Claudia Camila Minei

Sensibilidade da microalga marinha *Dunaliella tertiolecta* BUTCHER a
diferentes substâncias químicas utilizadas como referência
em ensaios ecotoxicológicos

Dissertação apresentada ao
Instituto Oceanográfico da Universidade
de São Paulo, como parte dos requisitos
para obtenção do título de Mestre em
Ciências, área de Oceanografia Biológica.

Orientadora: Prof^a Dra. Eduinetty
Ceci Pereira Moreira de Sousa

São Paulo / SP

2011

Universidade de São Paulo
Instituto Oceanográfico

Sensibilidade da microalga marinha *Dunaliella tertiolecta* BUTCHER a
diferentes substâncias químicas utilizadas como referência em ensaios
ecotoxicológicos

Claudia Camila Minei

Dissertação apresentada ao
Instituto Oceanográfico da Universidade
de São Paulo, como parte dos requisitos
para obtenção do título de Mestre em
Ciências, área de Oceanografia Biológica

Julgada em ____/____/____

Prof(a). Dr(a). Eduinetty Ceci P. M. de Sousa

Conceito

Prof(a). Dr(a).

Conceito

Prof(a). Dr(a).

Conceito

Aos meus irmãos,
razão e coração.

AGRADECIMENTOS

À prof^a Ceci, sempre muito paciente e atenciosa, principalmente pelo convívio e orientação. Obrigada pela oportunidade e por me apresentar à Ecotoxicologia.

À Marcia, técnica do laboratório, que participou de todas as etapas, desde o estágio até a conclusão deste trabalho de mestrado, contribuindo com muitas informações e sugestões.

À Dra. Sônia Giancesella pelo fornecimento da microalga *Dunaliella tertiolecta*, utilizada neste trabalho e disponibilização de equipamentos do Laboratório de Microrganismos Marinhos. À Dra. Flávia Saldanha-Corrêa e aos técnicos Tomás Silva e especialmente à Marta Stephan, por tornarem possível a realização deste trabalho.

Ao Dr. David pelos esclarecimentos sobre a metodologia.

À técnica Maysa Pompeu, pelo auxílio com a microscopia de contraste de fase.

À bióloga Paula Nishimura, do Instituto de Biociências pela ajuda com a montagem das lâminas semi-permanentes.

Aos biólogos da Aplysia Katia, Felipe e Karina, por sanarem muitas dúvidas estatísticas.

Aos membros da Comissão de Estudo Especial de Análises Ecotoxicológicas da ABNT pelas discussões muito produtivas durante a revisão do protocolo de ensaios com microalgas.

Aos amigos do Laboratório de Ecotoxicologia marinha e Microfitobentos Aline, Luís, Lelê, Mariana, Marília, Tullus, Gustavo, Karen, Camila, Mônica, Fabi, Karla, Priscila, Cristiano, Gil, Renato, Diogo e Mari pelas viagens, coletas e “experiências”.

Às meninas do Laboratório de Sistemas Planctônicos Naira, Túlia, Catarina, Lú e Dani, pelos *happy hours*, passeios, festinhas e nossa viagem inesquecível.

À Prof^a Bia pela amizade e alegria em todos os cafezinhos matinais, sempre acompanhada por suas filhas, netinhas, André e Teresa.

Ao Dr. Masami não só pelas imagens da *Dunaliella tertiolecta*, mas também pelas inúmeras conversas “fotográficas”.

Aos meus pais e meus irmãos pelo amor e apoio em todos os momentos. Às minhas tias, também mestres, pelo exemplo.

Ao Joel, quem admiro e confio, por toda dedicação e carinho.

Aos meus amigos de faculdade, já doutores, Alê, Thiago, Zé, Capeta, Doug, Sol, Loboda, e Sergio que me incentivaram a voltar para a vida acadêmica, por nossa “evolução”.

Às minhas amigas de infância Ester, Ligia, Karen e Camila, por divertirem todos os meus dias e literalmente cuidarem de mim.

À Didi e suas funcionárias pelas agradáveis refeições.

Ao Instituto Oceanográfico da USP e seus funcionários, pela infraestrutura e suporte. Principalmente à Marlene e Mirian da secretaria do DOB, Valter, Nilson e Iberê da informática, Wagner e Dona Rai da biblioteca, Ana Paula, Silvana e Letícia da secretaria de pós-graduação, Jorge, assistente acadêmico, Marcia do setor financeiro, Sr. Pedro, da gráfica e Caio, técnico da base de Ubatuba.

Aos Membros da banca pelas valiosas críticas e sugestões.

Ao CNPq pela concessão da bolsa de mestrado e à CAPES pelo suporte financeiro.

RESUMO

Sensibilidade da microalga marinha *Dunaliella tertiolecta* BUTCHER a diferentes substâncias químicas utilizadas como referência em ensaios ecotoxicológicos

Os ensaios ecotoxicológicos com o fitoplâncton marinho têm sido uma importante ferramenta para o monitoramento da qualidade de águas devido à sua relevância ecológica. A variabilidade dos resultados dos ensaios ecotoxicológicos também pode ser atribuída à sensibilidade do lote de organismos-teste. O presente trabalho traz informações da sensibilidade de *Dunaliella tertiolecta* para as substâncias de referências, dicromato de potássio, dodecil sulfato de sódio, cromato de potássio, sulfato de zinco e sulfato de cobre, e dois métodos de determinação da biomassa. As concentrações inibitórias com a densidade celular foram $CI_{50-48h} = 177,1$, $CI_{50-72h} = 129,8$ e $CI_{50-96h} = 108,5$ mg/L de $K_2Cr_2O_7$; $CI_{50-48h} = 0,97$, $CI_{50-72h} = 1,25$ e $CI_{50-96h} = 1,18$ mg/L de DSS e $CI_{50-96h} = 273,3$ mg/L de K_2CrO_4 . Para o conteúdo de clorofila-a (96h), foram $CI_{50-CI-a} = 113,0$ mg/L de $K_2Cr_2O_7$; $CI_{50-CI-a} = 1,26$ mg/L de DSS e $CI_{50-CI-a} = 150,6$ mg/L de K_2CrO_4 . A sensibilidade da microalga foi maior ao DSS, altamente degradável, em relação aos compostos metálicos, com potencial carcinogênico. As 96h de exposição resultaram em melhor repetibilidade, não havendo diferença significativa entre os métodos utilizados. Na seleção da substância de referência e do método também devem ser considerados os resíduos gerados e a periculosidade dos reagentes, visando à qualidade dos resultados e um menor impacto ao ambiente.

Palavras-chave: Ecotoxicologia; microalga marinha; substância de referência; contagem celular; conteúdo de clorofila-a.

ABSTRACT

Sensitivity of the marine microalgae *Dunaliella tertiolecta* BUTCHER to different chemical substances utilized as toxicity test reference

The toxicity tests with marine phytoplankton have been an important tool for the water quality monitoring due to its ecological relevance. The variability of the toxicity tests results can also be attributed to the test-organisms batch sensitivity. This study provides information about the sensitivity of *Dunaliella tertiolecta* to the reference substances potassium dichromate, sodium dodecyl sulfate, potassium chromate, zinc sulfate and copper sulfate, and two methods of biomass determination. The inhibitory concentrations were IC₅₀-48h= 177.1, IC₅₀-72h= 129.8 and IC₅₀-96h= 108.5mg/L of K₂Cr₂O₇; IC₅₀-48h= 0.97, IC₅₀-72h= 1.25 and IC₅₀-96h= 1.18mg/L of DSS and IC₅₀-96h= 273,3mg/L of K₂CrO₄. For the chlorophyll-a content (96h) were IC₅₀-Cl-a= 113.0mg/L of K₂Cr₂O₇, IC₅₀-Cl-a= 1.26mg/L of SDS and IC₅₀-Cl-a= 150,6mg/L of K₂CrO₄. The microalgae sensibility was higher to DSS, highly degradable related to metallic compounds, with carcinogenic potential. The 96h of exposure resulted in better repeatability, with no significant difference between the tested methods. In the reference substance and method selection the generated residues and the hazard reagent must be considered, due to the results quality and a lower impact on the ambient.

