

GABRIELA MARTINHÃO IGNÁCIO

**TOXICIDADE DE COBRE EM CÉLULAS DE *SELENASTRUM*
CAPRICORNUTUM PRINTZ (CHLOROCOCCALES, CHLOROPHYCEAE)**

**Monografia apresentada para a obtenção do
título de Bacharel em Ciências do Mar, Centro
de Estudos do Mar, Setor de Ciências da
Terra, Universidade Federal do Paraná.**

**Orientadora: Prof.^a Dr.^a Ana Teresa Lombardi
Co-orientadora: Prof.^a Dr.^a Maria da Graça G.
Melão**

PONTAL DO PARANÁ

2004

Quando vim da minha terra,
se é que vim da minha terra
(não estou morto por lá?),
a correnteza do rio
me susurrou vagamente
que eu havia de quedar
lá donde me despedia.

Os morros, empalidecidos
no entrecerrar-se da tarde,
pareciam me dizer
que não se pode voltar,
porque tudo é conseqüência
de um certo nascer ali.

Quando vim, se é que vim
de algum para outro lugar,
o mundo girava, alheio
à minha baça pessoa,
e no seu giro entrevi
que não se vai nem se volta
de sítio algum a nenhum.

Que carregamos as coisas,
moldura da nossa vida,
rígida cerca de arame,
na mais anônima célula,
e um chão, um riso, uma voz
ressoam incessantemente
em nossas fundas paredes.

Novas coisas, sucedendo-se,
iludem a nossa fome
de primitivo alimento.
As descobertas são máscaras
do mais obscuro real,
essa ferida alastrada
na pele de nossas almas.

Quando vim da minha terra,
não vim, perdi-me no espaço,
na ilusão de ter saído.
Ai de mim, nunca saí.
Lá estou eu, enterrado
por baixo de falas mansas,
por baixo de negras sombras,
por baixo de lavras de ouro,
por baixo de gerações,
por baixo, eu sei, de mim mesmo,
este vivente enganado,
enganoso.

AGRADECIMENTOS

À Dr.^a Ana Teresa Lombardi pela orientação, ajuda e dedicação neste trabalho, dispensando tempo precioso com sua família para me socorrer sempre que precisei, e que em muitos momentos foi como uma mãe. Agradeço também pela oportunidade de ter desenvolvido minha monografia em São Carlos e aberto novos horizontes.

À Dr.^a Maria da Graça G. Melão pela co-orientação e disponibilização do laboratório e material necessário para o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Dr. Armando A. H. Vieira, chefe do Laboratório de Ficologia da Universidade Federal de São Carlos, pelos inóculos.

À Liciane C. Siqueira Rosa pela ajuda com as análises de clorofila.

À Mariluci Zanela por estar sempre disposta a ajudar.

Ao Robert por me ajudar com os milhares de gráficos.

Ao amigos do Laboratório de Plâncton da UFSCar; Patrícia F. M. Nogueira, por me ensinar muitos procedimentos de laboratório, Irene Lucinda, pelo contagiante bom-humor, Rodrigo Choueri e Paloma Gusso, pela imensa ajuda durante todo o trabalho, por cuidarem dos meus experimentos quando fiquei doente e pelas intermináveis partidas de canastra.

À Karina, Aninha e Maiara, pela convivência e amizade verdadeira, levarei vocês no coração para toda vida.

À turma de 2000, pela convivência e pelas dificuldades que passamos juntos durante esses cinco anos, nunca me esquecerei de vocês.

Aos amigos Aninha, Robert e Gê, por serem pessoas maravilhosas que deixaram nossa casa sempre divertida e por terem se tornado minha segunda família.

Ao meu grande amigo Marcelo Zanin, que me ajudou bastante durante minha estadia em São Carlos e pelas intermináveis conversas.

Ao escotismo, por ter me proporcionado viver em um ambiente que me preparou para agir sempre de maneira correta na vida, tanto pessoal quanto profissionalmente. Pelas grandes aventuras que passei, pelos verdadeiros amigos e pelos ensinamentos do Minhão.

Aos grandes amigos de Marília, Fã, Camila, Processinho, Tici, Mel, Marcela e Jana, que mesmo longe nunca esqueceram de mim.

À minha família, em especial meus avós José e Lázara pelo amor e preocupação e por fazerem dos almoços de domingo um “grande evento”, a todos os primos, em especial Amanda, Lara e Bia por serem praticamente minhas “irmãzinhas”, pelos momentos alegres e de carinho e pelas histórias mirabolantes..., a todos os tios, em especial Wil e Mali, Beto e Má pelo apoio e preocupação.

À minha irmã Juliana, com quem compartilho o amor pela oceanografia, minha melhor amiga e companheira, por ter suportado esses anos de saudade através de milhares de e-mails e telefonemas trocados e pelo imenso apoio e ao meu irmão Eduardo pela amizade, críticas construtivas e pelas “aulas” de francês.

Aos meus pais Frederico e Salete, pelo imenso amor e apoio nos momentos mais difíceis e por estarem sempre ao meu lado, sempre dispostos a fazer uma viagem de mudança (e não foram poucas!!) e por fazerem de tudo para tornar minha vida cada vez melhor e mais feliz.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	
LISTA DE FIGURAS	
RESUMO	
1 INTRODUÇÃO	
2 OBJETIVOS	
3 MATERIAIS E MÉTODOS	
3.1 CULTURAS ALGAIS	
3.2 CONTAGEM DE CÉLULAS	
3.3 CLOROFILA-A	
3.4 METAL PARTICULADO	
3.5 METAL LIVRE	
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	
5 CONCLUSÃO	
REFERÊNCIAS	
ANEXOS	

LISTA DE TABELAS

- TABELA 1 - COMPOSIÇÃO DO MEIO DE CULTURA DE ÁGUA DOCE WC (GUILLARD E LORENZEN, 1972)
- TABELA 2 - DADOS DE CONCENTRAÇÃO TOTAL E IÔNICA DE COBRE RELACIONADOS ÀS TAXAS DE CRESCIMENTO NOS EXPERIMENTOS SEM PRESENÇA DE MOD
- TABELA 3 - DADOS DE CONCENTRAÇÃO TOTAL E IÔNICA DE COBRE RELACIONADOS ÀS TAXAS DE CRESCIMENTO NOS EXPERIMENTOS COM PRESENÇA DE MOD
- TABELA 4 - VARIAÇÃO DO NÚMERO DE CÉLULAS.ML⁻¹ EM FUNÇÃO DO TEMPO EXPERIMENTAL E DA CONCENTRAÇÃO DE COBRE NOMINAL NOS EXPERIMENTOS SEM MOD
- TABELA 5 - VARIAÇÃO DO NÚMERO DE CÉLULAS.ML⁻¹ EM FUNÇÃO DO TEMPO EXPERIMENTAL E DA CONCENTRAÇÃO DE COBRE NOMINAL NOS EXPERIMENTOS COM MOD

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1 - PADRÃO TÍPICO DE CRESCIMENTO APRESENTADO POR UMA ALGA UNICELULAR CULTIVADA EM CULTURA. MODIFICADO DE FOGG (1975)
- FIGURA 2 - CURVA DE CALIBRAÇÃO PARA O ELETRODO SELETIVO A ÍON COBRE. FORÇA IÔNICA = 2×10^{-2} M (NaNO_3), PH = 5,0
- FIGURA 3 - LOG DA CONCENTRAÇÃO DE COBRE LIVRE EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DO LOG DA CONCENTRAÇÃO MOLAR DE COBRE CALCULADA (OU NOMINAL) PARA TODAS AS CONCENTRAÇÕES EMPREGADAS NOS BIOENSAIOS, COM ADIÇÃO DE MOD E SEM ADIÇÃO DE MOD
- FIGURA 4 - LOG DA CONCENTRAÇÃO MOLAR DE COBRE LIVRE, (4A) EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE COBRE NOMINAL (4B)
- FIGURA 5 - CONCENTRAÇÃO DE CLOROFILA-A EM FUNÇÃO DO TEMPO EXPERIMENTAL NOS DIVERSOS TRATAMENTOS EXPERIMENTAIS SEM PRESENÇA DE MOD INDICANDO UMA ESCALA DE TOXICIDADE.....
- FIGURA 6 - CONCENTRAÇÃO DE CLOROFILA-A EM FUNÇÃO DO TEMPO EXPERIMENTAL NOS DIVERSOS TRATAMENTOS EXPERIMENTAIS COM PRESENÇA DE MOD INDICANDO UMA ESCALA DE TOXICIDADE
- FIGURA 7 - CONCENTRAÇÃO DE COBRE EM CÉLULAS DE *SELENASTRUM CAPRICORNUTUM* ($\text{mgCu} \cdot \text{cel}^{-1}$) CULTIVADAS EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE COBRE LIVRE
- FIGURA 8 - CLOROFILA-A EM FUNÇÃO DO TEMPO EXPERIMENTAL NOS EXPERIMENTOS CONTROLE SEM PRESENÇA DE MOD
- FIGURA 9 - CLOROFILA-A EM FUNÇÃO DO TEMPO EXPERIMENTAL NOS EXPERIMENTOS COM CONCENTRAÇÃO NOMINAL DE COBRE 10^{-9} M SEM PRESENÇA DE MOD
- FIGURA 10 - CLOROFILA-A EM FUNÇÃO DO TEMPO EXPERIMENTAL NOS EXPERIMENTOS COM CONCENTRAÇÃO NOMINAL DE COBRE 10^{-8} M SEM PRESENÇA DE MOD
- FIGURA 11 - CLOROFILA-A EM FUNÇÃO DO TEMPO EXPERIMENTAL NOS EXPERIMENTOS SEM PRESENÇA DE MOD COM CONCENTRAÇÃO NOMINAL DE COBRE 10^{-7} M
- FIGURA 12 - CLOROFILA-A EM FUNÇÃO DO TEMPO EXPERIMENTAL NOS EXPERIMENTOS SEM PRESENÇA DE MOD COM CONCENTRAÇÃO NOMINAL DE COBRE 10^{-6} M.....
- FIGURA 13 - CLOROFILA-A EM FUNÇÃO DO TEMPO EXPERIMENTAL NOS EXPERIMENTOS SEM PRESENÇA DE MOD COM CONCENTRAÇÃO NOMINAL DE COBRE 10^{-5} M
- FIGURA 14 - CLOROFILA-A EM FUNÇÃO DO TEMPO EXPERIMENTAL NOS EXPERIMENTOS SEM PRESENÇA DE MOD COM CONCENTRAÇÃO NOMINAL DE COBRE 10^{-4} M
- FIGURA 15 - CLOROFILA-A EM FUNÇÃO DO TEMPO EXPERIMENTAL NOS EXPERIMENTOS SEM PRESENÇA DE MOD COM CONCENTRAÇÃO NOMINAL DE COBRE 10^{-3} M
- FIGURA 16 - CLOROFILA-A EM FUNÇÃO DO TEMPO EXPERIMENTAL NOS EXPERIMENTOS CONTROLE COM PRESENÇA DE MOD
- FIGURA 17 - CLOROFILA-A EM FUNÇÃO DO TEMPO EXPERIMENTAL NOS

		EXPERIMENTOS COM CONCENTRAÇÃO NOMINAL DE COBRE 10^{-9} M COM PRESENÇA DE MOD
FIGURA 18	-	CLOROFILA-A EM FUNÇÃO DO TEMPO EXPERIMENTAL NOS EXPERIMENTOS COM CONCENTRAÇÃO NOMINAL DE COBRE 10^{-8} M COM PRESENÇA DE MOD
FIGURA 19	-	CLOROFILA-A EM FUNÇÃO DO TEMPO EXPERIMENTAL NOS EXPERIMENTOS COM CONCENTRAÇÃO NOMINAL DE COBRE 10^{-7} M COM PRESENÇA DE MOD
FIGURA 20	-	CLOROFILA-A EM FUNÇÃO DO TEMPO EXPERIMENTAL NOS EXPERIMENTOS COM CONCENTRAÇÃO NOMINAL DE COBRE 10^{-6} M COM PRESENÇA DE MOD
FIGURA 21	-	CLOROFILA-A EM FUNÇÃO DO TEMPO EXPERIMENTAL NOS EXPERIMENTOS COM PRESENÇA DE MOD COM CONCENTRAÇÃO NOMINAL DE COBRE 10^{-5} M
FIGURA 22	-	CLOROFILA-A EM FUNÇÃO DO TEMPO EXPERIMENTAL NOS EXPERIMENTOS COM PRESENÇA DE MOD COM CONCENTRAÇÃO NOMINAL DE COBRE 10^{-4} M
FIGURA 23	-	CLOROFILA-A EM FUNÇÃO DO TEMPO EXPERIMENTAL NOS EXPERIMENTOS COM PRESENÇA DE MOD COM CONCENTRAÇÃO NOMINAL DE COBRE 10^{-3} M

RESUMO

Em ambientes aquáticos, a matéria orgânica dissolvida natural (MOD) apresenta propriedades quelantes de metais e, dessa maneira, pode atuar sobre a biodisponibilidade desses elementos para organismos do fitoplâncton. O emprego de espécies fitoplanctônicas para avaliar risco potencial de toxicidade é estratégico, pois estes organismos encontram-se na base das cadeias tróficas de ecossistemas aquáticos e, portanto, são importantes na transferência de metais nesses ambientes. O objetivo deste trabalho foi analisar as interações entre o metal cobre, a MOD natural e *Selenastrum capricornutum*. Meio de cultura enriquecido foi utilizado para os bioensaios de toxicidade, que tiveram 96 h de duração e foram realizados com duas réplicas em culturas estanques. Frascos de policarbonato de 1000 ml de capacidade com 500 ml de meio nutritivo foram utilizados. Culturas controle foram realizadas sem adição extra de cobre, mas com a concentração naturalmente presente no meio enriquecido WC. Diversas concentrações de cobre livre foram adicionadas, desde 4×10^{-10} M até 4×10^{-4} . A fração livre do metal foi determinada no início e final dos experimentos utilizando-se eletrodo seletivo ao íon cobre. Substância húmica comercial foi utilizada como modelo de MOD em concentração final de 10 mg.L^{-1} . Foram feitas amostragens diárias para determinação do número de células/mL e concentração de clorofila-a. *S. capricornutum* apresentou alta resistência às concentrações do metal, visto que apenas em concentrações maiores que 10^{-6} M do íon livre no caso dos experimentos sem MOD, e maiores que 10^{-8} M nos experimentos com MOD, houve um decréscimo na síntese de clorofila-a. Concentrações menores que 10^{-6} M de Cu iônico não afetaram significativamente a taxa de crescimento da microalga, cujo EC_{50} para cobre livre foi de cerca de 5×10^{-8} M. Considerando-se EC_{50} calculado com base na concentração de cobre nominal, o respectivo valor passa a 5×10^{-6} M. Foi detectada uma diferença significativa em relação à concentração de cobre nominal e cobre livre no meio de cultura. Tal diferença é resultante da complexação do cobre por substâncias presentes no meio e pelos fitoquelantes produzidos pelas próprias células algais. No entanto, a adição extra de MOD em concentração de 10 mg.L^{-1} não afetou tais concentrações, que foram similares para os experimentos com e sem MOD.

Palavras-chave: cobre, matéria orgânica dissolvida, *Selenastrum capricornutum*, toxicidade, ISE.

1 INTRODUÇÃO

A matéria orgânica natural é representada pelos organismos vivos, seus produtos de excreção e restos após a morte. Pode ser encontrada em grandes depósitos, como os de combustíveis fósseis e solos, ou em estado disperso nas águas oceânicas e reservatórios de água doce.

