R. subcapitata*. (Teste nº: 02)**

Substância: sulfato de zinco ( $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ )

Data do teste: 26.04.2001 a 30.04.2001

Concentração inicial de células *R. subcapitata*: 100.000 células/mL

Nº de réplicas	Concentr. final (Nº de células)	Coeficiente de variação	Concentr. final (Absorbância)	Coeficiente de variação
Controle			Controle	
1	5.290.000		0,5589	
2	5.590.000	2,70%	0,6040	3,71%
3	5.350.000		0,5698	
4	5.550.000		0,5956	
0,05 mg.L <sup>-1</sup>			0,05 mg.L <sup>-1</sup>	
1	4.660.000		0,4807	
2	4.470.000	4,90%	0,4554	5,49%
3	4.630.000		0,4745	
4	4.180.000		0,4241	
0,08 mg.L <sup>-1</sup>			0,08 mg.L <sup>-1</sup>	
1	4.570.000		0,4654	
2	4.070.000	5,08%	0,4166	4,92%
3	4.390.000		0,4447	
4	4.200.000		0,4268	
0,1 mg.L <sup>-1</sup>			0,1 mg.L <sup>-1</sup>	
1	3.950.000		0,3960	
2	4.070.000	1,24%	0,4162	2,07%
3	4.030.000		0,4049	
4	4.010.000		0,4021	
0,2 mg.L <sup>-1</sup>			0,2 mg.L <sup>-1</sup>	
1	2.610.000		0,2615	
2	2.700.000	2,21%	0,2706	2,21%
3	2.620.000		0,2624	
4	2.730.000		0,2731	
0,3 mg.L <sup>-1</sup>			0,3 mg.L <sup>-1</sup>	
1	1.220.000		0,1185	
2	1.180.000	8,78%	0,1114	8,88%
3	1.050.000		0,1040	
4	1.300.000		0,1283	
0,5 mg.L <sup>-1</sup>			0,5 mg.L <sup>-1</sup>	
1	370.000		0,028	
2	410.000	8,93%	0,030	12,63%
3	410.000		0,030	
4	460.000		0,037	

**Apêndice 12 - Planilha de registro de dados de teste da avaliação da toxicidade do sulfato de zinco para *R. subcapitata*. (Teste nº: 03)**

Substância: sulfato de zinco ( $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ )

Data do teste: 07.05.2001 a 11.05.2001

Concentração inicial de células *R. subcapitata*: 100.000 células/mL

Nº de réplicas	Concentr. final (Nº de células)	Coeficiente de variação	Concentr. final (Absorbância)	Coeficiente de variação
Controle			Controle	
1	5.590.000		0,6030	
2	5.840.000	2,72%	0,6428	4,63%
3	5.580.000		0,6006	
4	5.480.000		0,5748	
0,05 mg.L <sup>-1</sup>			0,05 mg.L <sup>-1</sup>	
1	5.120.000		0,5317	
2	5.130.000	1,96%	0,5320	3,11%
3	5.330.000		0,5662	
4	5.260.000		0,5535	
0,08 mg.L <sup>-1</sup>			0,08 mg.L <sup>-1</sup>	
1	4.670.000		0,4812	
2	5.120.000	5,54%	0,5310	6,11%
3	4.680.000		0,4838	
4	5.170.000		0,5404	
0,1 mg.L <sup>-1</sup>			0,1 mg.L <sup>-1</sup>	
1	5.100.000		0,5296	
2	4.690.000	4,39%	0,4858	4,36%
3	5.010.000		0,5145	
4	4.690.000		0,4850	
0,2 mg.L <sup>-1</sup>			0,2 mg.L <sup>-1</sup>	
1	2.940.000		0,2922	
2	2.680.000	4,34%	0,2682	3,99%
3	2.730.000		0,2730	
4	2.700.000		0,2700	
0,3 mg.L <sup>-1</sup>			0,3 mg.L <sup>-1</sup>	
1	700.000		0,062	
2	840.000	9,12%	0,079	12,01%
3	820.000		0,077	
4	720.000		0,065	
0,5 mg.L <sup>-1</sup>			0,5 mg.L <sup>-1</sup>	
1	430.000		0,032	
2	450.000	8,23%	0,036	10,84%
3	370.000		0,028	
4	410.000		0,028	

**Apêndice 13 - Planilha de registro de dados de teste da avaliação da toxicidade do sulfato de zinco para *R. subcapitata*. (Teste nº: 04)**

Substância: sulfato de zinco ( $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ )

Data do teste: 14.05.2001 a 18.05.2001

Concentração inicial de células *R. subcapitata*: 100.000 células/mL

Nº de réplicas	Concentr. final (Nº de células)	Coeficiente de variação	Concentr. final (Absorbância)	Coeficiente de variação
Controle			Controle	
1	5.990.000		0,7305	
2	6.010.000	0,97%	0,7355	2,59%
3	5.950.000		0,7010	
4	6.090.000		0,7452	
0,05 mg.L <sup>-1</sup>			0,05 mg.L <sup>-1</sup>	
1	5.840.000		0,6460	
2	5.820.000	0,31%	0,6372	1,12%
3	5.810.000		0,6326	
4	5.850.000		0,6472	
0,08 mg.L <sup>-1</sup>			0,08 mg.L <sup>-1</sup>	
1	5.830.000		0,6387	
2	5.830.000	0,16%	0,6385	0,32%
3	5.820.000		0,6358	
4	5.810.000		0,6342	
0,1 mg.L <sup>-1</sup>			0,1 mg.L <sup>-1</sup>	
1	4.950.000		0,5057	
2	4.930.000	3,46%	0,5034	5,15%
3	5.280.000		0,5576	
4	5.200.000		0,5434	
0,2 mg.L <sup>-1</sup>			0,2 mg.L <sup>-1</sup>	
1	3.080.000		0,3123	
2	2.990.000	1,62%	0,3075	0,89%
3	2.990.000		0,3060	
4	3.070.000		0,3102	
0,3 mg.L <sup>-1</sup>			0,3 mg.L <sup>-1</sup>	
1	700.000		0,064	
2	740.000	5,49%	0,066	4,12%
3	650.000		0,060	
4	720.000		0,065	
0,5 mg.L <sup>-1</sup>			0,5 mg.L <sup>-1</sup>	
1	440.000		0,034	
2	430.000	8,90%	0,032	9,55%
3	360.000		0,027	
4	430.000		0,032	

**Apêndice 14 - Planilha de registro de dados de teste da avaliação da toxicidade do sulfato de zinco para *R. subcapitata*. (Teste nº: 05)**

Substância: sulfato de zinco ( $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ )

Data do teste: 21.05.2001 a 25.05.2001

Concentração inicial de células *R. subcapitata*: 100.000 células/mL

Nº de réplicas	Concentr. final (Nº de células)	Coeficiente de variação	Concentr. final (Absorbância)	Coeficiente de variação
Controle			Controle	
1	5.860.000		0,6685	
2	5.850.000	2,86%	0,6564	6,09%
3	5.520.000		0,5811	
4	5.840.000		0,6460	
0,05 mg.L <sup>-1</sup>			0,05 mg.L <sup>-1</sup>	
1	4.630.000		0,4740	
2	4.640.000	1,91%	0,4750	2,20%
3	4.450.000		0,4532	
4	4.560.000		0,4646	
0,08 mg.L <sup>-1</sup>			0,08 mg.L <sup>-1</sup>	
1	4.140.000		0,4205	
2	4.060.000	5,00%	0,4145	5,02%
3	4.440.000		0,4527	
4	4.490.000		0,4547	
0,1 mg.L <sup>-1</sup>			0,1 mg.L <sup>-1</sup>	
1	4.230.000		0,4292	
2	4.250.000	2,80%	0,4312	2,72%
3	4.050.000		0,4139	
4	4.030.000		0,4082	
0,2 mg.L <sup>-1</sup>			0,2 mg.L <sup>-1</sup>	
1	3.240.000		0,3219	
2	3.070.000	4,50%	0,3114	3,41%
3	3.280.000		0,3256	
4	2.980.000		0,3015	
0,3 mg.L <sup>-1</sup>			0,3 mg.L <sup>-1</sup>	
1	820.000		0,077	
2	860.000	5,02%	0,083	6,74%
3	840.000		0,080	
4	920.000		0,090	
0,5 mg.L <sup>-1</sup>			0,5 mg.L <sup>-1</sup>	
1	350.000		0,026	
2	370.000	3,20%	0,028	4,27%
3	370.000		0,028	
4	350.000		0,026	

**Apêndice 15 - Planilha de registro de dados de teste da avaliação da toxicidade do sulfato de zinco para *R. subcapitata*. (Teste nº: 06)**

Substância: sulfato de zinco ( $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ )

Data do teste: 21.06.2001 a 25.06.2001

Concentração inicial de células *R. subcapitata*: 100.000 células/mL

Nº de réplicas	Concentr. final (Nº de células)	Coeficiente de variação	Concentr. final (Absorbância)	Coeficiente de variação
Controle			Controle	
1	5.220.000		0,5470	
2	5.110.000	1,11%	0,5308	1,67%
3	5.150.000		0,5381	
4	5.090.000		0,5278	
0,05 mg.L <sup>-1</sup>			0,05 mg.L <sup>-1</sup>	
1	4.540.000		0,4604	
2	4.800.000	2,31%	0,4960	3,11%
3	4.630.000		0,4741	
4	4.650.000		0,4766	
0,08 mg.L <sup>-1</sup>			0,08 mg.L <sup>-1</sup>	
1	4.380.000		0,4438	
2	4.600.000	2,86%	0,4680	3,63%
3	4.670.000		0,4822	
4	4.470.000		0,4551	
0,1 mg.L <sup>-1</sup>			0,1 mg.L <sup>-1</sup>	
1	4.190.000		0,4254	
2	4.220.000	2,15%	0,4288	2,03%
3	4.090.000		0,4177	
4	4.310.000		0,4389	
0,2 mg.L <sup>-1</sup>			0,2 mg.L <sup>-1</sup>	
1	3.150.000		0,3190	
2	3.390.000	4,13%	0,3440	4,05%
3	3.100.000		0,3140	
4	3.300.000		0,3294	
0,3 mg.L <sup>-1</sup>			0,3 mg.L <sup>-1</sup>	
1	1.760.000		0,1762	
2	1.650.000	4,23%	0,1651	4,45%
3	1.660.000		0,1665	
4	1.590.000		0,1582	
0,5 mg.L <sup>-1</sup>			0,5 mg.L <sup>-1</sup>	
1	460.000		0,037	
2	430.000	4,57%	0,033	6,89%
3	480.000		0,039	
4	450.000		0,036	

**Apêndice 16 - Determinação da CE(I)50; 96 horas do sulfato de cobre para *R. subcapitata*, através do programa ICp. (Teste nº: 1)**

\*\*\* Inhibition Concentration Percentage Estimate \*\*\*

Toxicant/Effluent: Sulfato de Cobre - Teste 1

Test Start Date: 27.07.2000 Test Ending Date: 31.07.2000

Test Species: *Raphidocelis subcapitata* - Test Duration: 96 horas

---

Number Replicates	Concentration mg.L <sup>-1</sup>	Response Means	Standard Deviation
4	0.000	5.355.000	138.924
4	0.030	4.870.000	110.151
4	0.050	3.862.500	140.089
4	0.080	3.487.500	173.661
4	0.100	3.260.000	99.331
4	0.200	1.612.500	160.078
4	0.300	962.500	74.554

---

The Linear Interpolation Estimate: 0.1354 Entered P Value: 50

---

Number of Resamplings: 1000 1000 Resamples Generated

The Bootstrap Estimates Mean: 0.1353 Standard Deviation: 0.0029

Original Confidence Limits: Lower: 0.1293 Upper: 0.1409

Expanded Confidence Limits: Lower: 0.1256 Upper: 0.1442

---

**Apêndice 17 - Determinação da CE(I)50; 96 horas do sulfato de cobre para *R. subcapitata*, através do programa ICp. (Teste nº: 2)**

\*\*\* Inhibition Concentration Percentage Estimate \*\*\*

Toxicant/Effluent: Sulfato de Cobre - Teste 2

Test Start Date: 19.08.2000 Test Ending Date: 23.08.2000

Test Species: *Raphidocelis subcapitata* - Test Duration: 96 horas

Number Replicates	Concentration mg.L <sup>-1</sup>	Response Means	Standard Deviation
4	0.000	5.222.500	125.797
4	0.030	4.530.000	151.877
4	0.050	3.770.000	133.166
4	0.080	3.260.000	181.659
4	0.100	3.032.500	57.373
4	0.200	1.292.500	111.168
4	0.300	907.500	50.580

The Linear Interpolation Estimate: 0.1242 Entered P Value: 50

Number of Resamplings: 1000 1000 Resamples Generated

The Bootstrap Estimates Mean: 0.1241 Standard Deviation: 0.0021

Original Confidence Limits: Lower: 0.1201 Upper: 0.1275

Expanded Confidence Limits: Lower: 0.1176 Upper: 0.1295

**Apêndice 18 - Determinação da CE(I)50; 96 horas do sulfato de cobre para *R. subcapitata*, através do programa ICp. (Teste nº: 3)**