Key-words: Toxicity test; marine microalgae; reference substance; cell count; chlorophyll-a content.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Microalga *Dunaliella tertiolecta* em microscopia de contraste de fase. Fotografia em HDR de E. Masami..... 8
- Figura 2.** Espectro de absorção de luz da clorofila-*a*. Adaptado de *Chemical of the week – Chlorophyll* 13
- Figura 3.** Estrutura química da clorofila-*a* e da feofitina-*a*. Adaptado de *Chemical of the week - Chlorophyll* 13
- Figura 4.** Curva de crescimento de *Dunaliella tertiolecta* obtida durante 10 dias de cultivo, determinada pela densidade celular (cél/mL) e pela taxa de crescimento (duplicações/dia) 22
- Figura 5.** Densidade celular (cél/mL) e taxa de crescimento (duplicações/dia) de *Dunaliella tertiolecta* após (A) 24h, (B) 48 h, (C) 72 h e (D) 96 h de exposição a diferentes salinidades..... 24
- Figura 6.** (A) Densidade celular (cél/mL) e (B) taxa de crescimento (duplicações/dia) de *Dunaliella tertiolecta* após 24h, 48 h, 72 h e 96 h de exposição a diferentes salinidades..... 25
- Figura 7.** Média de densidade celular (cél/mL) de *Dunaliella tertiolecta* após 48 h, 72 h e 96 h de exposição ao dicromato de potássio (mg/L) e média do conteúdo de clorofila-*a* (µg/L) após 96 h 29
- Figura 8.** Taxas médias de crescimento (duplicações/dia) de *Dunaliella tertiolecta* após 48 h, 72 h e 96 h de exposição ao dicromato de potássio (mg/L) obtidas pelo densidade celular e após 96 h e pelo conteúdo de clorofila-*a* 31

Figura 9. Médias de inibição (%) de <i>Dunaliella tertiolecta</i> após 48 h, 72 h e 96 h de exposição ao dicromato de potássio (mg/L), obtidas pela densidade celular e após 96 h pelo conteúdo de clorofila-a.....	32
Figura 10. Razão média de clorofila-a por célula (Pg Cl-a/cél) para <i>Dunaliella tertiolecta</i> após 96 h de exposição ao dicromato de potássio	33
Figura 11. Carta-controlre preliminar para <i>Dunaliella tertiolecta</i> exposta ao dicromato de potássio (mg/L). Método de determinação da densidade celular de A a C e de conteúdo de clorofila-a em D	36
Figura 12. Média de crescimento (cél/mL) de <i>Dunaliella tertiolecta</i> após 48 h, 72 h e 96 h de exposição ao dodecil sulfato de sódio (mg/L), obtida pela densidade celular e após 96 h pelo conteúdo de clorofila-a.....	40
Figura 13. Médias das taxas de crescimento (duplicações/dia) de <i>Dunaliella tertiolecta</i> após 48 h, 72 h e 96 h de exposição ao dodecil sulfato de sódio (mg/L), obtidas pela densidade celular e após 96 h pelo conteúdo de clorofila-a.....	42
Figura 14. Médias de inibição (%) de <i>Dunaliella tertiolecta</i> após 48 h, 72 h e 96 h de exposição ao dodecil sulfato de sódio (mg/L), obtidas pela densidade celular e de conteúdo de clorofila-a.....	43
Figura 15. Razão média de clorofila-a por célula (Pg Cl-a/cél) de <i>Dunaliella tertiolecta</i> após 96 h de exposição ao dodecil sulfato de sódio.....	44
Figura 16. Cartas-controlre preliminares para <i>Dunaliella tertiolecta</i> exposta ao dodecil sulfato de sódio (mg/L). Método de determinação da densidade celular em A e conteúdo de clorofila-a em B	47
Figura 17. Densidade celular média (cél/mL) de <i>Dunaliella tertiolecta</i> após 48 h, 72 h e 96 h de exposição ao cromato de potássio (mg/L) e conteúdo de conteúdo de clorofila-a após 96 h	51

Figura 18. Taxa média de crescimento (duplicações/dia) de *Dunaliella tertiolecta* após 48 h, 72 h e 96 h de exposição ao cromato de potássio (mg/L), obtida pela densidade celular e taxa de incremento de clorofila-a após 96 h .. 53

Figura 19. Inibição média (%) de *Dunaliella tertiolecta* após 48 h, 72 h e 96 h de exposição ao cromato de potássio (mg/L) obtida pela densidade celular e após 96 h pelo conteúdo de clorofila-a..... 53

Figura 20. Razão média de clorofila-a por célula (Pg Cl-a/cél) para *Dunaliella tertiolecta* após 96 h de exposição ao cromato de potássio (mg/L)..... 54

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Soluções nutrientes para enriquecimento do meio de cultura	7
Tabela 2. Desenho experimental	10
Tabela 3. Crescimento celular de <i>Dunaliella tertiolecta</i> obtido por (A) densidade celular (cél/mL) e (B) taxa de crescimento (duplicações/dia)	21
Tabela 4. Taxa de crescimento (duplicações/dia) de <i>Dunaliella tertiolecta</i> após 24 h, 48 h, 72 h e 96 h de exposição a diferentes salinidades obtida pela densidade celular (cél/mL)	23
Tabela 5. Densidade celular (cél/mL) de <i>Dunaliella tertiolecta</i> novamente cultivada em meio de cultura fresco após 96 h de exposição ao dicromato de potássio, dodecil sulfato de sódio, cromato de potássio, sulfato de zinco ou sulfato de cobre	26
Tabela 6. Taxa de crescimento (duplicações/dia) e inibição (%) de <i>Dunaliella tertiolecta</i> após 24 h, 48 h e 72 h de exposição ao dicromato de potássio obtidas pela densidade celular e após 72 h pelo conteúdo de clorofila-a.	27
Tabela 7. Crescimento médio de <i>Dunaliella tertiolecta</i> após 48 h, 72 h e 96 h de exposição ao dicromato de potássio (mg/L) avaliado pela densidade celular (cél/mL) e após 96 h pelo conteúdo de clorofila-a (µg/L)	28
Tabela 8. Taxas médias de crescimento (duplicações/dia) e inibição (%) de <i>Dunaliella tertiolecta</i> após 48 h, 72 h e 96 h de exposição ao dicromato de potássio obtidas pela densidade celular e Taxas médias de incremento de após 96 h pelo conteúdo de clorofila-a.	30
Tabela 9. Razão de clorofila-a por célula (Pg Cl-a/cél) para <i>Dunaliella tertiolecta</i> após 96 h de exposição ao dicromato de potássio.....	32