Segundo ESTEVES (1998), a concentração de matéria orgânica dissolvida no meio aquático influencia fortemente a disponibilidade de metais traços.

Os metais são naturalmente encontrados nos diferentes segmentos integrantes dos sistemas aquáticos naturais, tais como rochas, solos, sedimentos, águas e organismos. Entretanto, o aumento da concentração destes elementos devido às atividades antrópicas, associado com seu elevado potencial tóxico, podem provocar efeitos adversos aos ecossistemas aquáticos e ao homem (SALOMONS e FOSTER, 1984). Quanto à contaminação ambiental, os metais apresentam um risco adicional em relação à maior parte dos contaminantes de origem orgânica, uma vez que estes elementos não sofrem degradação, sendo apenas transferidos de um compartimento para outro.

O cobre, metal utilizado neste estudo, é comum em rochas e minerais da crosta terrestre. Fontes naturais de cobre nos ambientes aquáticos incluem o intemperismo e a dissolução de minerais que contém cobre, sulfetos de cobre e cobre livre. Potenciais fontes antropogênicas de cobre incluem o uso de compostos de cobre como algicidas, efluentes de plantas de tratamento de esgotos, drenagem de águas urbana e subterrânea contaminadas, usos agrícolas de compostos contendo cobre como fungicidas e pesticidas, além de precipitações atmosféricas e descargas industriais. As vias principais de entrada de cobre e outros metais em ecossistemas marinhos incluem a contaminação e liberação de resíduos de metais em rios e leitos que acabam por desaguar nos oceanos.

Cobre faz parte da dieta normal e é necessário para o crescimento saudável de microalgas planctônicas. É requerido em baixa concentração, da ordem de 10^{-10} – 10^{-9} M na forma livre, sendo que concentrações pouco mais elevadas podem ser tóxicas.

O aumento na descarga de metais em ambientes naturais tem acarretado problemas de toxicidade crônica, o que resulta na adaptação de alguns organismos e extinção de outros, os menos adaptados. Estudos ecofisiológicos relacionados aos organismos do fitoplâncton permitem uma compreensão dos processos químico-biológicos que regulam a toxicidade dos metais em ambientes naturais. Considerando que processos de eutrofização têm atingido, além de rios e lagos, regiões costeiras tais como baías e estuários, o estudo das interações metais-MOD-microalgas contribui de para a avaliação dos impactos ambientais causados por contaminação de metais em ambientes aquáticos ricos em matéria orgânica dissolvida, tais como os eutrofizados.

A contaminação ambiental causada por metais, cuja característica notável é sua persistência e tendência de concentrarem-se em cadeias alimentares através de bioacumulação e biomagnificação (WOODWELL, 1974; RAINBOW e DALLINGER, 1993; REINFELDER et al., 1998), pode resultar em alterações na estrutura e função da comunidade de um modo geral. Nos ambientes aquáticos, os seres vivos possuem uma relação íntima e recíproca com o meio circundante, sendo que a introdução de substâncias ou compostos tóxicos leva a alterações profundas na biota (ROCHA, 2000). Como exemplo, temos a redução das taxas alimentares em consumidores primários, resultando em mudanças significativas nas populações, uma vez que a reprodução, crescimento e sobrevivência dos organismos dependem da energia proveniente do alimento (TAYLOR et al., 1998).

Nos ambientes aquáticos, um metal pode seguir diversos destinos, tais como interações iônicas simples, associação com partículas, precipitação e acúmulo no sedimento, oxidações e reduções químicas e biológicas, complexação com ligantes e adsorção e absorção por microorganismos dentro da cadeia alimentar. No entanto, apesar de conhecer os prováveis destinos dos metais dentro dos ecossistemas aquáticos, a ciência é atualmente incapaz de prever acuradamente a extensão dos riscos impostos por uma contaminação ambiental causada por metais. Segundo VOELKER e KOGUT (2001), os modelos disponíveis para o transporte e transformação desses elementos em ambientes aquáticos são incompletos, em grande

parte, por falharem ao considerar a complexidade das interações biológicas com os metais.

A relação entre metais, microalgas e materiais orgânicos é ainda pouco conhecida. Os materiais orgânicos podem sofrer processo de adsorção na superfície das células algais e, como são capazes de seqüestrar alguns metais, e.g. Cu, esta mesma MOD pode, ainda, controlar a toxicidade daquele íon específico (GONZALEZ-DAVILA et al., 1995). Além disso, os materiais orgânicos dependendo de sua polaridade e massa molecular podem facilitar a entrada dos metais em organismos unicelulares. Assim, os materiais orgânicos podem não somente reduzir a toxicidade dos metais em ambientes aquáticos, mas também aumentar sua toxicidade (ERRECALDE et al., 1998).

A importância da MOD natural, substância húmica ou geopolímeros (SAAR e WEBER, 1982) no ambiente é amplamente reconhecida. Sua natureza faz com que funcione como agente tamponante de íons metálicos em ambientes naturais (BUFFLE, 1988). Deste modo, as substâncias húmicas podem alterar a partição de metais passíveis de complexação, seqüestrando ou liberando estes íons para o ambiente (FOX, 1984; LOMBARDI e JARDIM, 1997a; 1997b) e, eventualmente alterando a biodisponibilidade de metais aos organismos (LOMBARDI et al., 2002).

Segundo Wangersky (1994), as transformações químicas em ambientes marinhos só serão totalmente entendidas quando se considerar as reações com as substâncias húmicas ou por ela mediadas. De acordo com TAYLOR et al. (1998), o material orgânico particulado suspenso na coluna d'água pode atuar tanto como sumidouro, como também como fonte de metais para os organismos aquáticos. Podem induzir a alterações nos hábitos desses organismos com efeitos sobre a estrutura e função dos ecossistemas aquáticos, incluindo mudanças na transparência da água, alterações na regeneração de nutrientes e no tamanho das populações de invertebrados e vertebrados.

Nos ambientes aquáticos os organismos de diferentes níveis tróficos apresentam mecanismos distintos de captura de metais aos quais estão expostos no meio. Para microalgas dá-se a absorção diretamente a partir do meio, para zooplâncton dá-se

principalmente através da ingestão de íons em solução ou de metais incorporados à material biológico (SALOMONS e FOSTER, 1984). Assim, a disponibilidade de elementos traço para os organismos pode ser influenciada por características fisiológicas e ecológicas, bem como por um grande número de fatores intrínsecos, tais como tamanho, idade e sexo do indivíduo, ou extrínsecos, tais como especiação metálica, salinidade, temperatura e a presença de outros poluentes (OCHIAI, 1995).

A definição de cobre como o modelo de metal a ser investigado baseou-se no fato de que cobre associa-se a materiais orgânicos. O metal é também um micronutriente, isto é, nutriente essencial requerido em pequenas concentrações, porém tóxico em concentrações pouco mais elevadas.

A presente proposta tem como objetivo principal a verificação dos efeitos de íons cobre sobre células de *Selenastrum capricornutum* e o modo como estas interações são influenciadas pela presença de materiais orgânicos naturais.

2 OBJETIVOS

O objetivo principal deste estudo foi analisar as interações entre o cobre, a matéria orgânica dissolvida natural e células fitoplanctônicas de *Selenastrum capricornutum* Printz. A toxicidade do cobre aos organismos foi avaliada em relação à presença e ausência dos materiais orgânicos dissolvidos naturais.

Como consequência deste objetivo central, diversos outros objetivos secundários foram atingidos. Estes são descritos a seguir:

- a) Cultivo de microalga fitoplanctônica utilizada nos testes;
- b) Verificação da toxicidade de cobre para organismo do fitoplâncton testado através de culturas contaminadas com o metal em várias concentrações;
- c) Verificação do efeito da MOD sobre a toxicidade de cobre.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 CULTURAS ALGAIS

O objeto de estudo deste trabalho foi a microalga *Selenastrum capricornutum*. Os inóculos foram obtidos no Laboratório de Ficologia do Departamento de Botânica da Universidade Federal de São Carlos e mantidos em cultura unialgal no Laboratório de Plâncton do Departamento de Hidrobiologia da Universidade Federal de São Carlos. Sua escolha baseou-se na facilidade de cultivo, uma vez que a referida microalga tem habilidade de crescer rapidamente em condições de laboratório, na facilidade de contagem, se comparada a outras microalgas, mas principalmente por constar na legislação ambiental (Norma ASTM D3978 ISO 8692) como organismo teste padrão para testes de inibição de crescimento algal.

Todas as culturas foram feitas em meio WC (GUILLARD e LORENZEN, 1972; TABELA 1) modificado, sem EDTA (agente quelante de íons metálicos) e com adição de TRIS, cuja função é manter o pH constante (pH 7) no meio de cultura durante o experimento. O meio foi esterilizado em autoclave a 120° C por 30 minutos 24 horas antes da inoculação e o pH foi ajustado para 7,0.

Os testes de toxicidade, realizados com duas réplicas, foram feitos com e sem a adição de matéria orgânica dissolvida natural (substância húmica obtida do Suwannee River, e adquirida através da International Humic Substances Society) e tiveram a duração de 96 horas. Foram empregadas culturas estanques em Erlenmeyers de policarbonato com 1000 ml de capacidade e 500 ml de meio de cultura. As culturas experimentais foram mantidas sob condições ambientais controladas, com ciclo claro-escuro de 12-12 h e temperatura entre 20-22° C.

A limpeza do material de policarbonato foi feita colocando-se os Erlenmeyers em imersão em HCl 1M durante sete dias e posteriormente enxaguados com água destilada. Detalhes dos procedimentos laboratoriais utilizados para o preparo e limpeza de amostras encontram-se descritos em LOMBARDI et al. (2002). Frascos de policarbonato são indicados para experimentos envolvendo elementos metálicos

devido à adsorção dos mesmos em frascos de vidro, que pode chegar a 30% do total adicionado do elemento.

TABELA 1 – COMPOSIÇÃO DO MEIO DE CULTURA DE ÁGUA DOCE WC (GUILLARD E LORENZEN, 1972)

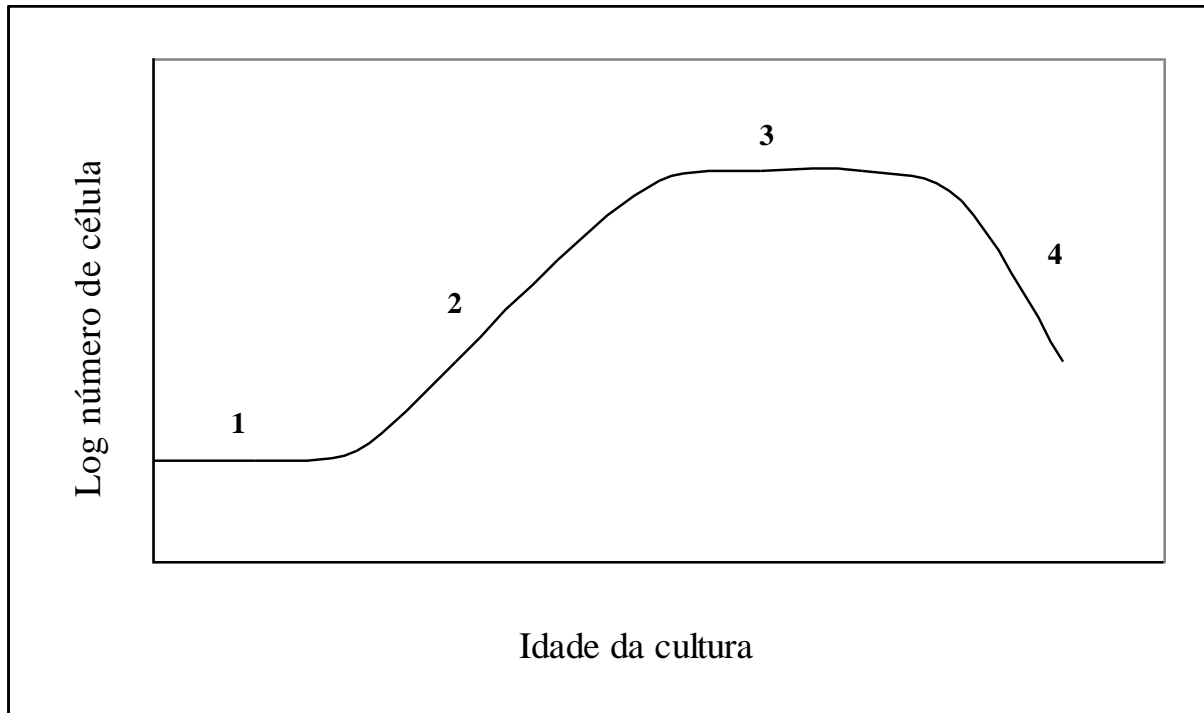
Composto	Concentração (10^{-6} M)
CaCl ₂ · 2 H ₂ O	250
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	150
NaHCO ₃	150
K ₂ HPO ₄	50
NaNO ₃	1000
Na ₂ SiO ₃ · 9 H ₂ O	100
Na ₂ · EDTA	11,7
FeCl ₃ · 6 H ₂ O	11,7
CuSO ₄ · 5 H ₂ O	0,04
ZnSO ₄ · 7 H ₂ O	0,08
CoCl ₂ · 6 H ₂ O	0,05
MnCl ₂ · 4 H ₂ O	0,9
Na ₂ MoO ₄ · 2 H ₂ O	0,03
H ₃ BO ₃	16
Tris	4120
Vitaminas	
Thiamina · HCl	0,29
Biotina	0,0002
B12	0,000037

Os testes de toxicidade (96 h de exposição ao agente tóxico) foram feitos adicionando-se CuSO₄ em concentrações definidas (nominais ou calculadas) no meio de cultura. Neste foi adicionado inóculo algal oriundo de uma cultura em fase exponencial de crescimento (células em sua maioria saudáveis). A FIGURA 1 mostra as diversas fases de crescimento pelas quais passa uma microalga quando cultivada em sistemas estanques (ou batch) como aqueles utilizados no presente estudo. Uma vez inoculado, o crescimento populacional foi monitorado diariamente durante as 96h de duração dos bioensaios.

A cultura controle teve em sua composição a concentração de cobre usual presente no meio de cultura WC (4×10^{-8} M). Os bioensaios de toxicidade de cobre apresentaram as seguintes concentrações (nominais) do metal: 10^{-9} M, 10^{-8} M, 10^{-7} M, 10^{-6} M, 10^{-5} M, 10^{-4} M, 10^{-3} M. Nos experimentos cujo objetivo foi verificar o efeito da

MOD sobre a toxicidade de cobre foi adicionado, além do metal, $10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de substância húmica para 500 ml de meio de cultura.

FIGURA 1 – PADRÃO TÍPICO DE CRESCIMENTO APRESENTADO POR UMA ALGA UNICELULAR CULTIVADA EM CULTURA. MODIFICADO DE FOGG (1975).



NOTA: Fases de crescimento em culturas estanques: 1 - fase lag (adaptação ao novo ambiente), 2 - fase exponencial (fase de máximo crescimento), 3 - fase estacionária (fase de redução no crescimento), 4 - fase senescente (fase de morte celular, com redução do número de células).

3.2 CONTAGEM DE CÉLULAS

O crescimento das culturas foi acompanhado através de contagem de células ao microscópio e concentração de clorofila-a. Foram realizadas amostragens diárias para as determinações do número de células. O crescimento celular foi acompanhado por contagem de células algais ao microscópio (número de células por ml de cultura). Foram retirados diariamente 3 ml de cada cultura algal para esta análise e as amostras foram fixadas com 2 gotas de solução de lugol (iodeto de potássio: iodo: água destilada; 1:2:20). As contagens de células foram realizadas com o uso de um hemocítmetro Fuchs-Rosenthal sob microscópio óptico.