\*\*\* Inhibition Concentration Percentage Estimate \*\*\*

Toxicant/Effluent: Sulfato de Cobre - Teste 3

Test Start Date: 21.09.2000 Test Ending Date: 25.09.2000

Test Species: *Raphidocelis subcapitata* - Test Duration: 96 horas

Number Replicates	Concentration mg.L <sup>-1</sup>	Response Means	Standard Deviation
4	0.000	5.770.000	140.238
4	0.030	4.907.500	327.554
4	0.050	4.857.500	227.651
4	0.080	4.677.500	176.328
4	0.100	4.327.500	175.000
4	0.200	2.615.000	174.452
4	0.300	1.420.000	54.160

The Linear Interpolation Estimate: 0.1842 Entered P Value: 50

Number of Resamplings: 1000 1000 Resamples Generated

The Bootstrap Estimates Mean: 0.1850 Standard Deviation: 0.0046

Original Confidence Limits: Lower: 0.1767 Upper: 0.1932

Expanded Confidence Limits: Lower: 0.1722 Upper: 0.1986

**Apêndice 19 - Determinação da CE(I)50; 96 horas do sulfato de cobre para *R. subcapitata*, através do programa ICp. (Teste nº: 4)**

\*\*\* Inhibition Concentration Percentage Estimate \*\*\*

Toxicant/Effluent: Sulfato de Cobre - Teste 4

Test Start Date: 30.11.2000 Test Ending Date: 04.12.2000

Test Species: *Raphidocelis subcapitata* - Test Duration: 96 horas

Number Replicates	Concentration mg.L <sup>-1</sup>	Response Means	Standard Deviation
4	0.000	6.172.500	162.763
4	0.030	5.340.000	500.067
4	0.050	4.810.000	271.416
4	0.080	4.610.000	442.568
4	0.100	4.585.000	431.625
4	0.200	1.777.500	142.916
4	0.300	1.205.000	40.415

The Linear Interpolation Estimate: 0.1534 Entered P Value: 50

Number of Resamplings: 1000 1000 Resamples Generated

The Bootstrap Estimates Mean: 0.1525 Standard Deviation: 0.0031

Original Confidence Limits: Lower: 0.1463 Upper: 0.1584

Expanded Confidence Limits: Lower: 0.1420 Upper: 0.1614

**Apêndice 20 - Determinação da CE(I)50; 96 horas do sulfato de cobre para *R. subcapitata*, através do programa ICp. (Teste nº: 5)**

\*\*\* Inhibition Concentration Percentage Estimate \*\*\*

Toxicant/Effluent: Sulfato de Cobre - Teste 5

Test Start Date: 08.12.2000 Test Ending Date: 12.12.2000

Test Species: *Raphidocelis subcapitata* - Test Duration: 96 horas

---

Number Replicates	Concentration mg.L <sup>-1</sup>	Response Means	Standard Deviation
4	0.000	6.032.500	118.427
4	0.030	5.855.000	58.023
4	0.050	5.735.000	58.023
4	0.080	5.357.500	90.692
4	0.100	4.337.500	237.680
4	0.200	1.767.500	176.328
4	0.300	965.000	75.498

---

The Linear Interpolation Estimate: 0.1514 Entered P Value: 50

---

Number of Resamplings: 1000 1000 Resamples Generated

The Bootstrap Estimates Mean: 0.1514 Standard Deviation: 0.0027

Original Confidence Limits: Lower: 0.1461 Upper: 0.1566

Expanded Confidence Limits: Lower: 0.1429 Upper: 0.1598

---

**Apêndice 21 - Determinação da CE(I)50; 96 horas do sulfato de cobre para *R. subcapitata*, através do programa ICp. (Teste nº: 6)**

\*\*\* Inhibition Concentration Percentage Estimate \*\*\*

Toxicant/Effluent: Sulfato de Cobre - Teste 6

Test Start Date: 09.07.2001 Test Ending Date: 13.07.2001

Test Species: *Raphidocelis subcapitata* - Test Duration: 96 horas

Number Replicates	Concentration mg.L <sup>-1</sup>	Response Means	Standard Deviation
4	0.000	5.832.500	38.622
4	0.030	5.122.500	172.119
4	0.050	5.055.000	59.161
4	0.080	4.922.500	70.415
4	0.100	4.757.500	149.972
4	0.200	2.377.500	127.900
4	0.300	1.440.000	90.921

The Linear Interpolation Estimate: 0.1774 Entered P Value: 50

Number of Resamplings: 1000 1000 Resamples Generated

The Bootstrap Estimates Mean: 0.1774 Standard Deviation: 0.0020

Original Confidence Limits: Lower: 0.1737 Upper: 0.1814

Expanded Confidence Limits: Lower: 0.1715 Upper: 0.1839

**Apêndice 22 - Determinação da CE(I)50; 96 horas do sulfato de zinco para *R. subcapitata*, através do programa ICp. (Teste nº: 1)**