Tabela 10. Correlação de Pearson (r) entre as variáveis físicas e químicas, pH e salinidade, e a taxa de crescimento e a concentração de dicromato de potássio, para $p < 0,05$	34
Tabela 11. Concentrações de inibição (CI ₅₀) de <i>Dunaliella tertiolecta</i> após 48 h, 72 h e 96 h de exposição ao dicromato de potássio (mg/L), obtidas pela densidade celular e após 96 h pelo conteúdo de clorofila- <i>a</i>	35
Tabela 12. Concentrações de efeito não observado (CENO) e concentrações de efeito observado (CEO) de dicromato de potássio (mg/L) para <i>Dunaliella tertiolecta</i> após 48 h, 72 h e 96 h de exposição, obtidas pela densidade celular e após 96 h pelo conteúdo de clorofila- <i>a</i>	37
Tabela 13. Densidade celular (cél/mL), taxa de crescimento (duplicações/dia) e inibição (%) de <i>Dunaliella tertiolecta</i> após 72 h e 96 h de exposição ao dodecil sulfato de sódio, obtidas pela densidade celular	38
Tabela 14. Crescimento médio de <i>Dunaliella tertiolecta</i> após 48 h, 72 h e 96 h de exposição ao dodecil sulfato de sódio obtido pela densidade celular (cél/mL) e após 96 h pelo conteúdo de clorofila- <i>a</i> (µg/L)	39
Tabela 15. Taxas médias de crescimento (duplicações/dia) e inibição (%) de <i>Dunaliella tertiolecta</i> após 48 h, 72 h e 96 h de exposição ao dodecil sulfato de sódio, obtidas pela densidade celular e após 96 h pelo método de clorofila- <i>a</i>	41
Tabela 16. Razão média de clorofila- <i>a</i> por célula (Pg Cl- <i>a</i> /cél) para <i>Dunaliella tertiolecta</i> após 96 h de exposição ao dodecil sulfato de sódio.....	43
Tabela 17. Correlação de Pearson (r) entre as variáveis físicas e químicas, pH, e taxa de crescimento e concentração de dodecil sulfato de sódio, para $p < 0,05$	45

Tabela 18. Concentrações de inibição (CI ₅₀) de <i>Dunaliella tertiolecta</i> após 48 h, 72 h e 96 h de exposição ao dodecil sulfato de sódio (mg/L), obtida pela densidade celular e após 96 h pelo conteúdo de clorofila-a.....	46
Tabela 19. Concentrações de efeito não observado (CENO) e concentrações de efeito observado (CEO) para <i>Dunaliella tertiolecta</i> após 48 h, 72 h e 96 h de exposição ao dodecil sulfato de sódio (mg/L), obtidos pela densidade celular e após 96 h pelo conteúdo de clorofila-a.....	48
Tabela 20. Taxa de crescimento (duplicações/dia) e inibição (%) de <i>Dunaliella tertiolecta</i> após 72 h de exposição ao cromato de potássio (mg/L), obtidas pela densidade celular	49
Tabela 21. Crescimento médio de <i>Dunaliella tertiolecta</i> após 48 h, 72 h e 96 h de exposição ao cromato de potássio (mg/L), obtido pela densidade celular (cél/mL) e após 96 h pelo conteúdo de clorofila-a (µg/L)	50
Tabela 22. Taxas médias de crescimento (duplicações/dia) e inibição (%) de <i>Dunaliella tertiolecta</i> após 48 h, 72 h e 96 h de exposição ao cromato de potássio (mg/L), obtidas pela densidade celular e após 96 h pelo conteúdo de clorofila-a.....	52
Tabela 23. Razão de clorofila-a por célula (Pg Cl-a/cél) para <i>Dunaliella tertiolecta</i> após 96 h de exposição ao cromato de potássio (mg/L).....	54
Tabela 24. Correlação de Pearson (r) entre as variáveis físicas e químicas, pH, taxa de crescimento e concentração de cromato de potássio (mg/L), para p<0,05	55
Tabela 25. Concentrações de inibição (CI ₅₀) de <i>Dunaliella tertiolecta</i> após 48 h, 72 h e 96 h de exposição ao cromato de potássio (mg/L), obtida pela densidade celular e após 96 h pelo conteúdo de clorofila-a	55

Tabela 26. Concentração de efeito não observado (CENO) e concentração de efeito observado (CEO) para *Dunaliella tertiolecta* após 48 h, 72 h e 96 h de exposição ao cromato de potássio (mg/L), obtidas pela densidade celular e após 96 h pelo conteúdo de clorofila-*a*..... 57

Tabela 27. Crescimento duplicações/dia) e inibição (%) de *Dunaliella tertiolecta* após 48 h, 72 h e 96 h de exposição ao sulfato de zinco (mg/L), obtidos pela densidade celular (cél/mL) 58

Tabela 28. Taxa de crescimento (duplicações/dia) e inibição (%) de *Dunaliella tertiolecta* após 48 h, 72 h e 96 h de exposição ao sulfato de cobre (mg/L), obtidas pela densidade celular 59

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1. Densidade celular (cél/mL) de *Dunaliella tertiolecta* após 24 h, 48 h e 72 h de exposição ao dicromato de potássio (mg/L) e conteúdo de clorofila-a (µg/L) após 72 h.

Anexo 2. Densidade celular (cél/mL) de *Dunaliella tertiolecta* após 48 h, 72 h e 96 h de exposição ao dicromato de potássio (mg/L), conteúdo de clorofila-a (µg/L) após 96 h e variáveis físico-químicas, pH e salinidade.

Anexo 3. Densidade celular (cél/mL) de *Dunaliella tertiolecta* após 48 h, 72 h e 96 h de exposição ao dodecil sulfato de sódio (mg/L), conteúdo de clorofila-a (µg/L) após 96 h e variáveis físico-químicas, pH e salinidade.

Anexo 4. Densidade celular (cél/mL) de *Dunaliella tertiolecta* após 48 h, 72 h e 96 h de exposição ao cromato de potássio (mg/L), conteúdo de clorofila-a (µg/L) após 96 h e variáveis físico-químicas, pH e salinidade.

LISTA DE ABREVIATURAS, FÓRMULAS QUÍMICAS E SÍMBOLOS

µg/L	Microgramas por litro
ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
ASTM	<i>American Society for testing and Materials</i>
C₁₂H₂₅SO₄Na	Dodecil Sulfato de Sódio
CE50	Concentração de efeito - concentração do agente tóxico que causa efeito a 50% dos organismos-teste, em relação ao controle, em determinado período de exposição, nas condições do ensaio
cél/mL	Células por mililitro
CENO	Concentração do efeito não observado - maior concentração do agente tóxico que não causa efeito significativo ao organismo-teste, em determinado período de exposição, nas condições do ensaio
CEO	Concentração do efeito observado - menor concentração do agente tóxico que causa efeito significativo ao organismo-teste, em determinado período de exposição, nas condições do ensaio
CI50	Concentração de Inibição - concentração do agente tóxico que causa inibição a 50% dos organismos-teste, em relação ao controle, em determinado período de exposição, nas condições do ensaio
CL50	Concentração letal - concentração letal a 50% dos organismos-teste em relação ao controle