3.3 CLOROFILA-A

Determinações de clorofila-a foram usadas para o monitoramento do crescimento da população durante o experimento. Taxas de crescimento foram determinadas plotando-se a concentração de clorofila-a ($\mu\text{g/L}$) contra o tempo experimental (horas) e calculando-se uma regressão linear para o período de crescimento. Este procedimento foi repetido para cada uma das concentrações de cobre usadas nos bioensaios.

Para a quantificação de clorofila-a foram realizadas amostragens diárias das culturas algais. As amostras (12 ml de cada cultura algal) foram filtradas através de filtração a vácuo (21 mmHg) utilizando-se filtros de fibra de vidro de 0,45 μm de diâmetro de poro (SARTORIUS, Goeltingen, Alemanha). Estes filtros foram armazenados em envelopes de papel alumínio e congelados até o momento de análise de clorofila-a. Esta determinação foi realizada segundo procedimento descrito em STRICKLAND e PARSONS (1972) no Centro de Estudos do Mar da Universidade Federal do Paraná. Para o cálculo da concentração de clorofila-a foi aplicada a seguinte equação:

$$\text{Clorofila-a } (\mu\text{g/L}) = (r/(r-1)) \cdot (F_a - F_d) \cdot v/V$$

Onde r é o fator do fluorômetro (2,014), F_a é a fluorescência antes da acidificação, F_d é a fluorescência depois da acidificação, v é o volume (ml) de acetona 90% e V é o volume (ml) filtrado da amostra.

3.4 METAL PARTICULADO

A concentração total de cobre nas células algais foi determinada através espectroscopia de absorção atômica. Amostragens para determinações de cobre total particulado foram realizadas no final dos experimentos (96 h). A digestão ácida das amostras para a extração do cobre celular foi baseada nas metodologias descritas em FISHER & FROOD (1980) e SLAUENWHITE & WANGERSKY (1991) e seguiu os procedimentos descritos em Lombardi et al. (2002). As amostras (10 ml de cada

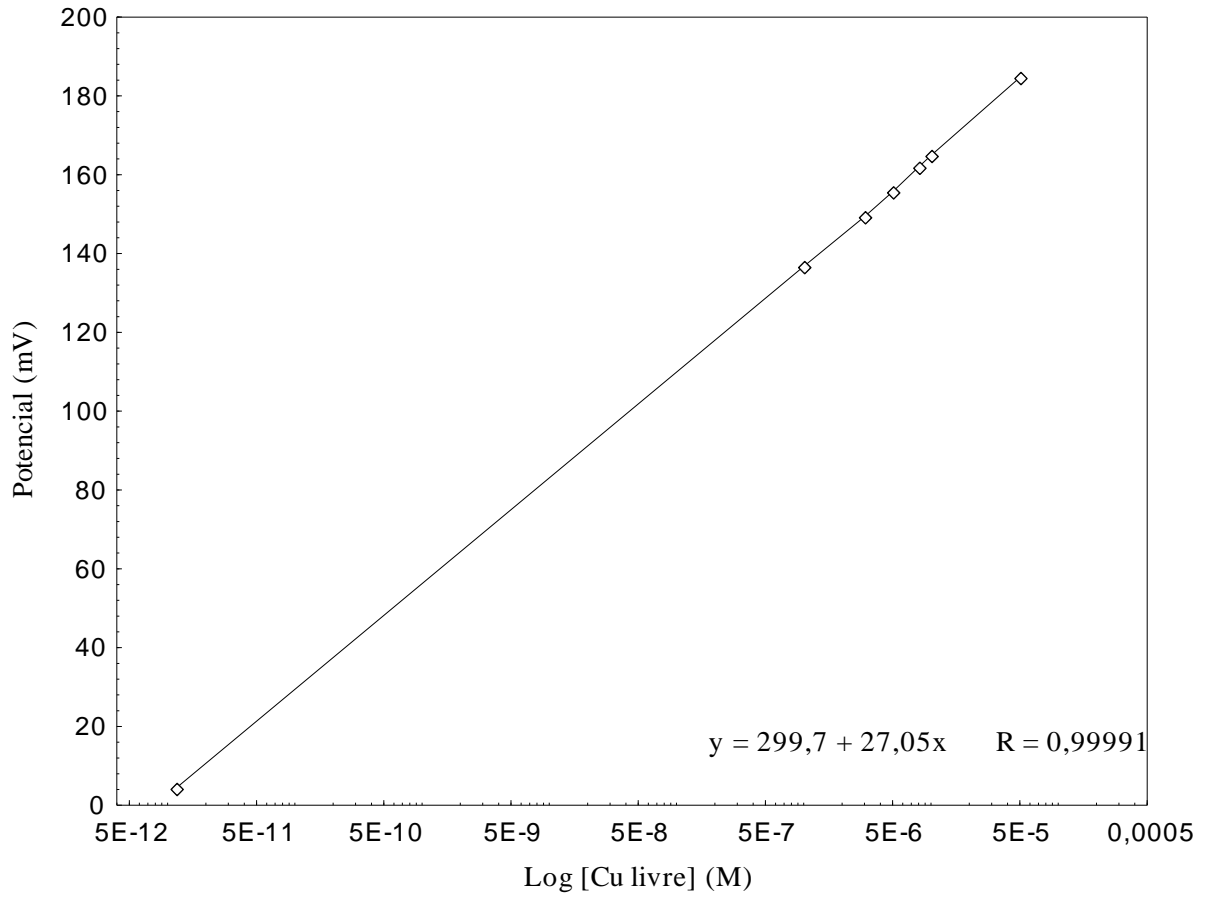
cultura algal) foram filtradas a vácuo (21 mmHg) usando-se filtros de membrana (MILLIPORE, éster de celulose) com 0,45 μm de diâmetro de poro. Sabe-se que estes filtros liberam materiais inorgânicos e metais mesmo depois da passagem de 1 L de água, por isso foram deixados em HCl 1M por 24 h imediatamente antes do uso. No momento de uso, os filtros foram enxaguados com água destilada em vidro. Após as filtrações estes filtros foram secos em estufa a 65° C por 24 h e congelados até a extração do cobre particulado.

3.5 METAL LIVRE

As amostragens para determinação da concentração de metal livre foram realizadas no início (0 h) e no final de cada experimento (96 h). As amostras foram obtidas por filtração a vácuo (21 mmHg) de 100 ml de cada cultura algal utilizando-se filtros de fibra de vidro de 0,45 μm de diâmetro de poro (SARTORIUS, Goeltingen, Alemanha), pré-lavados em HNO₃ 1M por 24 h. Os filtros foram descartados e os filtrados colocados em recipientes de plástico para a determinação do cobre livre.

O cobre solúvel na forma iônica, cobre livre ou ainda cobre hidratado (Cu²⁺) foi determinado utilizando-se um eletrodo seletivo ao íon de cobre ANALION cuja curva de calibração pode ser vista na FIGURA 2, em conjunto com um eletrodo de referência de dupla junção ANALION Ag/AgCl. Leituras do potencial (mV) foram obtidas usando-se um pHmetro ANALION (modelo AN 2000, Ribeirão Preto, Brasil) com resolução 0,01 mV. Durante as análises foi mantida temperatura constante de 22 \pm 1° C.

FIGURA 2 – CURVA DE CALIBRAÇÃO PARA O ELETRODO SELETIVO A ÍON COBRE.
FORÇA IÔNICA = 2×10^{-2} M (NaNO_3), pH = 5,0.



4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A biodisponibilidade dos elementos traço está relacionada às características químicas do elemento e à sua interação com as diferentes entidades presentes no meio, tais como organismos, compostos orgânicos e inorgânicos. Cobre é um metal reativo com respeito à sua associação com materiais orgânicos, sendo que em ambientes marinhos cerca de 99.9% deste metal é normalmente encontrado sob a forma de complexos (OLIVEIRA et al., 1995). Na maioria dos casos, os metais complexados à matéria orgânica não se encontram biodisponíveis às microalgas. No entanto, observa-se um equilíbrio entre o metal livre e o complexado, ocorrendo uma dissociação dos complexos à medida que o metal livre vai sendo consumido pela biomassa.

Estudos sobre a complexação de cobre com a MOD em ecossistemas aquáticos, têm demonstrado que mais de 90% do metal encontra-se complexado organicamente, com exceção da zona afótica dos oceanos (XUE e SIGG, 1990).

No presente estudo, foram obtidos valores de cobre livre de até cerca de 100 vezes menores do que a concentração nominal (calculada) empregada (FIGURA 3). A diferença entre esses valores deve-se, provavelmente, ao fato de uma parcela do total adicionado complexar-se a outras substâncias no meio, tais como os excretados das células algais, o tampão utilizado (TRIS), e a MOD (10 mg.L⁻¹). Estes resultados são mostrados nas TABELAS 2 e 3 e nas FIGURAS 4A e 4B.

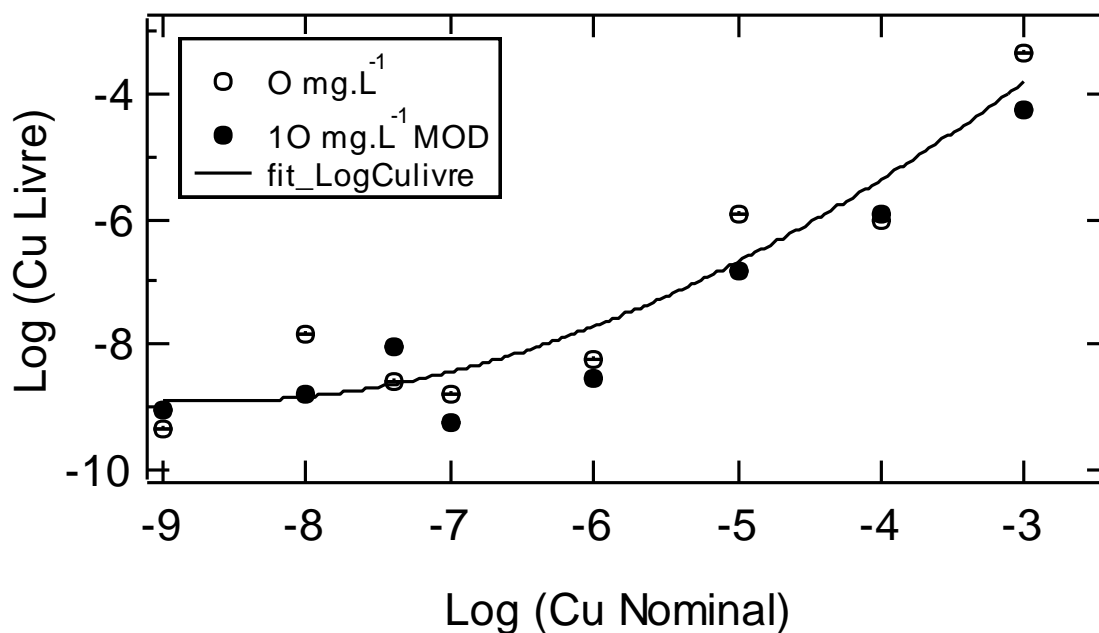
TABELA 2 – DADOS DE CONCENTRAÇÃO TOTAL E IÔNICA DE COBRE RELACIONADOS ÀS TAXAS DE CRESCIMENTO NOS EXPERIMENTOS SEM PRESENÇA DE MOD.

Concentração Nominal	Concentração Iônica (± desvio padrão)	Taxa de crescimento (± desvio padrão)
Controle (4 x 10 ⁻⁸ M)	2,6 (±1,6) x 10 ⁻⁹ M	0,013 ± 0,003
10 ⁻⁹ M	4,3 (±0.4) x 10 ⁻¹⁰ M	0,014 ± 0
10 ⁻⁸ M	1,4 (±0.4) x 10 ⁻⁸ M	0,015 ± 0,001
10 ⁻⁷ M	1,7 (±1.2) x 10 ⁻⁹ M	0,013 ± 0
10 ⁻⁶ M	5,8 (±0.3) x 10 ⁻⁹ M	0,017 ± 0,001
10 ⁻⁵ M	1,2 (±1.3) x 10 ⁻⁶ M	0,006 ± 0,002
10 ⁻⁴ M	1,0 (±0.6) x 10 ⁻⁶ M	0 ± 0,003
10 ⁻³ M	4,4 (±0.4) x 10 ⁻⁴ M	0 ± 0

TABELA 3 – DADOS DE CONCENTRAÇÃO TOTAL E IÔNICA DE COBRE RELACIONADOS ÀS TAXAS DE CRESCIMENTO NOS EXPERIMENTOS COM PRESENÇA DE MOD.

Concentração Nominal	Concentração Iônica	Taxa de crescimento (\pm desvio padrão)
Controle (4×10^{-8} M)	$8,9 (\pm 8.6) \times 10^{-9}$ M	$0,011 \pm 0,005$
10^{-9} M	$9,4 (\pm 2.0) \times 10^{-10}$ M	$0,015 \pm 0$
10^{-8} M	$1,7 (\pm 1.3) \times 10^{-9}$ M	$0,016 \pm 0,002$
10^{-7} M	$5,5 (\pm 0.5) \times 10^{-10}$ M	$0,015 \pm 0$
10^{-6} M	$2,8 (\pm 0.5) \times 10^{-9}$ M	$0,013 \pm 0,001$
10^{-5} M	$1,5 (\pm 0.2) \times 10^{-7}$ M	$0,008 \pm 0$
10^{-4} M	$1,2 (\pm 0.4) \times 10^{-6}$ M	$0 \pm 0,002$
10^{-3} M	$5,3 (\pm 3.3) \times 10^{-5}$ M	$0 \pm 0,006$

FIGURA 3. LOG DA CONCENTRAÇÃO DE COBRE LIVRE EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DO LOG DA CONCENTRAÇÃO MOLAR DE COBRE CALCULADA (OU NOMINAL) PARA TODAS AS CONCENTRAÇÕES EMPREGADAS NOS BIOENSAIOS, COM ADIÇÃO DE MOD E SEM ADIÇÃO DE MOD.



A FIGURA 3 mostra que até uma concentração nominal de 10^{-7} M, não houve diferença significativa na concentração de cobre livre, ficando próxima de 10^{-9} M. Este comportamento foi observado tanto na ausência como na presença de MOD extra (10 mg.L^{-1}) no meio de cultura. A concentração de cobre livre no meio de cultivo começa a aumentar somente com cerca de 10^{-6} M de cobre nominal, seguindo em aumento gradativo para ambas as espécies de cobre. Diferente do que seria esperado, nota-se considerável semelhança entre os experimentos com e sem adição de MOD.

Considerando que *S. capricornutum* pertence à família das Chlococeales, e que produz considerável quantidade de fitoquelantes (LOMBARDI E VIEIRA, 2000), a explicação para tal semelhança entre os experimentos com e sem MOD quanto à concentração de cobre no meio, pode estar relacionada à força de associação e quantidade de sítios disponíveis dos fitoquelantes produzidos por *S. capricornutum* e cobre.

A liberação de exudatos por microalgas é bastante comum e é considerado importante para o equilíbrio e manutenção das concentrações de metais traço em águas naturais, podendo até diminuir os efeitos tóxicos dos mesmos. Dessa maneira, a alga pode influenciar a concentração residual de cobre na coluna d'água tanto pela ligação do cobre nas superfícies da célula e subsequente remoção por sedimentação, quanto pela produção de ligantes que afetam a concentração de cobre livre (XUE e SIGG, 1990).