\*\*\* Inhibition Concentration Percentage Estimate \*\*\*

Toxicant/Effluent: Sulfato de Zinco - Teste 1

Test Start Date: 06.04.2001 Test Ending Date: 10.04.2001

Test Species: *Raphidocelis subcapitata* - Test Duration: 96 horas

Number Replicates	Concentration mg.L <sup>-1</sup>	Response Means	Standard Deviation
4	0.000	6.007.500	183.007
4	0.050	5.837.500	251.578
4	0.080	5.792.500	58.523
4	0.100	5.655.000	214.554
4	0.200	3.992.500	129.968
4	0.300	1.752.500	140.801
4	0.500	745.000	60.277

The Linear Interpolation Estimate: 0.2441 Entered P Value: 50

Number of Resamplings: 1000 1000 Resamples Generated

The Bootstrap Estimates Mean:0.2441 Standard Deviation: 0.0025

Original Confidence Limits: Lower: 0.2392 Upper: 0.2487

Expanded Confidence Limits: Lower: 0.2362 Upper: 0.2514

**Apêndice 23 - Determinação da CE(I)50; 96 horas do sulfato de zinco para *R. subcapitata*, através do programa ICp. (Teste nº: 2)**

\*\*\* Inhibition Concentration Percentage Estimate \*\*\*

Toxicant/Effluent: Sulfato de Zinco - Teste 2

Test Start Date: 26.04.2001 Test Ending Date: 30.04.2001

Test Species: *Raphidocelis subcapitata* - Test Duration: 96 horas

Number Replicates	Concentration mg.L <sup>-1</sup>	Response Means	Standard Deviation
4	0.000	5.445.000	147.309
4	0.050	4.485.000	219.773
4	0.080	4.307.500	218.842
4	0.100	4.015.000	50.000
4	0.200	2.665.000	59.161
4	0.300	1.187.500	104.363
4	0.500	412.500	36.856

The Linear Interpolation Estimate: 0.1957 Entered P Value: 50

Number of Resamplings: 1000 1000 Resamples Generated

The Bootstrap Estimates Mean: 0.1958 Standard Deviation: 0.0030

Original Confidence Limits: Lower: 0.1898 Upper: 0.2014

Expanded Confidence Limits: Lower: 0.1862 Upper: 0.2048

**Apêndice 24 - Determinação da CE(I)50; 96 horas do sulfato de zinco para *R. subcapitata*, através do programa ICp. (Teste nº: 3)**

\*\*\* Inhibition Concentration Percentage Estimate \*\*\*

Toxicant/Effluent: Sulfato de Zinco - Teste 3

Test Start Date: 07.05.2001 Test Ending Date: 11.05.2001

Test Species: *Raphidocelis subcapitata* - Test Duration: 96 horas

Number Replicates	Concentration mg.L <sup>-1</sup>	Response Means	Standard Deviation
4	0.000	5.622.500	153.270
4	0.050	5.210.000	102.307
4	0.080	4.910.000	272.152
4	0.100	4.872.500	213.912
4	0.200	2.762.500	120.104
4	0.300	770.000	70.238
4	0.500	415.000	34.157

The Linear Interpolation Estimate: 0.1977 Entered P Value: 50

Number of Resamplings: 1000 1000 Resamples Generated

The Bootstrap Estimates Mean: 0.1976 Standard Deviation: 0.0029

Original Confidence Limits: Lower: 0.1926 Upper: 0.2034

Expanded Confidence Limits: Lower: 0.1896 Upper: 0.2068

**Apêndice 25 - Determinação da CE(I)50; 96 horas do sulfato de zinco para *R. subcapitata*, através do programa ICp. (Teste nº: 4)**

\*\*\* Inhibition Concentration Percentage Estimate \*\*\*

Toxicant/Effluent: Sulfato de Zinco - Teste 4

Test Start Date: 14.05.2001 Test Ending Date: 18.05.2001

Test Species: *Raphidocelis subcapitata* - Test Duration: 96 horas

Number Replicates	Concentration mg.L <sup>-1</sup>	Response Means	Standard Deviation
4	0.000	6.010.000	58.878
4	0.050	5.830.000	18.257
4	0.080	5.822.500	9.574
4	0.100	5.090.000	176.446
4	0.200	3.032.500	49.244
4	0.300	702.500	38.622
4	0.500	415.000	36.968