Cl-a	Conteúdo de clorofila-a
CoCl₂.2H₂O	Cloreto de cobalto hexahidratado
CONAMA	Conselho Nacional do Meio Ambiente
Cr³⁺	Cromo Trivalente
Cr⁶⁺	Cromo Hexavalente
CuSO₄.5H₂O	Sulfato de cobre pentahidratado
CV	Coeficiente de variação
desv. pad.	Desvio padrão
DSS	Dodecil Sulfato de Sódio
FeCl₃.6H₂O	Cloreto férrico hexahidratado
HCl	Ácido clorídrico
HDR	<i>High Dynamic Range</i>
Hg	Mercúrio
HNO₃	Ácido nítrico
ISO	<i>International Standardization for Organization</i>
K₂Cr₂O₇	Dicromato de potássio
K₂CrO₄	Cromato de potássio
K	Coeficiente de correção
k	Taxa de crescimento
LAS	Alquilbenzeno sulfonato de sódio linear
mg/L	Miligramas por litro
MnCl₂.4H₂O	Cloreto de manganês tetra hidratado
Na₂EDTA	Ácido etilenodiaminotetraacético
NaCl	Cloreto de sódio
NaC₁₂H₂₅SO₄	Dodecil sulfato de sódio

$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	Fosfato de sódio hidratado
$\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	Molibdato de sódio dihidratado
NaNO_3	Nitrato de sódio
NaOH	Hidróxido de sódio
NBR	Norma Brasileira
OECD	<i>Organization for economic cooperation and development</i>
Pg/L	Picogramas por litro
pH	Potencial de hidrogênio
r	Correlação de Pearson
rpm	Rotação por minuto
USEPA	<i>United States Environmental Protection Agency</i>
v/v	Volume /volume
ZnSO_4	Sulfato de zinco
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	Sulfato de zinco heptahidratado

SUMÁRIO

RESUMO	i
ABSTRACT	ii
LISTA DE FIGURAS	iii
LISTA DE TABELAS	vi
LISTA DE ANEXOS	x
LISTA DE ABREVIATURAS, FÓRMULAS QUÍMICAS E SÍMBOLOS	xi
SUMÁRIO	xiv
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	5
2.1. Objetivo geral	5
2.2. Objetivos específicos	5
3. MATERIAL E MÉTODOS	6
3.1. Preparo da Vidraria	6
3.2. Meio de cultura	6
3.3. Organismo-teste	8
3.4. Desenho experimental	9
3.5. Preparo dos inóculos	11
3.6. Determinação da densidade celular	11
3.7. Determinação do conteúdo de clorofila-a (Cl-a)	12
3.8. Curva de crescimento	15
3.9. Curva de salinidade	15
3.10. Efeito algicida/algistático	15
3.11. Ensaio preliminares	16
3.12. Ensaio definitivos	17
3.13. Cálculos e análise estatística	18
4. RESULTADOS	20
4.1. Curva de crescimento	20
4.2. Curva de salinidade	22
4.3. Efeito algicida/algistático	25
4.4. Ensaio ecotoxicológicos	26
4.4.1. Dicromato de potássio ($K_2Cr_2O_7$)	26

4.4.1.1. Ensaio preliminar.....	26
4.4.1.2. Ensaios definitivos.....	28
4.4.2. Dodecil sulfato de sódio (DSS).....	38
4.4.2.1. Ensaio preliminar.....	38
4.4.2.2. Ensaios definitivos.....	39
4.4.3. Cromato de potássio	48
4.4.3.1. Ensaio preliminar.....	48
4.4.3.2. Ensaios definitivos.....	49
4.4.4. Sulfato de zinco	57
4.4.4.1. Ensaio preliminar.....	57
4.4.5. Sulfato de cobre	58
4.4.5.1. Ensaio preliminar.....	58
5. DISCUSSÃO	60
5.1. Curva de crescimento	61
5.2. Curva de salinidade.....	62
5.3. Efeito algicida/algistático	63
5.4. Ensaios ecotoxicológicos	64
5.4.1. Dicromato de potássio.....	64
5.4.2. Dodecil sulfato de sódio	66
5.4.3. Cromato de potássio	68
5.4.4. Sulfato de zinco	69
5.4.5. Sulfato de cobre	70
5.5. Comparação entre os períodos de exposição	71
5.6. Comparação entre os métodos	71
5.7. Comparação entre as substâncias de referência	72
5.8. Utilização de <i>Dunaliella tertiolecta</i> em ensaios ecotoxicológicos	74
5.9. Considerações finais	75
6. CONCLUSÃO	76
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	77
8. ANEXOS	

1. INTRODUÇÃO

O processo desordenado de industrialização e urbanização originou graves problemas de poluição para o meio aquático, principalmente ao ambiente costeiro, onde muitos centros urbanos estão localizados. Elevados níveis de poluentes e emissões de inúmeros resíduos, sem o devido tratamento, atingem direta ou indiretamente o ambiente marinho e podem ser acumulados e transferidos através da cadeia alimentar, trazendo riscos inclusive ao homem (Sousa, 2002).

Em resposta a esse processo, tornou-se necessário o desenvolvimento de técnicas, com bases científicas, voltadas para o controle de poluentes na água do mar e o estabelecimento de níveis aceitáveis para o descarte de compostos, individualmente ou em misturas complexas (Chapman & Long, 1983), não apenas pelas tradicionais análises físicas e químicas, mas também por sua integração com efeitos biológicos. Atualmente, os ensaios ecotoxicológicos fazem parte dos programas de monitoramento da qualidade de águas, efluentes, de procedimentos para classificação do nível de periculosidade e avaliação de risco dessas substâncias no ambiente (Zagatto, 2006).

Ensaio ecotoxicológicos consistem, basicamente, na exposição de organismos a diferentes tratamentos para se estimar qual concentração de substâncias biologicamente ativas podem causar efeitos agudos ou crônicos (Chapman & Long, 1983).

O efeito agudo avalia a letalidade ou a perda de mobilidade dos organismos e o efeito crônico avalia efeitos subletais como a inibição do crescimento, o decréscimo da taxa reprodutiva, alterações nas atividades locomotoras, respiratórias ou histopatológicas, entre outras (Rand & Petrocelli, 1985).

A legislação nacional estabelece o padrão de qualidade das águas brasileiras e regulamenta o lançamento de efluentes em corpos d'água para proteção das comunidades aquáticas (Bertoletti & Zagatto, 2006). A Resolução CONAMA 357/05 (Brasil, 2005), não permite a ocorrência de efeito crônico aos organismos em águas destinadas à recreação de contato primário, de proteção das comunidades aquáticas, aquicultura e pesca, nem efeito agudo aos

organismos em águas destinadas à pesca amadora e recreação de contato secundário.

A caracterização desses efeitos por meio de ensaios com organismos representativos do ambiente, em condições controladas, é importante para prever potenciais impactos imediatos aos ecossistemas ou em estudos de casos em que organismos são continuamente expostos a baixas concentrações de substâncias tóxicas (Romanelli, 2004; Aragão & Araújo, 2006).

Com essa preocupação, órgãos de proteção ambiental e agências reguladoras de diversos países, OECD (2001), ASTM (1992), ISO (1995), *Environment Canada* (1990), e inclusive do Brasil, ABNT (2005), têm publicado nas últimas décadas, protocolos experimentais para a quantificação do potencial tóxico de substâncias deletérias, principalmente ao fitoplâncton (Aidar *et al.*, 2002), que ocupa uma posição chave nos ecossistemas aquáticos, e são muito susceptíveis às mudanças ambientais (Levy *et al.*, 2007), respondendo rapidamente aos primeiros sinais de impactos ecológicos, permitindo assim, ações corretivas (Pavlic *et al.*, 2005).