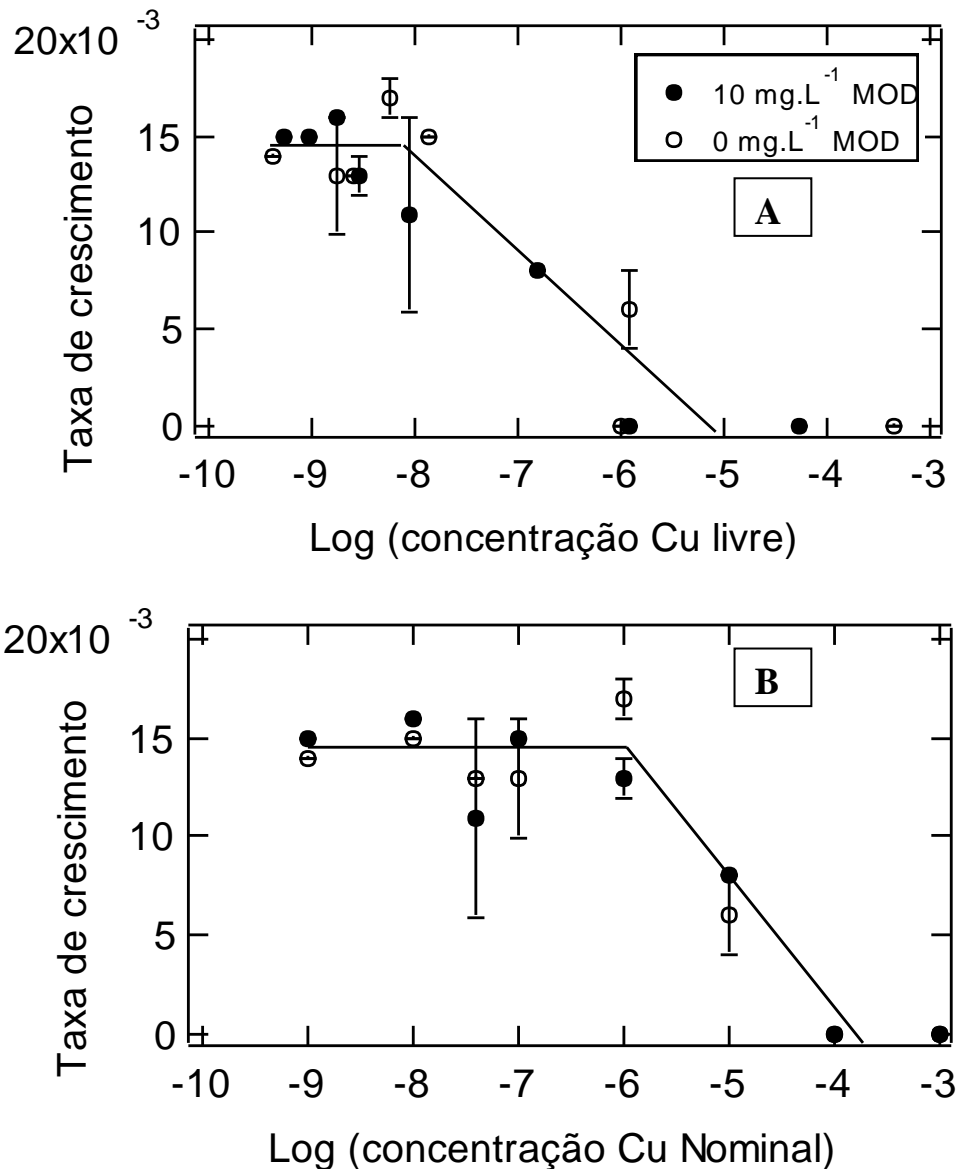
Cobre tem alta afinidade com ácidos orgânicos, que provavelmente constitui a maior parte do material excretado produzido por certas células do fitoplâncton. A consequência dessa alta afinidade é a formação de complexos inertes, que por sua vez causa redução nas concentrações de cobre livre (LOMBARDI e VIEIRA, 1998).

O crescimento obtido nos bioensaios é mostrado na FIGURA 4 em função da concentração de cobre livre (Fig. 4A) e nominal (Fig. 4B). Observa-se que a taxa de crescimento (baseada na concentração de clorofila-a) foi afetada em concentrações de cobre livre pouco acima de 1×10^{-8} M, tanto para os experimentos com MOD como também para aqueles sem MOD. Considerando-se a concentração nominal do metal, que equivale à concentração total teórica adicionada, observa-se redução na taxa de crescimento das microalgas em valores superiores a 1×10^{-6} M. Este valor é cerca de 100 vezes superior àquele reportado para cobre livre. Neste caso, também não foi detectada diferença significativa entre os experimentos com e sem MOD. Com estes resultados, observa-se que a concentração de MOD empregada nos experimentos (10 mg.L^{-1}) foi pouco significativa quanto à sua capacidade de sequestrar íons cobre. No entanto, observa-se um erro (desvio padrão) maior entre as replicas nos experimentos com MOD em relação àqueles sem MOD. Este erro pode ser devido à estabilidade

mais lenta do eletrodo seletivo a cobre quando detectando concentrações mais baixas do metal e tende a mascarar diferenças que de outra maneira seriam obtidas.

As taxas de crescimento foram calculadas através de regressão linear ($y = a + bx$) da concentração de clorofila-a e são representadas pelo coeficiente angular (b) assim obtido. Para estes dados pode-se estimar o valor de EC_{50}^1 .

FIGURA 4 - LOG DA CONCENTRAÇÃO MOLAR DE COBRE LIVRE, (4A) EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE COBRE NOMINAL (4B).



¹ $EC_{50:96h}$ – concentração efetiva inicial média nominal do agente tóxico, no início do teste, que causa inibição do crescimento de 50% da biomassa algácea em relação ao controle, em 96 horas de exposição (CETESB, 1986).

A concentração específica de cobre que reduziu em 50% a taxa de crescimento da população (EC₅₀) para os experimentos sem MOD e com MOD considerando-se a concentração de cobre livre foi de 5×10^{-8} M, enquanto que para a concentração nominal foi de 5×10^{-6} M. Este resultado mostra que houve seqüestro de íons cobre do meio de cultura pela MOD presente, ainda que tenha sido resultante da somatória tampão, fitoquelantes liberados pela microalga e MOD adicionada. Estes resultados mostram ainda que o cobre ligado à MOD apresenta menor toxicidade do que o cobre livre, daí uma necessidade maior de cobre nominal para obtenção de efeito tóxico similar.

Os resultados do presente estudo mostraram também que as células de *S. capricornutum* foram tolerantes a uma larga amplitude de concentração de cobre, de cerca de 1×10^{-9} M até 1×10^{-6} M em concentração nominal e de 5×10^{-10} M até 1×10^{-8} M de íons livre de cobre. Nessas amplitudes de concentração, a taxa de crescimento ficou praticamente igual àquela do controle.

Os efeitos do cobre na dinâmica da população, quantificado como concentração de clorofila-a ($\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$) versus tempo experimental, são ilustrados nas FIGURA 5 e 6. As curvas mostram uma variação concentração de clorofila-a dependendo da concentração de cobre. Sabe-se que a taxa de crescimento é variável de fundamental importância em estudos de fisiologia de microalgas e deve, portanto, ser determinada por parâmetros sensíveis. Vários métodos são usados para avaliação da biomassa e determinação da taxa de crescimento. No presente estudo utilizou-se clorofila-a para avaliação da biomassa e sensibilidade ao cobre por seu erro ser menor do que os obtidos a partir das contagens celulares ao microscópio.

Em testes de toxicidade é de fundamental importância a obtenção do valor de EC₅₀. Este valor serve para avaliar a toxicidade de um agente químico e, conseqüentemente, comparar o potencial tóxico entre os diversos agentes. No presente estudo, o parâmetro EC₅₀ foi determinado para os experimentos com e sem presença de MOD (FIGURA 4).

FIGURA 5 – CONCENTRAÇÃO DE CLOROFILA-A EM FUNÇÃO DO TEMPO EXPERIMENTAL NOS DIVERSOS TRATAMENTOS EXPERIMENTAIS SEM PRESENÇA DE MOD INDICANDO UMA ESCALA DE TOXICIDADE.

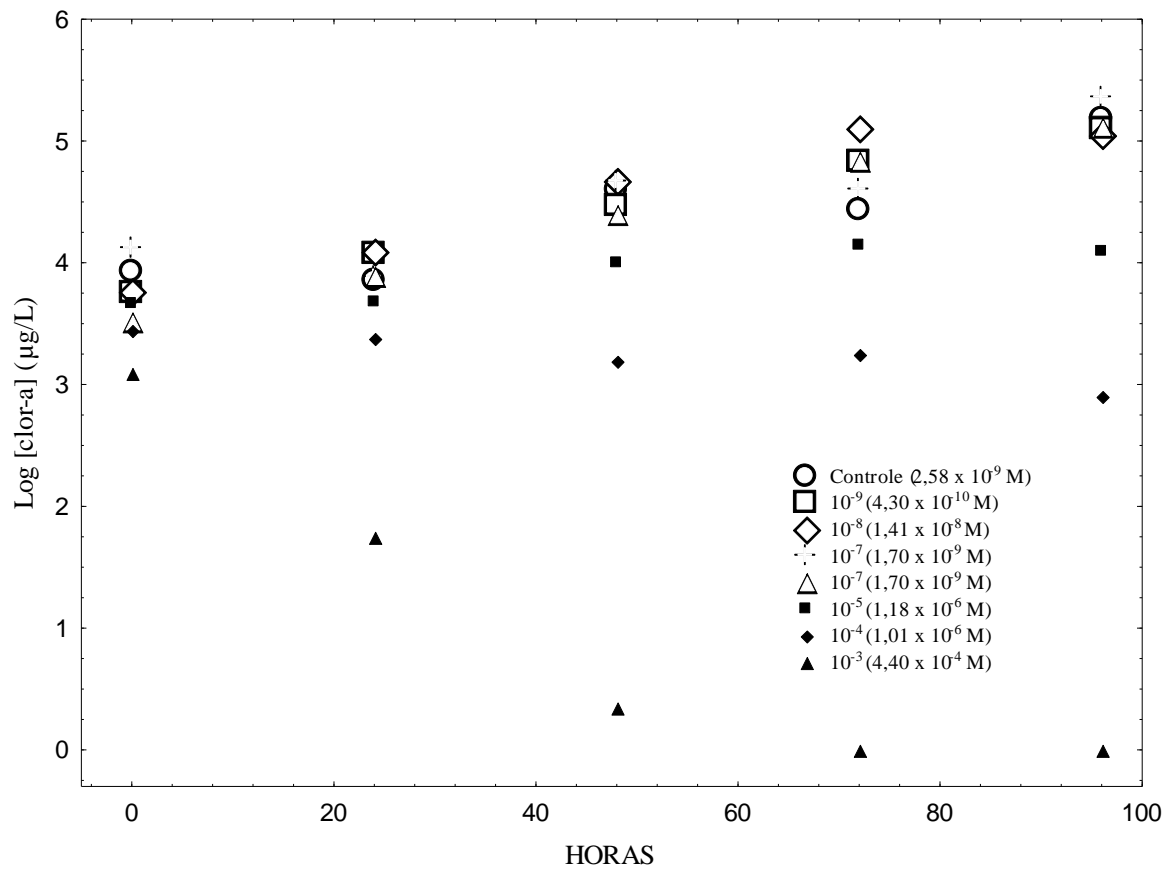
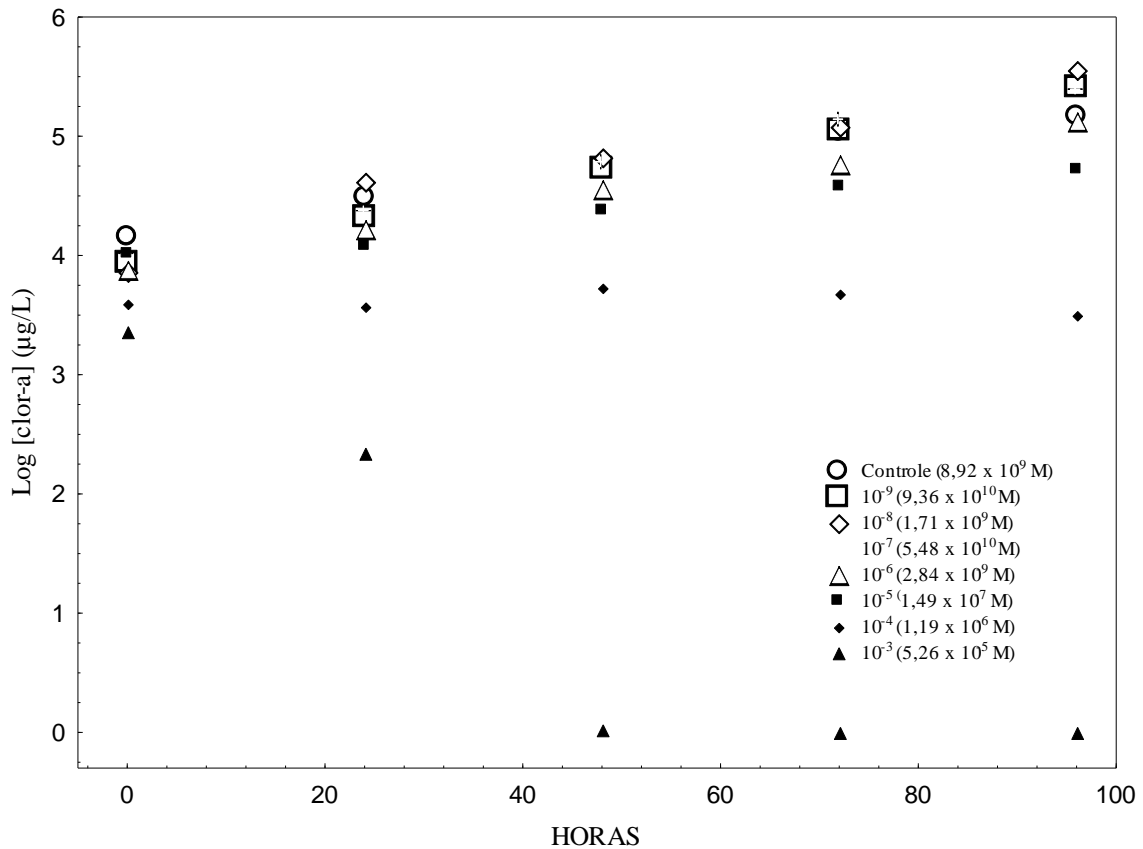
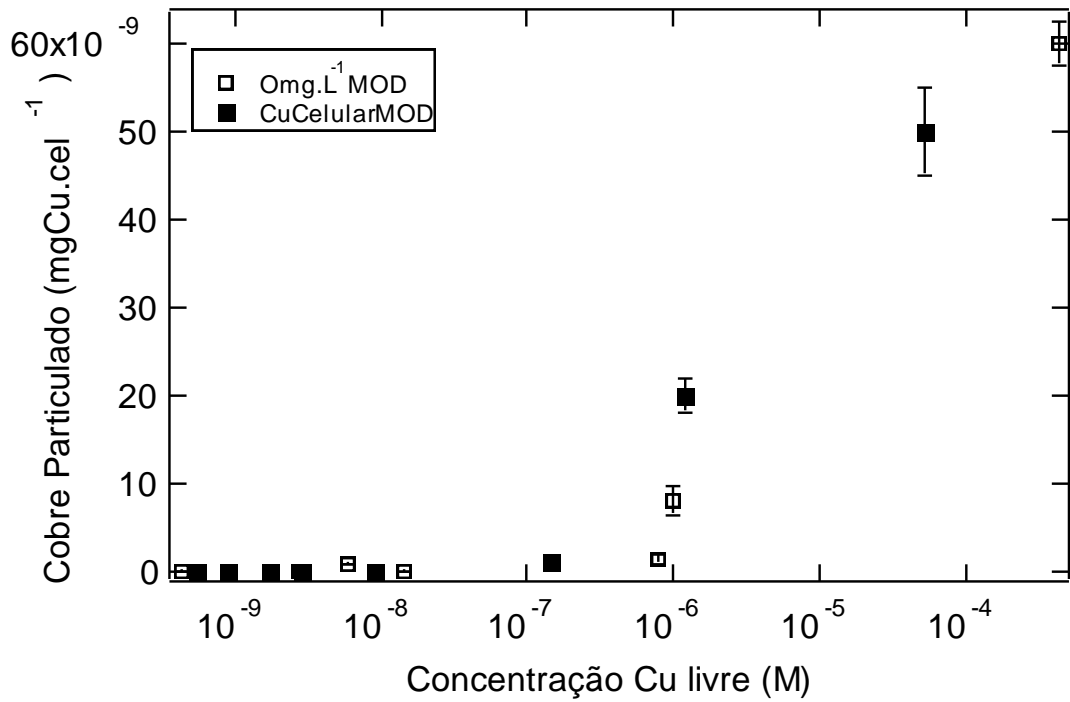