The Linear Interpolation Estimate: 0.2012 Entered P Value: 50

Number of Resamplings: 1000 1000 Resamples Generated

The Bootstrap Estimates Mean: 0.2012 Standard Deviation: 0.0011

Original Confidence Limits: Lower: 0.1989 Upper: 0.2033

Expanded Confidence Limits: Lower: 0.1975 Upper: 0.2045

**Apêndice 26 - Determinação da CE(I)50; 96 horas do sulfato de zinco para *R. subcapitata*, através do programa ICp. (Teste nº: 5)**

\*\*\* Inhibition Concentration Percentage Estimate \*\*\*

Toxicant/Effluent: Sulfato de Zinco - Teste 5

Test Start Date: 21.05.2001 Test Ending Date: 25.05.2001

Test Species: *Raphidocelis subcapitata* - Test Duration: 96 horas

Number Replicates	Concentration mg.L <sup>-1</sup>	Response Means	Standard Deviation
4	0.000	5.767.500	165.202
4	0.050	4.570.000	87.560
4	0.080	4.282.500	214.223
4	0.100	4.140.000	116.046
4	0.200	3.142.500	141.510
4	0.300	860.000	43.205
4	0.500	360.000	11.547

The Linear Interpolation Estimate: 0.2113 Entered P Value: 50

Number of Resamplings: 1000 1000 Resamples Generated

The Bootstrap Estimates Mean: 0.2113 Standard Deviation: 0.0027

Original Confidence Limits: Lower: 0.2056 Upper: 0.2163

Expanded Confidence Limits: Lower: 0.2022 Upper: 0.2192

**Apêndice 27 - Determinação da CE(I)50; 96 horas do sulfato de zinco para *R. subcapitata*, através do programa ICp. (Teste nº: 6)**

\*\*\* Inhibition Concentration Percentage Estimate \*\*\*

Toxicant/Effluent: Sulfato de Zinco - Teste 6

Test Start Date: 21.06.2001 Test Ending Date: 25.06.2001

Test Species: *Raphidocelis subcapitata* - Test Duration: 96 horas

Number Replicates	Concentration mg.L <sup>-1</sup>	Response Means	Standard Deviation
4	0.000	5.142.500	57.373
4	0.050	4.655.000	107.858
4	0.080	4.530.000	129.872
4	0.100	4.202.500	90.692
4	0.200	3.235.000	133.791
4	0.300	1.665.000	70.475
4	0.500	455.000	20.817

The Linear Interpolation Estimate: 0.2423 Entered P Value: 50

Number of Resamplings: 1000 1000 Resamples Generated

The Bootstrap Estimates Mean: 0.2423 Standard Deviation: 0.0024

Original Confidence Limits: Lower: 0.2375 Upper: 0.2466

Expanded Confidence Limits: Lower: 0.2346 Upper: 0.2492

**Apêndice 28 - Planilha de registro de dados de teste da avaliação da toxicidade de amostras ambientais para *R. subcapitata*. (Teste nº: 1)**

Tipo de amostra: água superficial

Data do teste: 16.08.2001 a 20.08.2001

Concentração inicial de células *R. subcapitata*: 100.000 células/mL

Nº de réplicas	Concentr. final (Nº de células)	Coefficiente de variação	Concentr. final (Absorbância)	Coefficiente de variação
Controle			Controle	
1	5.670.000		0,6112	
2	5.830.000	3,72%	0,6394	5,43%
3	5.500.000		0,5764	
4	5.350.000		0,5691	
Ponto 1			Ponto 1	
1	4.650.000		0,4764	
2	4.400.000	5,76%	0,4454	6,63%
3	5.050.000		0,5215	
4	4.800.000		0,4968	
Ponto 2			Ponto 2	
1	4.820.000		0,4961	
2	4.490.000	3,54%	0,4578	4,01%
3	4.850.000		0,4979	
4	4.800.000		0,4952	
Ponto 3			Ponto 3	
1	4.700.000		0,4877	
2	5.130.000	4,41%	0,5321	4,77%
3	5.000.000		0,5118	
4	5.200.000		0,5434	
Ponto 4			Ponto 4	
1	5.230.000		0,5494	
2	4.920.000	7,28%	0,5027	4,95%
3	5.140.000		0,5369	
4	5.820.000		0,4969	

**Apêndice 29 - Planilha de registro de dados de teste da avaliação da toxicidade de amostras ambientais para *R. subcapitata*. (Teste nº: 2)**