O fitoplâncton é constituído por algas unicelulares de dimensões microscópicas (microalgas) que vivem em suspensão na coluna d'água. São organismos fotossintetizantes fundamentais para a estruturação de ambientes costeiros e oceânicos (Aidar *et al.*, 2002), contribuindo com 98% da produção primária nos ambientes oceânicos e com 50 % da fixação de carbono global (Field *et al.*, 1998).

Cerca de 70 mil compostos são lançados nos sistemas aquáticos e alcançam o meio marinho por meio de despejos domésticos e industriais (Braga, 2002). Esses efluentes podem conter concentrações variáveis de compostos nutricionais para o fitoplâncton, tais como, nitrogênio, fósforo, silício, e micronutrientes orgânicos e inorgânicos, mas também compostos indesejáveis que podem afetar o fitoplâncton, como detergentes, pesticidas, metais pesados, hidrocarbonetos de petróleo, entre outras substâncias, resultando em alterações qualitativas e quantitativas nas populações naturais, modificando toda a cadeia trófica local (Aidar *et al.*, *op. cit.*).

Assim, os ensaios ecotoxicológicos com determinadas espécies do fitoplâncton marinho representam uma ferramenta essencial para avaliação do

potencial tóxico de muitos compostos (Rodrigues & Rodrigues, 2006), principalmente de herbicidas e outras substâncias fitotóxicas (Parrish, 1985). Além disso, as altas taxas de crescimento e o baixo nível de diferenciação celular de microalgas constituem características muito adequadas para seu uso em ensaios ecotoxicológicos (Lourenço, 2006).

Os primeiros ensaios utilizando microalgas foram realizados no final da década de 20, avaliando a disponibilidade de nutrientes na água do mar, impulsionando o desenvolvimento de várias técnicas para se estimar o crescimento potencial do fitoplâncton (Lima, 1998). Entretanto, somente na década de 1970, foram utilizadas microalgas em ensaios ecotoxicológicos. No Brasil, a partir de 1975, foram desenvolvidos e adaptados diversos métodos ecotoxicológicos, para outros organismos, inclusive algas marinhas, para avaliação da poluição hídrica (Zagatto, 2006).

Dentre as microalgas marinhas comumente utilizadas em ensaios ecotoxicológicos, encontra-se *Dunaliella tertiolecta* (Parrish, 1985; ASTM 1992; Aidar *et al.*, 2002), uma espécie amplamente estudada quanto às necessidades ambientais e nutricionais, utilizada neste estudo.

O principal efeito observado em microalgas, causado por substâncias tóxicas é a inibição do seu crescimento, calculado a partir da taxa de crescimento ou da biomassa final (Nyholm, 1985; Eberius *et al.*, 2002).

O crescimento de microalgas pode ser avaliado por diversos métodos: determinação da densidade celular por microscopia ou aparelhos automáticos, medida de clorofila por espectrofotometria ou fluorimetria, densidade óptica etc. As técnicas mais utilizadas para estimar a biomassa algácea são a contagem celular e a determinação do conteúdo de clorofila-a (ASTM E1218, 1992), utilizadas no presente estudo.

A contagem direta por microscopia é uma técnica simples e tradicional de se monitorar o crescimento de microalgas de um cultivo, quantificando o número de células presentes em determinada unidade de volume (Lourenço, 2006).

Uma vez que todas as espécies fotossintetizantes são dotadas de clorofila-a, a análise do conteúdo deste pigmento, além de constituir um bom indicador de biomassa, pode indicar as taxas de crescimento e de produção primária, quando avaliados em função do tempo de cultivo (Parrish, 1985;

ASTM D3731-87, 1992; Braga, 2002).

Independentemente do método escolhido, a qualidade dos resultados dos ensaios ecotoxicológicos deve ser garantida empregando-se métodos padronizados para cada espécie. Os organismos utilizados devem ser reconhecidamente sensíveis a diversas substâncias, ter fácil manutenção e manuseio em laboratório, ser mantidos em condições físico-químicas controladas e estar disponível durante o ano todo em abundância (Rand & Petrocelli, 1985). A “saúde” do lote desses organismos deve ser avaliada por um ensaio com uma substância de referência, nas mesmas condições dos ensaios ecotoxicológicos (Zagatto, 2006).

As substâncias de referência são compostos químicos tóxicos, com informações conhecidas de estabilidade, solubilidade e toxicidade. Dentre elas podem ser citados o dicromato de potássio, o dodecil sulfato de sódio (DSS), o cromato de potássio, o sulfato de zinco e o sulfato de cobre, entre outros (*Environment Canada*, 1990; Badaró-Pedroso *et al.*, 2002; Zagatto, 2006).

Em vista do exposto, o presente trabalho teve como objetivo principal contribuir com informações sobre a sensibilidade da microalga *Dunaliella tertiolecta* frente às mais consagradas substâncias de referências, a saber: dicromato de potássio, DSS, cromato de potássio, sulfato de zinco e sulfato de cobre, em diferentes períodos de exposição, 48 h, 72 h e 96 h, comparando dois métodos para quantificação da biomassa fitoplanctônica, densidade celular e conteúdo de clorofila-*a*.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Avaliar a sensibilidade da microalga marinha *D. tertiolecta* por meio de ensaios ecotoxicológicos com diferentes substâncias de referência.

2.2. Objetivos específicos

- Avaliar a sensibilidade de *D. tertiolecta* frente às seguintes substâncias de referência: dicromato de potássio, dodecil sulfato de sódio, cromato de potássio, sulfato de zinco e sulfato de cobre.
- Verificar a variabilidade entre os resultados dos ensaios ecotoxicológicos com *D. tertiolecta* após 48 h, 72 h e 96 h de exposição às diferentes substâncias de referência.
- Comparar os resultados dos ensaios ecotoxicológicos obtidos pelos métodos de determinação da densidade celular e do conteúdo de clorofila-*a* para cada substância de referência.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Preparo da Vidraria

Toda a vidraria utilizada no cultivo, na manutenção dos organismos e nos ensaios ecotoxicológicos foi lavada de acordo com o procedimento descrito na ABNT NBR 12648 (2005).

A vidraria foi esfregada com auxílio de uma escova ou esponja e detergente neutro não fosfatado EXTRAN[®] a 2 % (v/v) para remoção de compostos orgânicos aderidos. Em seguida, foi enxaguada com água de torneira, acetona pura para retirada de resíduos orgânicos e novamente com água de torneira. Posteriormente a vidraria foi mantida durante 12 h em uma solução de ácido nítrico (HNO₃) a 5 % (v/v) para a remoção de crostas, metais e bases e foi enxaguada com água deionizada (deionizador QUIMIS[®] Q380M).

Ao final da lavagem, a vidraria foi seca em local adequado, esterilizada em autoclave ELETROLAB[®] a 121 °C durante 40 minutos e mantida em estufa FANEM[®] a 60 °C durante dois dias antes do uso.

O material não autoclavável foi esterilizado por exposição à luz ultravioleta germicida LIGHT EXPRESS[®] LE, de 30 W de potência, durante 6 h.

3.2. Meio de cultura

O meio de cultura utilizado para o cultivo das microalgas e para água de diluição utilizada nos ensaios foi o meio semidefinido *Guillard "f/2"* (Guillard, 1975) modificado, sem adição de sílica, preparado com água do mar natural enriquecida com nutrientes.