FIGURA 6 – CONCENTRAÇÃO DE CLOROFILA-A EM FUNÇÃO DO TEMPO EXPERIMENTAL NOS DIVERSOS TRATAMENTOS EXPERIMENTAIS COM PRESENÇA DE MOD INDICANDO UMA ESCALA DE TOXICIDADE



A concentração de cobre celular variou de acordo com a concentração do metal no meio experimental. O acúmulo do metal nas células foi observado nos experimentos com concentrações mais elevadas do metal (FIGURA 7), próximo a 10^{-6} M de cobre livre. Esta concentração foi aquela onde observa-se redução da taxa de crescimento e na concentração de clorofila-a da microalga. Comportamento semelhante foi observado tanto para os experimentos com MOD e sem MOD. Sabe-se que organismos cuja história de vida deu-se em ambientes com concentrações elevadas de um metal específico são tolerantes àqueles elemento. Dos resultados apresentados, concluímos que *Selenastrum capricornutum* é um organismo capaz de acumular íons cobre e portanto é considerado um agente de transferência do elemento na cadeia trófica.

FIGURA 7 - CONCENTRAÇÃO DE COBRE EM CÉLULAS DE *SELENASTRUM CAPRICORNUTUM* ($\text{mgCu}\cdot\text{cel}^{-1}$) CULTIVADAS EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE COBRE LIVRE.



NOTA: Os valores próximos do zero tiveram resultado abaixo do limite de detecção do aparelho.

5 CONCLUSÃO

Para se avaliar o impacto de metais pesados sobre a biota, testes de toxicidade correlacionando a concentração de metal podem conter erros por ignorar a especiação de metais, uma vez que muitos metais existem como cátions passíveis de complexação. Esta complexação pode ocorrer em diferentes e variados graus por compostos orgânicos e inorgânicos, influenciando a disponibilidade dos metais para a biota.

Os resultados apresentados neste estudo mostram que a fração iônica do cobre, em sua forma livre (ou hidratada) foi a forma de maior toxicidade para *Selenastrum capricornutum*. Esta conclusão é confirmada pela maior toxicidade do cobre livre em relação ao nominal, como foi detectado pelo valor de EC50.

Ainda como conclusão do presente estudo, observamos que a limpeza dos materiais e equipamentos, assim como a acuracidade e reprodutibilidade dos dados são fatores preponderantes em uma pesquisa científica, resultando certamente em erros de pequena proporção.

REFERÊNCIAS

BRULAND, K. W.; DONAT, J. R.; HUTCHINS, D. A. (1991). Interactive influences of bioactive trace metals on biological production in oceanic waters. **Limnology and Oceanography**, 36: 1555-1577.

BUFFLE J. (1988). **Complexation reactions in aquatic systems: an analytical approach**. Chichester: Ellis Horwood Ltd p. 692.

CAMPBELL, P. G. C.; TWISS, M. R.; WILKINSON, K. J. (1997). Accumulation of natural organic matter on the surfaces of living cells: implications for the interaction of toxic solutes with aquatic biota. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, 54: 2543-2554.

CETESB. (1996). **Água: teste de toxicidade com *Chlorella vulgaris*: método de ensaio: Norma Técnica L5.020**. São Paulo. p. 15.

ERRECALDE, O.; SEIDL, M.; CAMPBELL, P. G. C. (1998). Influence of a low molecular weight metabolite (citrate) on the toxicity of cadmium and zinc to the unicellular green alga *Selenastrum capricornutum*: an exception to the free-ion model. **Water Research**, 32 (2): 419-429.

ESTEVEES, F. A. (1998). Elementos-traço. In: _____. **Fundamentos de Limnologia**. 2. ed. Rio de Janeiro: Interciência. p. 285-299.

FISHER, N. S.; FROOD, G. J. (1980). Heavy metals and marine diatoms: influence of dissolved organic compounds on toxicity and selection for metal tolerance among four species. **Marine Biology**, 59: 85-93.

FOGG, G. E. (1975). **Algal cultures and phytoplankton ecology**. 2nd. Ed. University of Winsconsin Press, USA.

FOX, L. E. (1984). The relationship between dissolved humic acids and soluble iron in estuaries. **Geochimica et Cosmochimica Acta**, 48: 879-885.

GONZALEZ-DAVILA, M.; SANTANA-CASIANO, J. M.; PEREZ-PEÑA J.; MILLERO, F. J. (1995). Binding of Cu(II) to the surface and exudates of the alga *Dunaliella tertiolecta* in seawater. **Environmental Science and Technology**, 29: 289-301.

GUILLARD, R. R. L.; LORENZEN, C. J. (1972). Yellow-green algae with chlorophyllide-c. **Journal of Phycology**, 8: 10-14.

HIDALGO, T. R. M. (1999). **Toxicidade de cobre em *Scenedesmus acuminatus***. São Carlos, 1999. 34 f. Monografia (Bacharel em Ciências Biológicas) – Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de São Carlos.

LOMBARDI, A. T. (1995). **Caracterização fluorimétrica da matéria orgânica natural e sua complexação com íons cobre**. Campinas, 1995. 132 f. Tese (Doutorado em Química) – Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas.

LOMBARDI, A. T.; JARDIM W. F. (1997a). The complexation of marine and terrestrial organic materials with copper(II) ions as determined by fluorescence quenching. **Chemical Speciation and Bioavailability**, 9: 27-34.

LOMBARDI, A. T.; JARDIM, W. F. (1997b). Synchronous-scan fluorescence and the complexation of copper(II) ions by humic substances. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, 8: 339-342.

LOMBARDI, A. T.; VIEIRA, A. A. H. (1998). Lead and copper toxicity to *Nephrocytium lunatum* (Chlorophyceae) and their complexation with excreted material. **Revista de Microbiologia**, 29: 44-48.

LOMBARDI, A. T.; VIEIRA, A. A. H. (2000). Copper complexation by Cyanophyta and Chlorophyta exudates. **Phycologia**, 39: 118-125.

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

OCHIAI, E. I. (1995). Toxicity of heavy metals and biological defense: Principles and applications in bioinorganic chemistry. **VII Journal of Chemical Education**, 72 (6): 479-483.

OLIVEIRA, C. R.; LOMBARDI, A. T.; JARDIM, W. F. (1995). Copper complexation by naturally occurring organic matter: a multiligand model. **Chemical Speciation and Bioavailability**, 7: 125-131.

REINFELDER, J. R.; FISHER, N. S.; LUOMA, S. N.; NICHOLS, J. W.; WANG, W. X. (1998). Trace element trophic transfer in aquatic organisms: a critique of the kinetic model approach. **Science of the Total Environment**, 219: 117-135.

ROCHA, O. (2000). A poluição química e a biodiversidade. In: ENCONTRO DE ECOTOXICOLOGIA, "Ecologia e desenvolvimento sustentável: perspectivas para o século XXI". 2000, São Carlos. **Resumos**. São Carlos: USP. p.25.

RAINBOW, P. S.; DALLINGER, R. (1993). Accumulation and effects of trace metals in freshwater invertebrates. In: DALLINGER, R.; RAINBOW, P. S. (Ed). **Ecotoxicology of metal in invertebrate**. Boca Raton, FL: Lewis publishers. p. 119-131.

SAAR, R. A.; WEBER, J. H. (1982). Fulvic acid: modifier of metal-ion chemistry. **Environmental Science and Technology**, 16: 510A-517A.

SALOMONS, W.; FOSTER, U. (1984). **Metals in the hydrocycle**. Springer – Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, Tokyo. p. 349.

SLAUENWHITE, D. E.; WANGERSKY, P. J. (1991). Behavior of copper and cadmium during a phytoplankton bloom: a mesocosm experiment. **Marine Chemistry**, 32: 37-50.

STRICKLAND, J. D. H. & PARSONS, T. (1972). **A practical handbook of seawater analysis**. 2 (Bulletin, 122) Ottawa, Fisheries Researchs, Board of Can. 172 p.

TAYLOR, G; BAIRD, D.J.; SOARES, A. M. V. (1998). Surface binding contaminants by algae: consequences for letal toxicity and feeding to *Daphnia magna* Straus. **Environmental Toxicology and Chemistry**, 17 (3): 412-419.

VOELKER, B. M.; KOGUT, M. B. (2001). Interpretation of metal speciation data in coastal waters: the effects of humic substances on copper binding as a test case. **Marine Chemistry**, 74: 303-318.

WANGERSKY, P. J. (1994). Sampling and analysis of particulate and dissolved materials. In: WOTTON R. S. (Ed.). **The biology of particles in aquatic systems**. Boca Raton, U.S.A: Lewis Publishers. p. 7-43.

WOODWELL, G. M. (1974). Toxic substances and ecological cycles. In: **Ecology, evolution and population biology: Readings from Scientific American**. U.S.A: Scientific American Inc. p. 270.

XUE, H-B.; SIGG, L. (1990). Binding of Cu (II) to algae in a metal buffer. **Water Research**, 24 (9): 1129-1136.

OBRA CONSULTADA

BASSFELD, J. C. (2001). **Toxicidade aguda para organismos-teste *Selenastrum capricornutum* Printz (ALGA – CHLOROPHYCEAE) e *Daphnia magna* Straus (CRUSTACEA: CLADOCERA) de cinco agrotóxicos freqüentemente utilizados na Bacia hidrográfica do rio Nhundiaquara – Morretes - PR.** Curitiba, 2001. 106 f. Dissertação (Engenharia Florestal) – Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná.

GERRINGA, L. J. A.; RIJSTENBIL, J. W.; POORTVLIET, T. C. W.; VAN DRIE, J.; SCHOT, M. C. (1995). Speciation of copper and responses of the marine diatom *Ditylum brightwellii* upon increasing copper concentrations. **Aquatic Toxicology**, 31: 77-90.

MA, M.; ZHU, W.; WANG, Z.; WITKAMP, G. J. (2003). Accumulation, assimilation and growth inhibition of copper on freshwater alga (*Scenedesmus subspicatus* 86.81 SAG) in the presence of EDTA and fulvic acid. **Aquatic Toxicology**, 63: 221-228.

MALLICK, N.; MOHN, F. H. (2003). Use of chlorophyll fluorescence in metal-stress research: a case study with the green microalga *Scenedesmus*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 55: 64-69.

MCLARNON-RICHES, C. J.; ROLPH, C. E.; GREENWAY, D. L. A.; ROBINSON, P. K. (1998). Effects of environmental factors and metals on *Selenastrum capricornutum* lipids. **Phytochemistry**, 49 (5): 1241-1247.

OKAMOTO, O. K.; COLEPICOLO, P. (1998). Response of superoxide dismutase to pollutant metal stress in the marine dinoflagellate *Gonyaulax poliedra*. **Comparative Biochemistry and Physiology. Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology**, 119 (1): 67-73.

PEHLIVANOGLU, E.; SEDLAK, D. L. (2004). Bioavailability of wastewater-derived organic nitrogen to the alga *Selenastrum capricornutum*. **Water Research**, 38: 3189-3196.

STAUBER, J. L. 1995. Toxicity testing using marine and freshwater unicellular algae. **Australasian Journal of Ecotoxicology**, 1: 15-24.

STROKES, P. M. (1983). Responses of freshwater algae to metals. In: ROUND/CHAPMAN (Ed.). **Progress in Phycological Research**. Elsevier Science Publishers. p. 87-112.

TERRY, P. A.; STONE, W. (2002). Biosorption of cadmium and copper contaminated water by *Scenedesmus abundans*. **Chemosphere**, 47: 249-255.

YAN, H.; PAN, G. (2002). Toxicity and bioaccumulation of copper in three green microalgal species. **Chemosphere**, 49: 471-476.

WOLTERBEEK, H. T.; VIRAGH, A.; SLOOF, J. E.; BOLIER, G.; VAN DER VEER, B.; KOK, J. (1995). On the uptake and release of Zinc (^{65}Zn) in the growing alga *Selenastrum capricornutum* Printz. **Environmental Pollution**, 88: 85-90.