Tipo de amostra: água superficial

Data do teste: 10.08.2001 a 14.08.2001

Concentração inicial de células *R. subcapitata*: 100.000 células/mL

Nº de réplicas	Concentr. final (Nº de células)	Coefficiente de variação	Concentr. final (Absorbância)	Coefficiente de variação
Controle			Controle	
1	5.800.000		0,6294	
2	5.860.000	0,55%	0,6672	2,98%
3	5.850.000		0,6557	
Ponto 1			Ponto 1	
1	5.070.000		0,5234	
2	5.020.000	3,01%	0,5177	2,99%
3	4.790.000		0,4945	
Ponto 2			Ponto 2	
1	5.840.000		0,6430	
2	5.560.000	2,52%	0,5978	3,70%
3	5.760.000		0,6202	
Ponto 3			Ponto 3	
1	5.270.000		0,5555	
2	5.140.000	1,27%	0,5356	1,85%
3	5.230.000		0,5480	
Ponto 4			Ponto 4	
1	5.780.000		0,6262	
2	5.810.000	0,26%	0,6335	0,55%
3	5.800.000		0,6303	
Ponto 5			Ponto 5	
1	3.640.000		0,3656	
2	3.700.000	6,08%	0,3722	5,66%
3	3.300.000		0,3347	
Ponto 6			Ponto 6	
1	5.750.000		0,6197	
2	5.690.000	1,81%	0,6130	2,05%
3	5.550.000		0,5950	
Ponto 7			Ponto 7	
1	5.530.000		0,5862	
2	5.540.000	0,78%	0,5894	1,81%
3	5.610.000		0,6066	

**Apêndice 30 - Planilha de registro de dados de teste da avaliação da toxicidade de amostras ambientais para *R. subcapitata*. (Teste nº: 3)**

Tipo de amostra: água superficial

Data do teste: 10.11.2001 a 14.11.2001

Concentração inicial de células *R. subcapitata*: 100.000 células/mL

Nº de réplicas	Concentr. final (Nº de células)	Coeficiente de variação	Concentr. final (Absorbância)	Coeficiente de variação
Controle			Controle	
1	5.670.000		0,6116	
2	5.500.000	4,56%	0,5763	6,08%
3	5.180.000		0,5414	
Ponto 1			Ponto 1	
1	4.870.000		0,4980	
2	4.700.000	4,00%	0,4870	4,10%
3	5.090.000		0,5274	
Ponto 2			Ponto 2	
1	4.540.000		0,4611	
2	4.630.000	1,07%	0,4749	1,45%
3	4.620.000		0,4718	
Ponto 3			Ponto 3	
1	4.650.000		0,4784	
2	4.020.000	8,25%	0,4055	9,15%
3	4.070.000		0,4158	
Ponto 4			Ponto 4	
1	4.150.000		0,4216	
2	4.010.000	7,62%	0,4027	8,63%
3	4.630.000		0,4742	
Ponto 5			Ponto 5	
1	2.570.000		0,2575	
2	2.560.000	1,72%	0,2560	1,72%
3	2.490.000		0,2492	
Ponto 6			Ponto 6	
1	4.560.000		0,4646	
2	4.780.000	4,71%	0,4929	6,15%
3	4.350.000		0,4358	
Ponto 7			Ponto 7	
1	4.310.000		0,4387	
2	4.540.000	6,49%	0,4616	6,61%
3	4.900.000		0,4991	

**Apêndice 31 - Planilha de registro de dados de teste da avaliação da toxicidade de amostras ambientais para *R. subcapitata*. (Teste nº: 4)**

Tipo de amostra: água subterrânea

Data do teste: 13.09.2001 a 17.09.2001

Concentração inicial de células *R. subcapitata*: 100.000 células/mL

Nº de réplicas	Concentr. final (Nº de células)	Coeficiente de variação	Concentr. final (Absorbância)	Coeficiente de variação
Controle			Controle	
1	5.790.000		0,6277	
2	5.730.000	0,80%	0,6189	1,52%
3	5.830.000		0,6385	
4	5.740.000		0,6181	
Poço 1			Poço 1	
1	4.660.000		0,4792	
2	4.020.000	6,17%	0,4042	7,06%
3	4.440.000		0,4511	
4	4.290.000		0,4366	
Poço 2			Poço 2	
1	1.830.000		0,1830	
2	1.870.000	2,71%	0,1877	2,71%
3	1.770.000		0,1779	
4	1.770.000		0,1773	
Poço 3			Poço 3	
1	1.780.000		0,1784	
2	1.560.000	7,32%	0,1552	7,89%
3	1.660.000		0,1663	
4	1.510.000		0,1492	
Poço 4			Poço 4	
1	3.690.000		0,3715	
2	3.310.000	5,91%	0,3336	6,12%
3	3.320.000		0,3286	
4	3.320.000		0,3283	

**Apêndice 32 - Planilha de registro de dados de teste da avaliação da toxicidade de amostras ambientais para *R. subcapitata*. (Teste nº: 5)**