A água do mar foi coletada em mar aberto na região de Ubatuba/SP, em local afastado da costa, com menor presença de sedimentos finos e isento de fontes diretas de poluição. Para a retirada de material em suspensão a água foi filtrada em papel filtro com porosidade de 5 µm e posteriormente, com o auxílio de uma bomba de vácuo QUIMIS[®] Q-355B2, em membrana com porosidade de 0,45 µm para retirada de partículas menores, inclusive microrganismos. Em seguida a água foi autoclavada a 121 °C, durante 35 minutos, pelo menos um dia antes da sua utilização. Esse procedimento permite a estabilização dos sais dissolvidos e do pH e o reestabelecimento do equilíbrio natural dos gases no líquido, por simples difusão do ar atmosférico, eliminados durante o processo de esterilização (ASTM E1218, 1992;

Lourenço, 2006).

Pouco antes da utilização do meio de cultura, nutrientes orgânicos e inorgânicos necessários ao desenvolvimento de *D. tertiolecta*, durante o período do ensaio, foram adicionados à água do mar, em condições assépticas. Para cada 1000 mL de água do mar foi adicionado 1,0 mL de cada solução-estoque de nitrato, fosfato, metais-traço e vitaminas.

As soluções-estoque nutrientes foram preparadas separadamente, pesando os compostos em balança analítica SARTORIUS® e dissolvendo-os em água destilada (destilador FABRE®), conforme descrito na Tabela 1.

Tabela 1. Soluções nutrientes para enriquecimento do meio de cultura.

Solução	Reagente	Quantidade	Preparo
Nitrato	Nitrato de sódio (NaNO ₃)	7,50 g	Dissolver e completar para 100 mL com água destilada
Fosfato	Fosfato de sódio dihidratado (NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O)	0,50 g	Dissolver e completar para 100 mL com água destilada
Metais-traço	Sulfato de cobre pentahidratado (CuSO ₄ ·5H ₂ O)	0,98 g	Dissolver e completar para 100 mL com água destilada
	Sulfato de zinco heptahidratado (ZnSO ₄ ·7H ₂ O)	2,20 g	Dissolver e completar para 100 mL com água destilada
	Cloreto de cobalto hexahidratado (CoCl ₂ ·6H ₂ O)	1,00 g	Dissolver e completar para 100 mL com água destilada
	Cloreto de manganês tetra hidratado (MnCl ₂ ·4H ₂ O)	18,00 g	Dissolver e completar para 100 mL com água destilada
	Molibdato de sódio dihidratado (NaMoO ₄ ·2H ₂ O)	0,63 g	Dissolver e completar para 100 mL com água destilada
Vitaminas	Tiamina	0,10 g	Dissolver e completar para 1000 mL com água destilada
	Cianocobalamina	0,50 mg	
	Biotina	0,50 mg	

As soluções de nitrato, fosfato, metais-traço foram previamente esterilizadas em autoclave e a solução de vitaminas por filtro de porosidade de 0,22 µm esterilizado.

A salinidade do meio de cultura foi medida com auxílio de um refratômetro manual ATAGO® S/Mill-E e ajustada para 36 ± 1 com a adição de água destilada ou cloreto de sódio (NaCl). O pH foi medido com auxílio de membrana digital METTLER TOLEDO® SG2, previamente calibrado, e seus valores iniciais ajustados entre 7,5 e 8,5 pela a adição de soluções esterilizadas de HCl 1N ou NaOH 1N, quando necessário.

3.3. Organismo-teste

A linhagem CF1 de *D. tertiolecta*, fornecida para realização dos ensaios, foi encontrada e isolada em amostras de Cabo Frio, Rio de Janeiro e é mantida em cultivo clonal, pelo Laboratório de Microrganismos Marinhos do Instituto Oceanográfico da USP.

A microalga *Dunaliella tertiolecta* Butcher 1959 (Figura 1) é uma espécie marinha, pertencente à família Dunaliellaceae, ordem Dunaliellales (Volvocales), classe Chlorophyceae, filo Chlorophyta. Encontra-se distribuída mundialmente em diversos habitats, geralmente em minoria na composição do fitoplâncton marinho, com exceção de águas hipersalinas, em que podem formar florações (Borowitzka & Borowitzka, 1988). São células isoladas de formato elipsoidal de 5 µm a 18 µm de comprimento e 4,5 µm a 14 µm de largura, com dois flagelos de 2 vezes a 2,5 vezes seu comprimento, não possuem parede celular e apresentam apenas um cloroplasto com um pirenoide basal (Borowitzka & Siva, 2007).

Figura 1. Microalga *Dunaliella tertiolecta* em microscopia de contraste de fase. Fotografias em HDR de E. Masami.

3.4. Desenho experimental

Os ensaios foram realizados com *D. tertiolecta* de acordo com os procedimentos descritos por ASTM 1218 (1992), ISO 10253 (1995) e Aidar *et al.* (2002), com modificações (Tabela 2).

Como frascos-teste foram utilizados erlenmeyers de borossilicato com capacidade para 300 mL, com 150 mL de solução-teste, cobertos com um tampão de algodão envolto por gaze para permitir trocas gasosas. Para cada substância foram realizados cinco ensaios estáticos com três réplicas para cada concentração-teste e três réplicas controle, contendo apenas meio de cultura e inóculo.

Todos os ensaios foram mantidos em pH entre 7, 5 e 8,5, salinidade 36 ± 1 em uma sala climatizada com temperatura de 20 ± 1 °C, regulada por um climatizador EASY WARE®, com fotoperíodo de 12 h de fase clara e 12 h de fase escura, reguladas por um temporizador automático MINIPA®. A fase clara foi proveniente de lâmpadas frias GE® de 40 W de potência, localizadas na parte inferior das prateleiras. A radiação luminosa foi monitorada com auxílio de um luxímetro digital MINIPA® MLM 1010.

O período total de duração dos ensaios foi de 96 h e o monitoramento do crescimento celular ocorreu em 48 h, 72 h e 96 h, com a retirada de uma alíquota de 1,0 mL de cada tratamento para contagem do número de células e ao final de 96 h também para determinação do conteúdo de clorofila-a.

As variáveis físicas e químicas como pH, salinidade, temperatura e irradiação luminosa foram medidas no início e no final de cada ensaio.

Os frascos foram dispostos aleatoriamente nas prateleiras para que recebessem condições de iluminação e temperatura semelhantes e foram diariamente redistribuídos nas prateleiras.

Duas vezes ao dia todos os frascos-teste foram agitados manualmente, para que não houvesse acúmulo de gases que pudessem alterar o pH das amostras e para que as células não permanecessem estacionadas em determinadas posições ou decantadas no fundo do frasco, importante para a exposição homogênea de radiação luminosa, principalmente em cultivos mais densos, nos quais pode ocorrer o auto sombreamento.

Tabela 2. Desenho experimental.