ANEXOS

TABELA 4 – VARIACÃO DO NÚMERO DE CÉLULAS.ML⁻¹ EM FUNÇÃO DO TEMPO EXPERIMENTAL E DA CONCENTRAÇÃO DE COBRE NOMINAL NOS EXPERIMENTOS SEM MOD

Cu nominal	0 h	24 h	48 h	72 h	96 h
controle A	2,1 x 10 ⁵	2,5 x 10 ⁵	2,9 x 10 ⁵	3,9 x 10 ⁵	4,4 x 10 ⁵
10 ⁻⁷ A	6,9 x 10 ⁵	1,9 x 10 ⁵	1,7 x 10 ⁵	2,1 x 10 ⁵	6,5 x 10 ⁵
10 ⁻⁷ B	6,5 x 10 ⁵	1,7 x 10 ⁵	1,7 x 10 ⁵	1,9 x 10 ⁵	6,3 x 10 ⁵
10 ⁻⁶ A	7,4 x 10 ⁵	1,9 x 10 ⁵	1,8 x 10 ⁵	2,2 x 10 ⁵	2,6 x 10 ⁵
10 ⁻⁶ B	7,2 x 10 ⁵	2 x 10 ⁵	1,9 x 10 ⁵	2,7 x 10 ⁵	2,8 x 10 ⁵
10 ⁻⁹ A	1,37 x 10 ⁶	2,35 x 10 ⁵	2,17 x 10 ⁵	7,64 x 10 ⁵	9,67 x 10 ⁵
10 ⁻⁹ B	8,99 x 10 ⁵	7,87 x 10 ⁵	5,62 x 10 ⁵	7,19 x 10 ⁵	6,75 x 10 ⁵
10 ⁻⁸ A	2,22 x 10 ⁵	2,93 x 10 ⁵	6,97 x 10 ⁵	6,97 x 10 ⁵	4,13 x 10 ⁵
10 ⁻⁸ B	8,55 x 10 ⁵	8,1 x 10 ⁵	9,89 x 10 ⁵	7,87 x 10 ⁵	8,32 x 10 ⁵
10 ⁻⁵ A	1,46 x 10 ⁵	2,13 x 10 ⁵	6,52 x 10 ⁵	8,1 x 10 ⁵	8,99 x 10 ⁵
10 ⁻⁵ B	1,91 x 10 ⁵	5,84 x 10 ⁵	8,77 x 10 ⁵	7,87 x 10 ⁵	6,07 x 10 ⁵
controle B	9,67 x 10 ⁵	5,62 x 10 ⁵	6,29 x 10 ⁵	7,87 x 10 ⁵	1,03 x 10 ⁶
controle C	1,17 x 10 ⁵	8,32 x 10 ⁵	5,39 x 10 ⁵	7,42 x 10 ⁵	8,55 x 10 ⁵
10 ⁻⁴ A	3,59 x 10 ⁵	4,05 x 10 ⁵	3,15 x 10 ⁵	3,82 x 10 ⁵	3,52 x 10 ⁵
10 ⁻⁴ B	4,05 x 10 ⁵	4,94 x 10 ⁵	3,6 x 10 ⁵	4,27 x 10 ⁵	4,95 x 10 ⁵
10 ⁻³ A	4,94 x 10 ⁵	1,6 x 10 ⁵	4,5 x 10 ⁵	6,3 x 10 ⁵	5,62 x 10 ⁵
10 ⁻³ B	4,72 x 10 ⁵	4,27 x 10 ⁵	4,5 x 10 ⁵	6,52 x 10 ⁵	4,05 x 10 ⁵

TABELA 5 – VARIACÃO DO NÚMERO DE CÉLULAS.ML⁻¹ EM FUNÇÃO DO TEMPO EXPERIMENTAL E DA CONCENTRAÇÃO DE COBRE NOMINAL NOS EXPERIMENTOS COM MOD

AMOSTRA	0 h	24 h	48 h	72 h	96 h
controle A	3,82 x 10 ⁵	4,72 x 10 ⁵	6,29 x 10 ⁵	7,19 x 10 ⁵	1,55 x 10 ⁶
controle B	4,05 x 10 ⁵	4,72 x 10 ⁵	4,49 x 10 ⁵	6,07 x 10 ⁵	8,99 x 10 ⁵
10 ⁻⁷ A	3,37 x 10 ⁵	2,47 x 10 ⁵	3,24 x 10 ⁵	3,68 x 10 ⁵	4,13 x 10 ⁵
10 ⁻⁷ B	4,27 x 10 ⁵	2,57 x 10 ⁵	2,35 x 10 ⁵	3,46 x 10 ⁵	4,35 x 10 ⁵
10 ⁻⁶ A	4,27 x 10 ⁵	2,22 x 10 ⁵	2,08 x 10 ⁵	3,15 x 10 ⁵	3,95 x 10 ⁵
10 ⁻⁶ B	3,37 x 10 ⁵	4,57 x 10 ⁵	3,33 x 10 ⁵	3,02 x 10 ⁵	3,86 x 10 ⁵
10 ⁻⁹ A	5,08 x 10 ⁵	4,37 x 10 ⁵	4,89 x 10 ⁵	5,18 x 10 ⁵	5,97 x 10 ⁵
10 ⁻⁹ B	5,73 x 10 ⁵	4,81 x 10 ⁵	5,0 x 10 ⁵	5,39 x 10 ⁵	5,87 x 10 ⁵
10 ⁻⁸ A	5,27 x 10 ⁵	4,72 x 10 ⁵	4,49 x 10 ⁵	5,02 x 10 ⁵	5,73 x 10 ⁵
10 ⁻⁸ B	6,17 x 10 ⁵	5,43 x 10 ⁵	4,33 x 10 ⁵	4,96 x 10 ⁵	5,15 x 10 ⁵
10 ⁻⁵ A	5,74 x 10 ⁵	3,87 x 10 ⁵	2,23 x 10 ⁵	3,93 x 10 ⁵	4,67 x 10 ⁵
10 ⁻⁵ B	6,03 x 10 ⁵	4,50 x 10 ⁵	2,89 x 10 ⁵	4,07 x 10 ⁵	5,13 x 10 ⁵
controle C	6,07 x 10 ⁵	7,42 x 10 ⁵	6,75 x 10 ⁵	8,55 x 10 ⁵	7,65 x 10 ⁵
controle D	5,85 x 10 ⁵	6,75 x 10 ⁵	7,19 x 10 ⁵	6,97 x 10 ⁵	8,77 x 10 ⁵
10 ⁻⁴ A	5,62 x 10 ⁵	2,66 x 10 ⁵	3,15 x 10 ⁵	1,68 x 10 ⁵	3,37 x 10 ⁵
10 ⁻⁴ B	7,42 x 10 ⁵	1,77 x 10 ⁵	2,69 x 10 ⁵	2,69 x 10 ⁵	2,7 x 10 ⁵
10 ⁻³ A	5,17 x 10 ⁵	1,86 x 10 ⁵	2,69 x 10 ⁵	1,95 x 10 ⁵	3,15 x 10 ⁵
10 ⁻³ B	5,17 x 10 ⁵	3,82 x 10 ⁵	2,69 x 10 ⁵	2,47 x 10 ⁵	3,37 x 10 ⁵

FIGURA 8 – CLOROFILA-A EM FUNÇÃO DO TEMPO EXPERIMENTAL NOS EXPERIMENTOS CONTROLE SEM PRESENÇA DE MOD

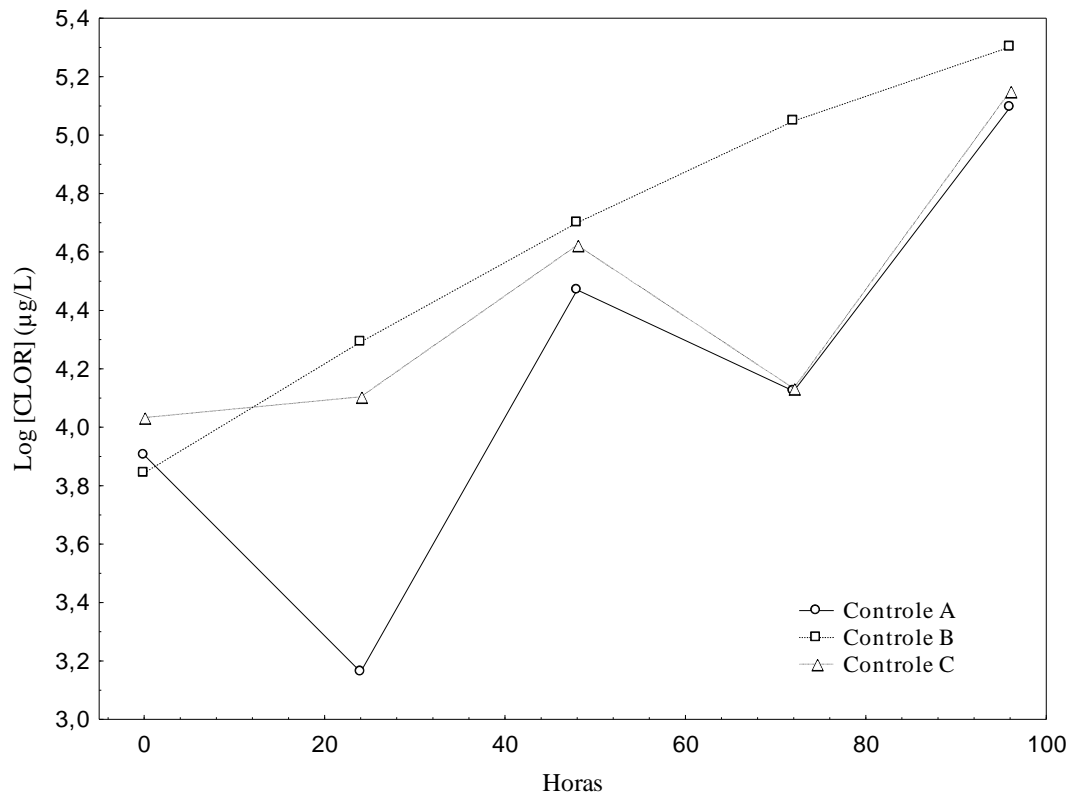


FIGURA 9 – CLOROFILA-A EM FUNÇÃO DO TEMPO EXPERIMENTAL NOS EXPERIMENTOS COM CONCENTRAÇÃO NOMINAL DE COBRE 10^{-9} M SEM PRESENÇA DE MOD

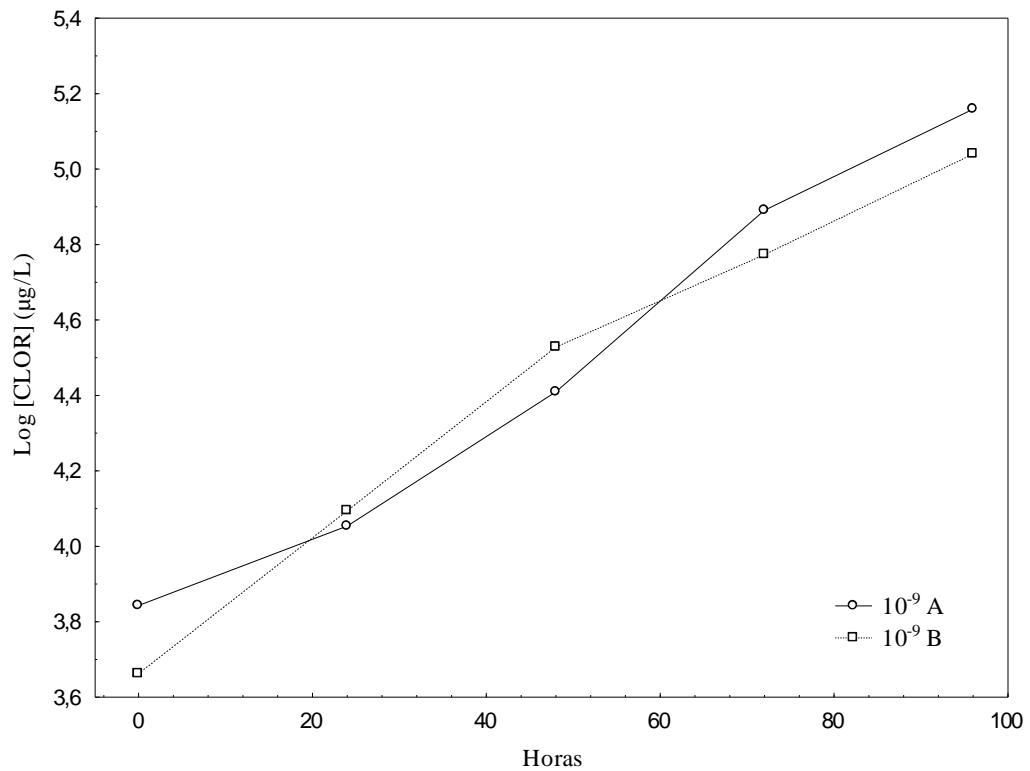


FIGURA 10 – CLOROFILA-A EM FUNÇÃO DO TEMPO EXPERIMENTAL NOS EXPERIMENTOS COM CONCENTRAÇÃO NOMINAL DE COBRE 10^{-8} M SEM PRESENÇA DE MOD

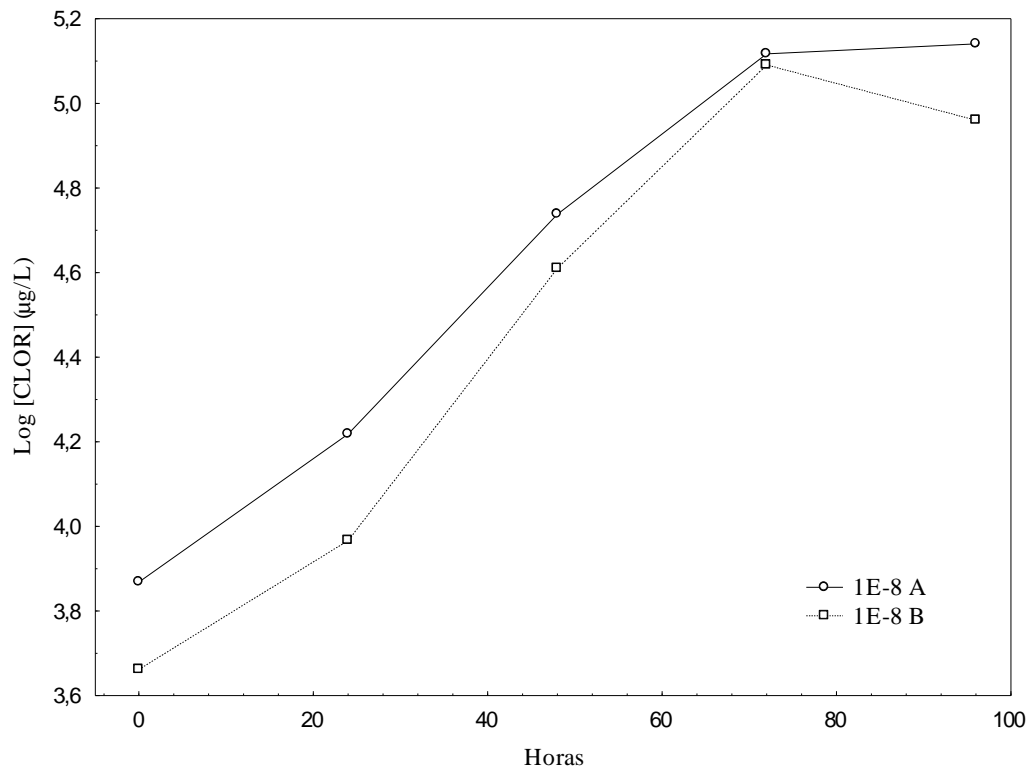


FIGURA 11 – CLOROFILA-A EM FUNÇÃO DO TEMPO EXPERIMENTAL NOS EXPERIMENTOS COM CONCENTRAÇÃO NOMINAL DE COBRE 10^{-7} M SEM PRESENÇA DE MOD

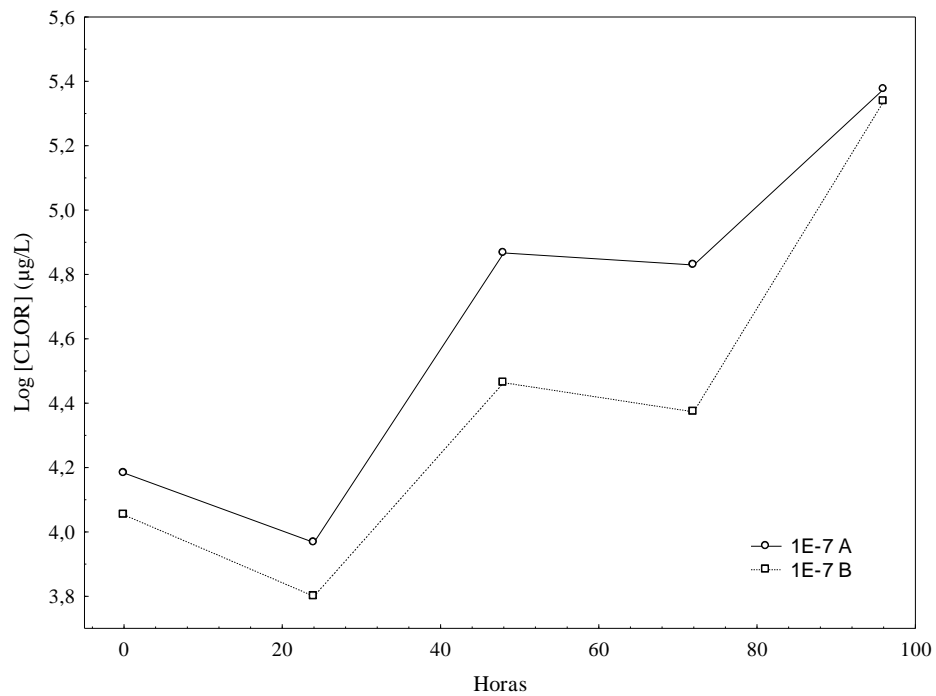


FIGURA 12 – CLOROFILA-A EM FUNÇÃO DO TEMPO EXPERIMENTAL NOS EXPERIMENTOS COM CONCENTRAÇÃO NOMINAL DE COBRE 10^{-6} M SEM PRESENÇA DE MOD