Tipo de amostra: água subterrânea

Data do teste: 21.09.2001 a 25.09.2001

Concentração inicial de células *R. subcapitata*: 100.000 células/mL

Nº de réplicas	Concentr. final (Nº de células)	Coeficiente de variação	Concentr. final (Absorbância)	Coeficiente de variação
Controle			Controle	
1	5.860.000		0,6462	
2	5.670.000	2,48%	0,6117	4,02%
3	5.530.000		0,5876	
4	5.610.000		0,6061	
Poço 5			Poço 5	
1	5.040.000		0,5208	
2	5.560.000	6,06%	0,5949	8,12%
3	5.780.000		0,6264	
4	5.250.000		0,5520	
Poço 6			Poço 6	
1	1.970.000		0,1970	
2	2.520.000	11,49%	0,2528	11,47%
3	2.560.000		0,2564	
4	2.330.000		0,2343	
Poço 7			Poço 7	
1	2.550.000		0,2559	
2	2.500.000	10,58%	0,2505	11,57%
3	2.990.000		0,3066	
4	3.070.000		0,3113	
Poço 8			Poço 8	
1	1.330.000		0,1325	
2	1.310.000	2,36%	0,1295	3,48%
3	1.340.000		0,1337	
4	1.270.000		0,1237	
Poço 9			Poço 9	
1	2.550.000		0,2552	
2	2.760.000	6,22%	0,2763	6,06%
3	2.580.000		0,2583	
4	2.370.000		0,2386	

**Apêndice 33 - Planilha de registro de dados de teste da avaliação da toxicidade de amostras ambientais para *R. subcapitata*. (Teste nº: 6)**

Tipo de amostra: água subterrânea

Data do teste: 14.01.2002 a 18.01.2002

Concentração inicial de células *R. subcapitata*: 100.000 células/mL

Nº de réplicas	Concentr. final (Nº de células)	Coeficiente de variação	Concentr. final (Absorbância)	Coeficiente de variação
Controle			Controle	
1	4.970.000		0,5089	
2	5.560.000	9,97%	0,5950	12,57%
3	4.500.000		0,4572	
4	5.560.000		0,5941	
Poço 1			Poço 1	
1	2.190.000		0,2192	
2	2.330.000	5,03%	0,2332	5,03%
3	2.130.000		0,2138	
4	2.370.000		0,2378	
Poço 2			Poço 2	
1	780.000		0,0981	
2	720.000	10,37%	0,0940	11,80%
3	610.000		0,0754	
4	790.000		0,0978	
Poço 3			Poço 3	
1	290.000		0,0343	
2	310.000	16,73%	0,0399	17,15%
3	250.000		0,0324	
4	210.000		0,0261	
Poço 4			Poço 4	
1	1.550.000		0,1530	
2	1.570.000	8,26%	0,1560	8,83%
3	1.660.000		0,1663	
4	1.850.000		0,1853	
Poço 5			Poço 5	
1	3.880.000		0,3892	
2	3.900.000	6,72%	0,3912	6,36%
3	3.500.000		0,3517	
4	3.430.000		0,3475	

**Apêndice 34 - Planilha de registro de dados de teste da avaliação da toxicidade de amostras ambientais para *R. subcapitata*. (Teste nº: 7)**

Tipo de amostra: água subterrânea

Data do teste: 18.01.2002 a 22.01.2002

Concentração inicial de células *R. subcapitata*: 100.000 células/mL

Nº de réplicas	Concentr. final (Nº de células)	Coeficiente de variação	Concentr. final (Absorbância)	Coeficiente de variação
Controle			Controle	
1	5.560.000		0,5958	
2	4.560.000	8,31%	0,4645	10,36%
3	5.330.000		0,5662	
4	5.250.000		0,5500	
Poço 6			Poço 6	
1	4.900.000		0,4997	
2	5.570.000	6,41%	0,5982	8,87%
3	5.100.000		0,5294	
4	5.570.000		0,5965	
Poço 7			Poço 7	
1	3.220.000		0,3201	
2	4.160.000	10,54%	0,4228	11,36%
3	3.900.000		0,3914	
4	3.760.000		0,3784	
Poço 8			Poço 8	
1	1.930.000		0,1939	
2	1.550.000	17,74%	0,1551	17,42%
3	1.250.000		0,1274	
4	1.550.000		0,1532	
Poço 9			Poço 9	
1	5.460.000		0,5725	
2	5.200.000	9,27%	0,5432	10,89%
3	5.090.000		0,5261	
4	4.370.000		0,4422	