Condições do ensaio	Presente estudo	Aidar <i>et al.</i> , 2002	ASTM 1218, 1992	ISO 10253, 1995
Organismo-teste	<i>Dunaliella tertiolecta</i>	<i>Dunaliella tertiolecta</i> <i>Skeletonema costatum</i>	<i>Dunaliella tertiolecta</i> <i>Thalassiosira pseudonana</i> <i>Skeletonema costatum</i>	<i>Phaeodactylum tricornutum</i> <i>Skeletonema costatum</i>
Meio de cultura	Guillard "f/2"	Guillard "f/2"	Provasoli's ASP ₁₂ *	Água do mar ou sintética enriquecida com nutrientes*
Duração	96 h	96 h	96 h	72 h*
Inóculo	3 000 cél/mL	3 000 cél/mL	20 000 cél/mL*	2 000 cél/mL a 10 000 cél/mL*
Réplicas	3	3	3	3
pH	8 ± 0,5	8 ± 0,5	-	8 ± 0,2
Salinidade	35 - 37	25-30*	24-35*	25-35*
Temperatura	20 °C ± 1 °C	20 °C ± 1 °C	20°C ± 2	20°C ± 2
Iluminação	> 6 000 lux	7 100 lux - 14 300 lux	4 300 lux - 6 500 lux	6 000 lux - 10 000 lux
Fotoperíodo	12 h claro/12 h escuro	12 h claro/12 h escuro	luz contínua*	luz contínua*
Agitação	manual 2 vezes ao dia	manual 2 vezes ao dia	Agitação contínua manual	Agitação contínua ou manual
Métodos	contagem celular conteúdo de clorofila-a	contagem celular conteúdo de clorofila-a	contagem celular conteúdo de clorofila-a	contagem celular
Efeito observado	inibição do crescimento	% de sobrevivência*	inibição do crescimento	inibição do crescimento
Expressão dos resultados	CI ₅₀ CENO/CEO	CI ₅₀	CI ₅₀	CE ₅₀ CENO/CEO

* Condição diferente do presente estudo

Como grupo controle, *D. tertiolecta* foi exposta apenas ao meio de cultura e submetida às mesmas condições de realização dos ensaios ecotoxicológicos com as substâncias de referência.

3.5. Preparo dos inóculos

Três dias antes do início do ensaio, foi iniciada uma cultura-mãe em 50 mL de meio de cultura (*Guillard f/2*, modificado) e incubada nas mesmas condições de realização dos ensaios ecotoxicológicos, temperatura de 20 ± 1 °C, pH entre 7,5 e 8,5, salinidade 36 ± 1 e fotoperíodo de 12 h de claro e 12 h de escuro.

No dia do início dos ensaios, uma alíquota de 1 mL foi retirada da cultura-mãe e fixada com solução de Lugol para a determinação da densidade celular, conforme descrito no item 3.6 e cálculo da densidade celular. O volume do inóculo da cultura-mãe a ser adicionado a cada frasco-teste, para que o ensaio apresentasse uma densidade inicial de aproximadamente 3 000 células, foi calculado pela seguinte fórmula (Aidar *et al.*, 2002):

$$v_1 = (d_2 v_2) / d_1$$

sendo

v₁ o volume cultura-mãe a ser utilizado como inóculo (mL);

v₂ o volume de solução-teste em cada frasco-teste (mL) = 150 mL;

d₁ a densidade celular na cultura-mãe (cél/mL);

d₂ a densidade celular desejada para o inóculo (cél/mL) = 10^3 células/mL.

3.6. Determinação da densidade celular

Para a determinação da densidade celular, cada cultura foi homogeneizada por agitação e uma alíquota de 1 mL foi retirada com o conteúdo do frasco ainda em movimento. A essa alíquota foi adicionada uma gota de Lugol acético, que fixou e corou as células, aumentando o contraste com a superfície da lâmina, facilitando a contagem.

A alíquota fixada para contagem foi homogeneizada, injetada no vão entre a câmara de contagem de Fuchs-Rosenthal e a lamínula, fixa por uma pequena gota de álcool nas bordas de apoio lateral, mais altas que a porção

central do hemocítômetro e espalhada pela superfície da lâmina por capilaridade. Com a distribuição homogênea da amostra na lâmina, sem aglomerações de células decantadas ou formação de bolhas, as células foram contadas em um microscópio óptico Leica® DMLS em aumento de 100 vezes.

Em cultivos com densidade celular muito alta, foram consideradas apenas frações da área da câmara de contagem, localizadas nos vértices do campo de contagem, que representam uma contagem aleatória das células. Para evitar a repetição da contagem de uma mesma célula posicionada entre as linhas da área de contagem, foram consideradas apenas as células que tocavam as laterais esquerda e superior das linhas internas (Lourenço, 2006).

A densidade celular (cél/mL) foi calculada pela seguinte fórmula (ASTM 1218, 1992):

$$d = x / V$$

sendo

d a densidade celular (cél/mL);

x o número de células contadas (cél);

V o volume de da área contada (mL).

3.7. Determinação do conteúdo de clorofila-a (Cl-a)

A quantificação do conteúdo de clorofila-a seguiu a metodologia descrita por Lorenzen (1967).

De acordo com esse autor, a clorofila-a apresenta dois picos de absorção de luz, em 664 nm e 430 nm (Figura 2), e tem um alto coeficiente de absorção, o que possibilita o uso de espectrofotometria para quantificação e identificação desse pigmento. Feopigmentos também absorvem luz e interferem na análise, indicando concentrações de clorofila maiores que as reais.

Figura 2. Espectro de absorção de luz da clorofila-a. Adaptado de *Chemical of the week - Chlorophyll*.

Para diferenciar a clorofila-a ($C_{55}H_{72}O_5N_4Mg$) dos demais pigmentos, Lorenzen (1967) propôs a adição de pequenos volumes de ácido clorídrico (HCl) diluído em uma amostra contendo clorofila-a, que então perde seu átomo de magnésio e é convertida em feofitina-a (Figura 3). A amostra sofre redução na absorbância, que é proporcional à relação clorofila-a/feofitina-a preexistente na amostra. Assim, pode-se estimar a quantidade de clorofila ativa e a quantidade de pigmentos inativos de uma amostra natural.

Figura 3. Estrutura química da clorofila-a e da feofitina-a. Adaptado de *Chemical of the week - Chlorophyll*.

Ao final de 96 h de exposição do experimento, o volume restante de cada amostra (cerca de 140 mL) foi filtrado em filtros de fibra de vidro AP-40 MILLIPORETM (porosidade não informada pelo fabricante), próprio para determinação do séston, capaz de reter partículas maiores que 0,45 μm (Saldanha-Corrêa *et al.*, 2004), utilizando uma bomba de vácuo, em pressão menor que 20 cm Hg. Para que os pigmentos não fossem degradados, a clorofila foi extraída ao abrigo da luz.

Os filtros contendo as células foram colocados em tubos de centrífuga, preenchidos com 10 mL de acetona (CH_3COH_3) a 90 % (v/v) e macerados com o auxílio de um bastão de vidro, durante 1 minuto.

Os tubos foram tampados e mantidos 24 h no escuro sob refrigeração (4 °C). Após esse período as amostras foram homogeneizadas por inversão do tubo e para a separação de resíduos de filtro e materiais em suspensão foram centrifugadas a 2000 rpm (centrífuga CELM[®] LS-3), durante 15 minutos.

O sobrenadante foi transferido para cubetas de vidro de 1 cm de caminho óptico para leitura da absorbância em espectrofotômetro HELIOS EPSILON[®] nos comprimentos de onda de 665 nm, para a clorofila-a, e de 750 nm, para avaliar a presença de interferentes, antes e após acidificação com 2 gotas de HCl 1N.

Os valores do conteúdo de clorofila-a foram calculados pela seguinte equação, descrita por Lorenzen (1967):

$$\text{Cl-a} = [\text{A K (665}_0\text{-665}_a) \text{ v}] / \text{V L}$$

sendo

Cl-a o conteúdo de clorofila-a ($\mu\text{g/L}$)

A o coeficiente de absorção da clorofila-a = 11,0;

K o fator de correção para redução da absorbância após acidificação = 2,43;

665₀ a leitura antes da acidificação, corrigida pela leitura de 750 nm;

665_a a leitura após a acidificação, corrigida pela leitura de 750 nm após acidificação;

v o volume de acetona utilizado no extrato (mL) = 10;

V o volume de amostra filtrada (L);

L o caminho óptico da cubeta (cm) = 1.