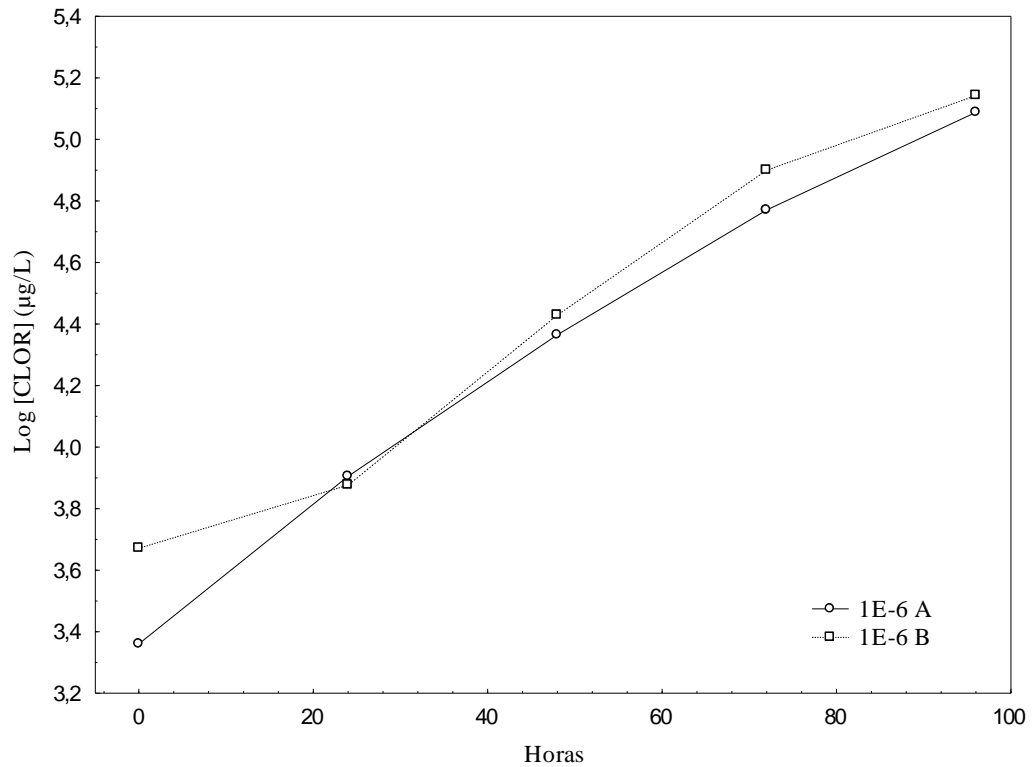


FIGURA 13 – CLOROFILA-A EM FUNÇÃO DO TEMPO EXPERIMENTAL NOS EXPERIMENTOS SEM PRESENÇA DE MOD COM CONCENTRAÇÃO NOMINAL DE COBRE 10^{-5} M

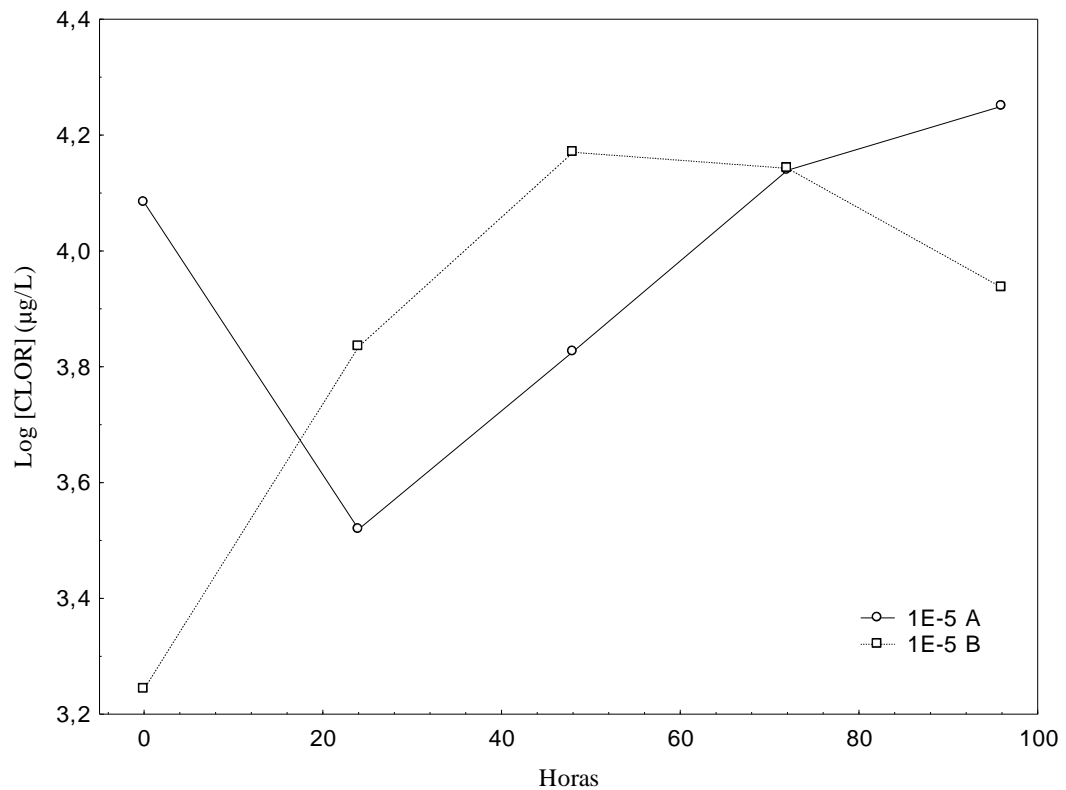


FIGURA 14 – CLOROFILA-A EM FUNÇÃO DO TEMPO EXPERIMENTAL NOS EXPERIMENTOS COM CONCENTRAÇÃO NOMINAL DE COBRE 10^{-4} M SEM PRESENÇA DE MOD

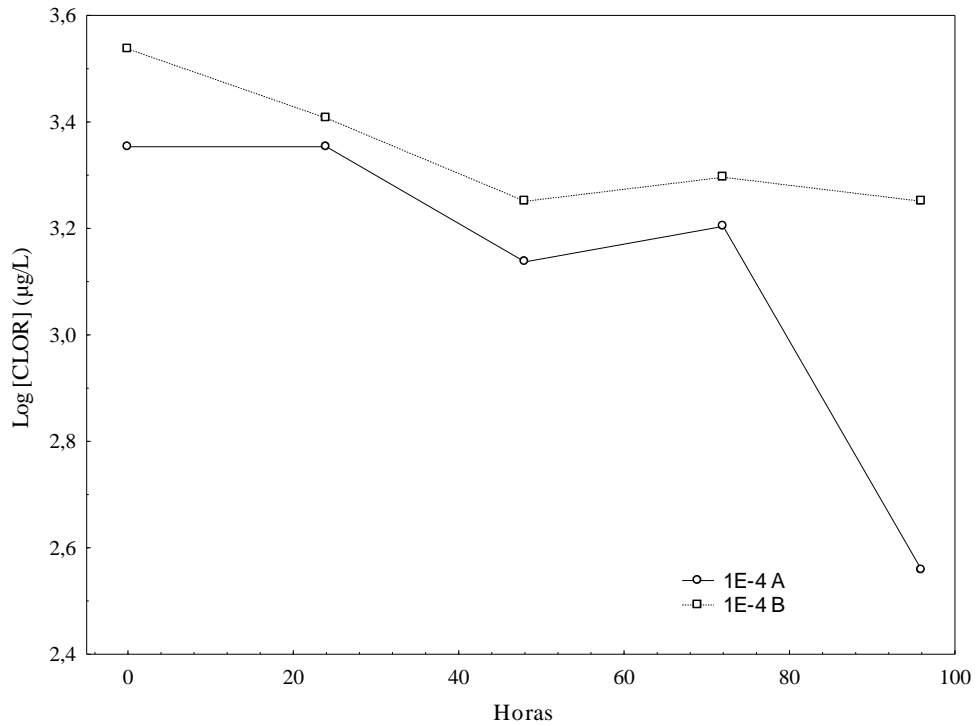


FIGURA 15 – CLOROFILA-A EM FUNÇÃO DO TEMPO EXPERIMENTAL NOS EXPERIMENTOS COM CONCENTRAÇÃO NOMINAL DE COBRE 10^{-3} M SEM PRESENÇA DE MOD

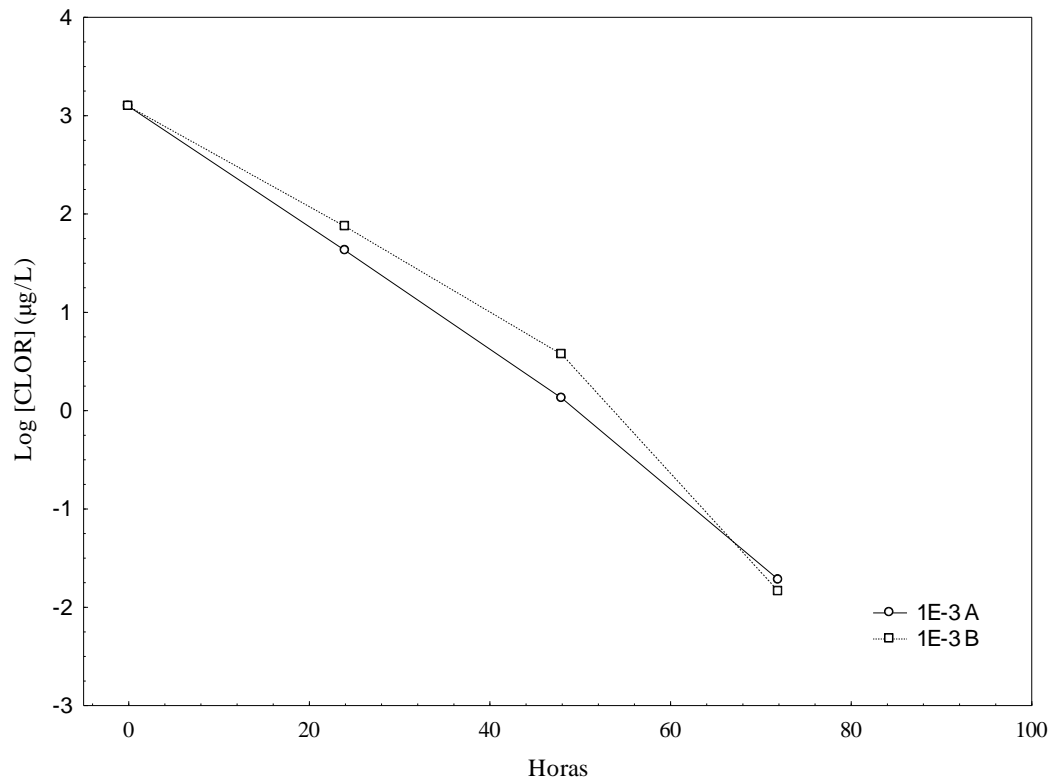


FIGURA 16 – CLOROFILA-A EM FUNÇÃO DO TEMPO EXPERIMENTAL NOS EXPERIMENTOS CONTROLE COM PRESENÇA DE MOD

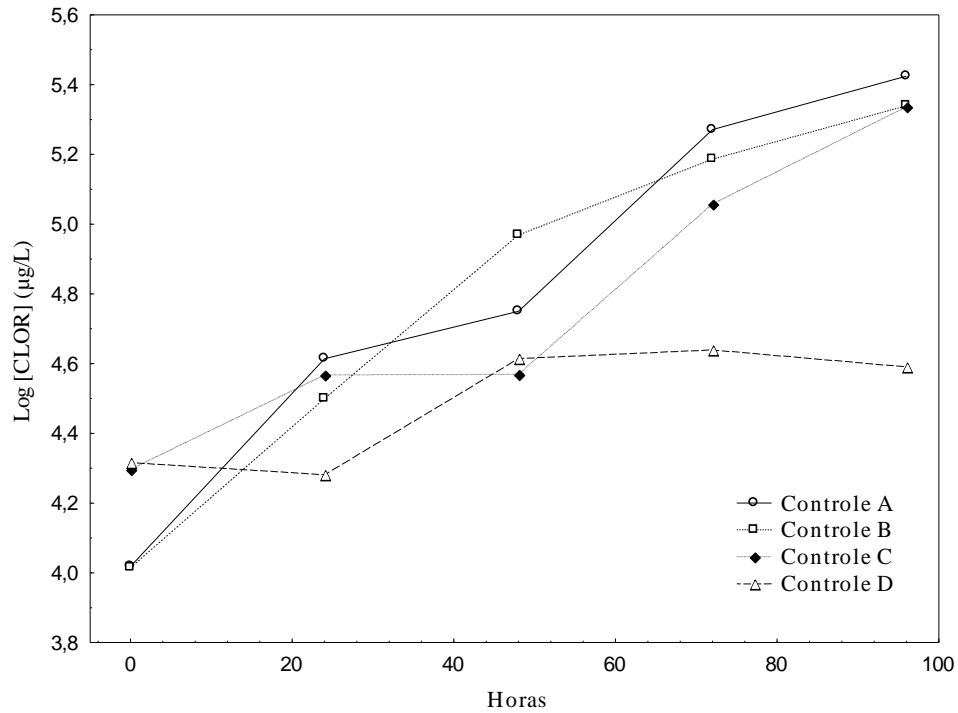


FIGURA 17 – CLOROFILA-A EM FUNÇÃO DO TEMPO EXPERIMENTAL NOS EXPERIMENTOS COM CONCENTRAÇÃO NOMINAL DE COBRE 10^{-9} M COM PRESENÇA DE MOD

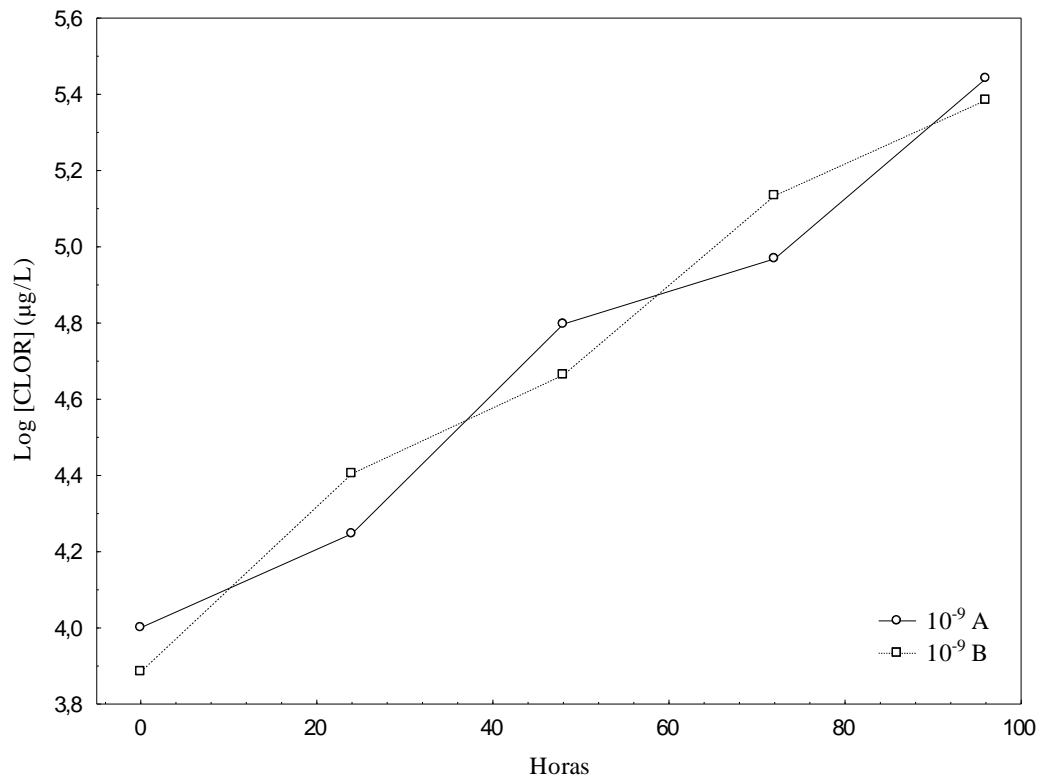


FIGURA 18 – CLOROFILA-A EM FUNÇÃO DO TEMPO EXPERIMENTAL NOS EXPERIMENTOS COM CONCENTRAÇÃO NOMINAL DE COBRE 10^{-8} M COM PRESENÇA DE MOD

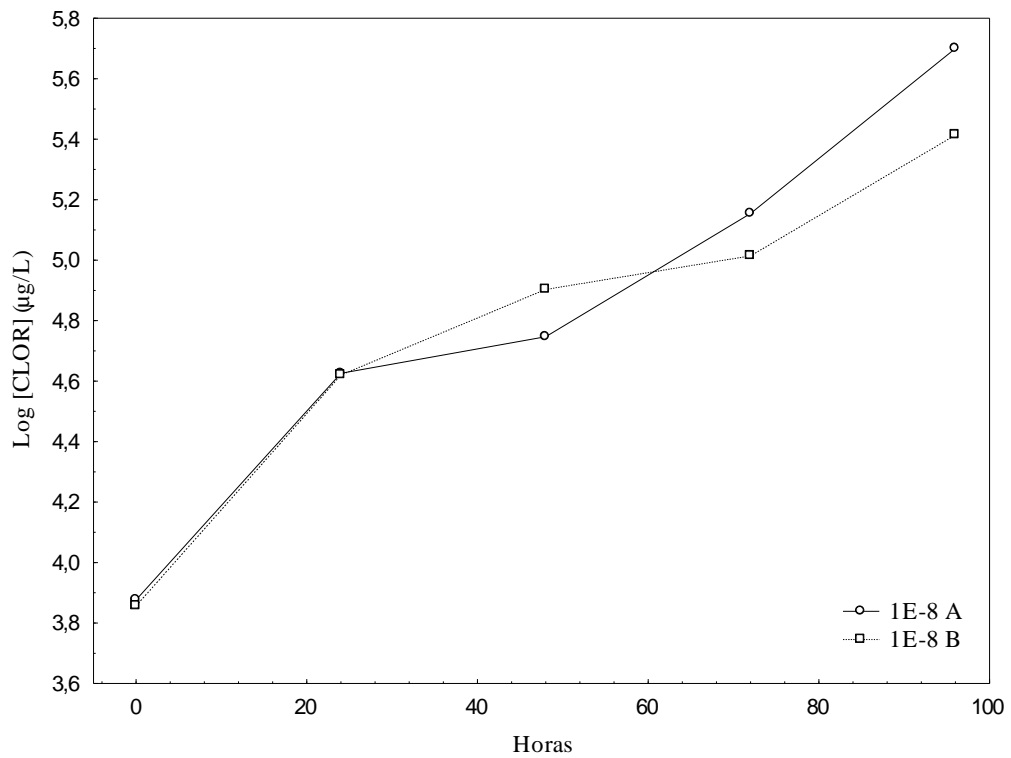


FIGURA 19 – CLOROFILA-A EM FUNÇÃO DO TEMPO EXPERIMENTAL NOS EXPERIMENTOS COM CONCENTRAÇÃO NOMINAL DE COBRE 10^{-7} M COM PRESENÇA DE MOD

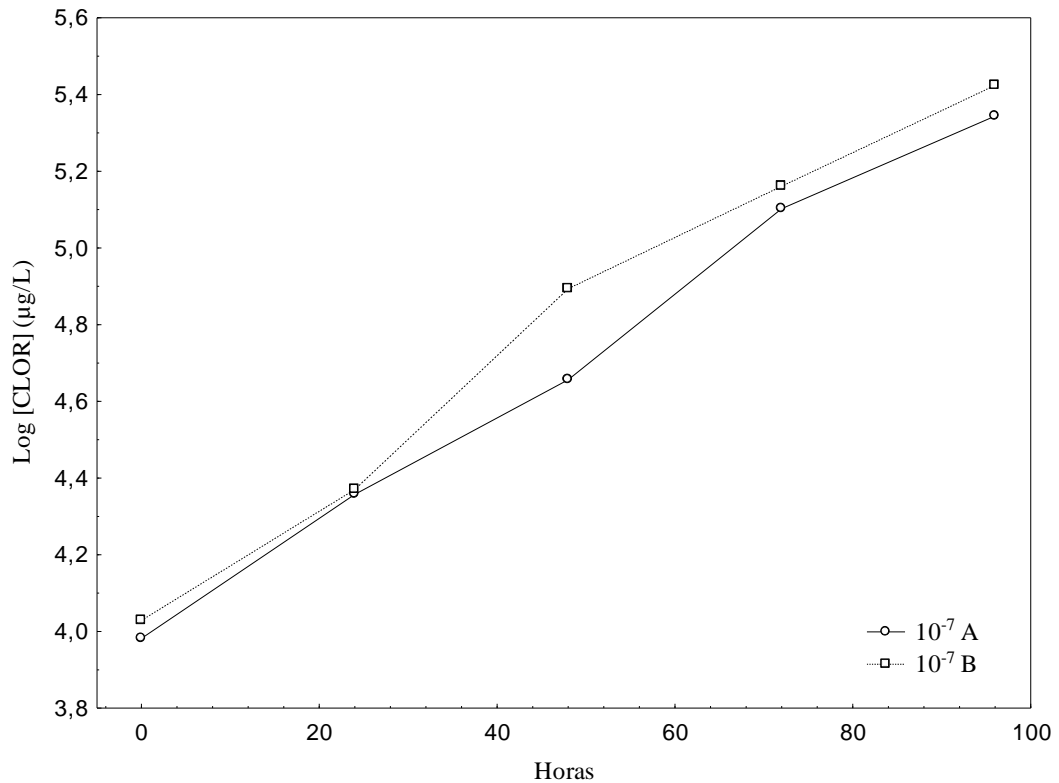


FIGURA 20 – CLOROFILA-A EM FUNÇÃO DO TEMPO EXPERIMENTAL NOS EXPERIMENTOS COM CONCENTRAÇÃO NOMINAL DE COBRE 10^{-6} M COM PRESENÇA DE MOD

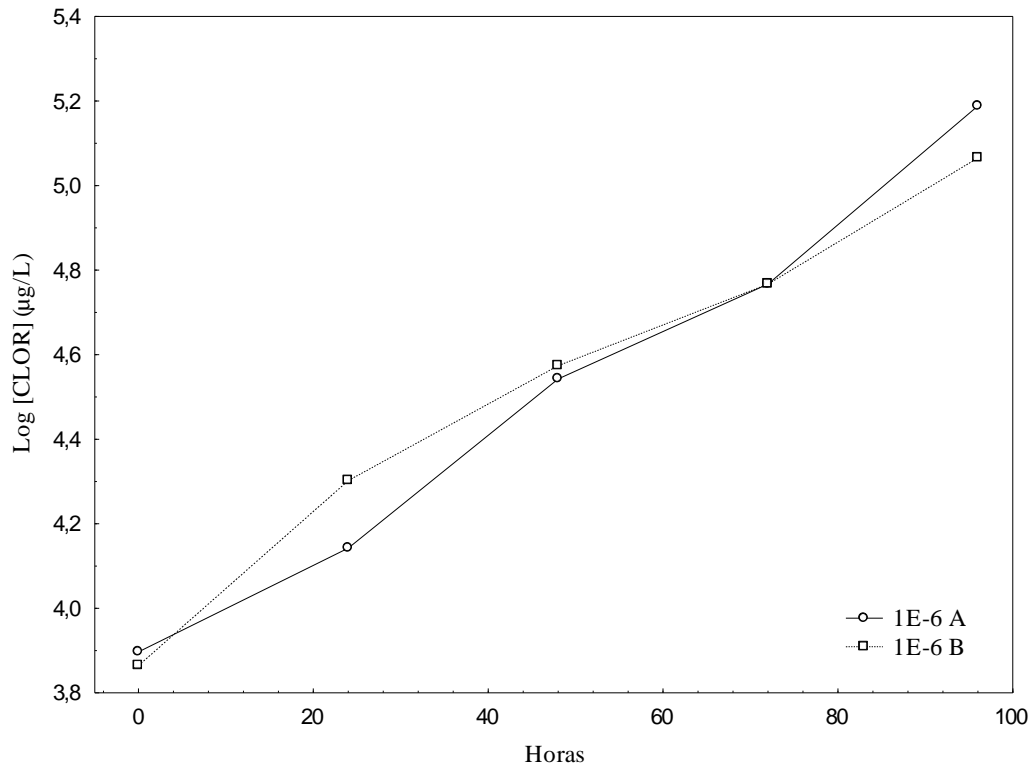


FIGURA 21 – CLOROFILA-A EM FUNÇÃO DO TEMPO EXPERIMENTAL NOS EXPERIMENTOS COM CONCENTRAÇÃO NOMINAL DE COBRE 10^{-5} M COM PRESENÇA DE MOD

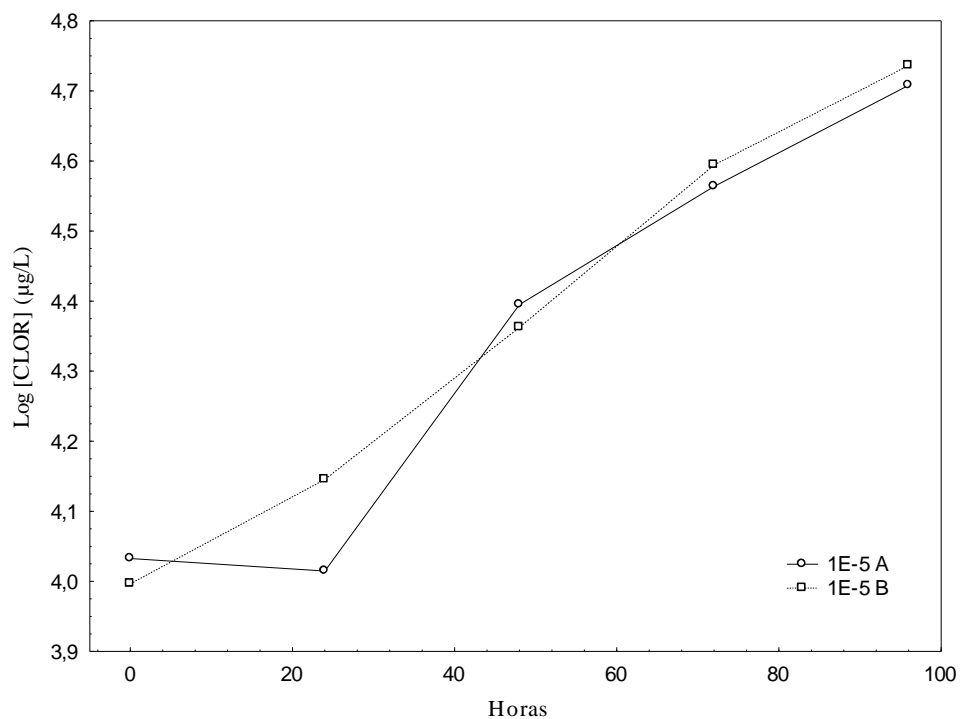


FIGURA 22 – CLOROFILA-A EM FUNÇÃO DO TEMPO EXPERIMENTAL NOS EXPERIMENTOS COM CONCENTRAÇÃO NOMINAL DE COBRE 10^{-4} M COM PRESENÇA DE MOD

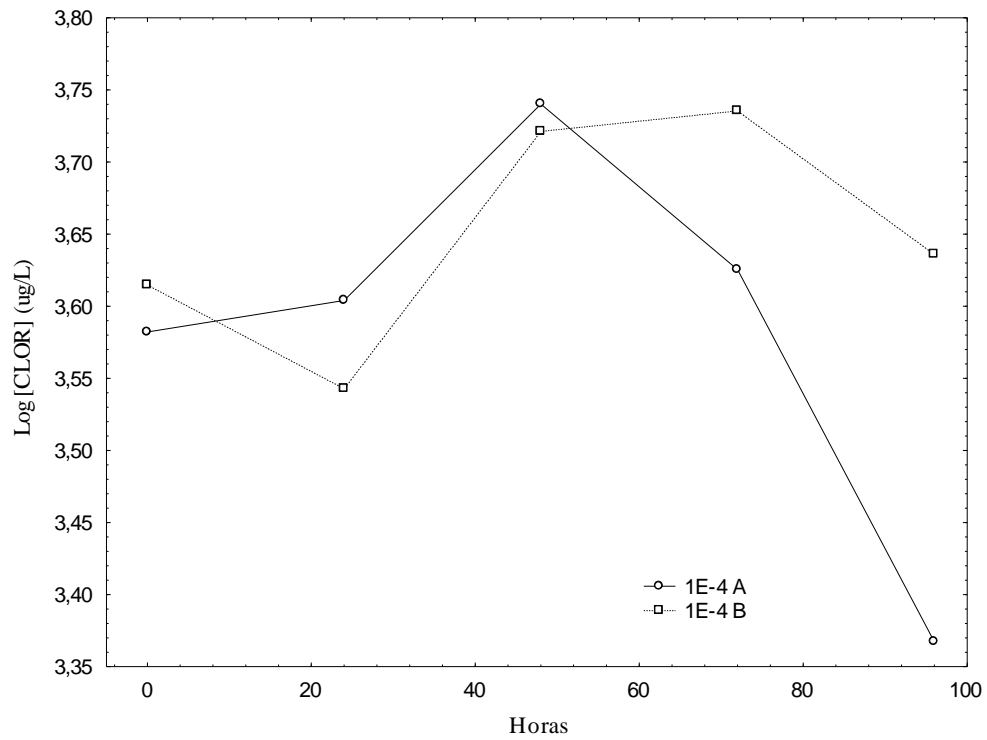


FIGURA 23 – CLOROFILA-A EM FUNÇÃO DO TEMPO EXPERIMENTAL NOS EXPERIMENTOS COM CONCENTRAÇÃO NOMINAL DE COBRE 10^{-3} M COM PRESENÇA DE MOD