Segundo o autor, apesar da clorofila-a apresentar um pico de absorção em 664 nm, a leitura é feita em 665 nm e corrigida por um coeficiente de correção (K) para o processo de acidificação da amostra.

3.8. Curva de crescimento

Para o estabelecimento da curva de crescimento de *D. tertiolecta* foram realizados três ensaios com três réplicas cada, em erlenmeyers contendo 150 mL de meio de cultura, com inóculo de aproximadamente 3 000 cél/mL, nas mesmas condições de realização dos ensaios ecotoxicológicos, temperatura de 20 ± 1 °C, pH entre 7, 5 e 8,5, salinidade 36 ± 1 e fotoperíodo de 12 h de claro e 12 h de escuro e agitação manual 2 vezes ao dia.

A densidade celular foi obtida pelo método de determinação da densidade celular a cada 24 h, durante 10 dias de cultivo em meio de cultura. Com esses resultados foram calculadas as taxas de crescimento diário.

3.9. Curva de salinidade

A linhagem de *D. tertiolecta* utilizada neste estudo é cultivada em salinidade 36 ± 1 e antes de adaptar a microalga para a salinidade sugerida na literatura, 24 a 35, foi realizado um ensaio para verificar o crescimento desta microalga em diferentes salinidades.

Uma solução-estoque foi preparada com salinidade 45, adicionando-se cloreto de sódio à água do mar. Após esterilização, a solução-estoque foi diluída com água destilada, previamente esterilizada, para obtenção das soluções-teste de salinidades 0; 5; 10; 15; 20; 25; 30; 35; 40 e 45, posteriormente enriquecidas com as soluções nutrientes do meio de cultura.

O crescimento de *D. tertiolecta* nas diversas salinidades foi obtido pelo método de determinação da densidade celular e analisadas em 48 h, 72 h e 96 h de exposição, em temperatura de 20 ± 1 °C, pH entre 7, 5 e 8,5, fotoperíodo de 12 h/12 h e agitação manual 2 vezes ao dia, nas mesmas condições de realização dos ensaios ecotoxicológicos. Os resultados da densidade celular foram utilizados para o cálculo da taxa de crescimento.

3.10. Efeito algicida/algistático

Para verificar se o efeito da substância para *D. tertiolecta* foi algistático ou algicida, ao final do período de 96 h dos ensaios ecotoxicológicos, uma alíquota de 0,5 mL de cada réplica das culturas, cuja concentração-teste causou 100 % de inibição de seu crescimento (CI_{100-96h}), foi transferida para um meio de cultura fresco e submetida às mesmas condições ambientais dos

ensaios ecotoxicológicos para observação de crescimento, ou não, da microalga, durante seis dias.

O efeito foi classificado como algistático, quando houve crescimento, e quando não houve crescimento, foi considerado algicida, conforme descrito na Norma ABNT NBR 12648 (2005).

3.11. Ensaios preliminares

Com o objetivo de se estabelecer o intervalo de concentrações das substâncias de referência que seriam utilizadas nos ensaios definitivos, foram realizados ensaios ecotoxicológicos preliminares, nas seguintes concentrações nominais:

- dicromato de potássio - $K_2Cr_2O_7$ - (SYNTH[®] p.a.): 0,5; 1,0; 10,0; 100,0 e 500,0, em mg/L.
- dodecil sulfato de sódio - $NaC_{12}H_{25}SO_4$ - (J. BACKER[®] p.a.): 1,6; 3,1; 6,2; 12,5; 25,0; 50,0 e 100,0, em mg/L.
- cromato de potássio - K_2CrO_4 - (SYNTH[®] p.a.): 25,0; 50,0; 100,0; 200,0 e 400,0, em mg/L.
- sulfato de zinco - $ZnSO_4$ - (J. BACKER[®] p.a.): 0,4; 0,8; 1,6; 3,1; 6,2; 12,5; 25,0; 50,0; 100,0 e 200,0, em mg/L.
- sulfato de cobre - $CuSO_4$ - (MERCK[®] p.a.): 0,4; 0,8; 1,6; 3,1; 6,2; 12,5; 25,0; 50,0 e 100,0, em mg/L.

As culturas com dicromato de potássio foram analisadas em 72 h de exposição, e monitoradas a cada 24 h, entretanto no período de 24 h a Cl_{50} não foi obtida assim, para as culturas expostas ao dodecil sulfato de sódio, apenas os períodos de 48 h e 72 h foram analisadas. As culturas expostas ao cromato de potássio foram analisadas apenas em 72 h, devido ao cromo ter sido testado anteriormente. As culturas expostas ao sulfato de zinco e ao sulfato de cobre foram analisadas em 48 h, 72 h e 96 h, períodos estabelecidos para os ensaios definitivos.

Os ensaios preliminares foram realizados em temperatura de 20 ± 1 °C, pH entre 7, 5 e 8,5, salinidade 36 ± 1 e fotoperíodo de 12 h de claro e 12 h de

escuro e agitação manual 2 vezes ao dia, nas mesmas condições de realização dos ensaios ecotoxicológicos.

3.12. Ensaios definitivos

A partir dos resultados dos ensaios preliminares realizados com *D. tertiolecta*, foram estabelecidas as concentrações-teste de dicromato de potássio, dodecil sulfato de sódio e cromato de potássio para os ensaios definitivos, com base nas concentrações que causaram entre 10 % e 90 % de inibição da microalga em relação ao grupo controle (ISO, 1995).

As substâncias sulfato de zinco e sulfato de cobre não foram utilizadas nos ensaios definitivos. Estas substâncias precipitaram no fundo do frasco-teste e apresentaram interferentes, dificultando a contagem celular.

Desse modo, para os ensaios definitivos, as concentrações nominais das substâncias de referência dicromato de potássio, dodecil sulfato de sódio e cromato de potássio foram as seguintes:

- dicromato de potássio: 50; 100; 200; 300; 400 e 600, em mg/L.
- dodecil sulfato de sódio: 0,3; 0,6; 1,2; 2,5 e 5,0, em mg/L.
- cromato de potássio: 25; 50; 100; 200 e 400, em mg/L.

As soluções-estoque e as soluções-teste foram preparadas no dia do ensaio, com o próprio meio de cultura esterilizado, em condições assépticas, mantidas em agitação constante durante 1 h.

A solução-estoque de dicromato de potássio foi preparada dissolvendo 900 mg do sal e completando para 1000 mL com meio de cultura. A solução-estoque de DSS foi preparada dissolvendo 500 mg do surfactante e completando para 500 mL com meio de cultura e diluindo 100 vezes essa solução, obtendo uma solução-estoque com concentração final de 10 mg/L. A solução-estoque de cromato de potássio foi preparada dissolvendo 400 mg do sal e completando para 1000 mL com meio de cultura.

As soluções-teste foram preparadas a partir da diluição de cada solução-estoque com o meio de cultura e distribuídos nos frascos-teste.

Quando necessário, o pH e a salinidade foram ajustados nas soluções-estoque, e foi suficiente para consequente ajuste nas soluções-teste.

3.13. Cálculos e análise estatística

Com a densidade celular e o conteúdo de clorofila-a obtidos em cada réplica, foram calculadas as médias e desvios-padrão por concentração de cada substância testada, nos diferentes períodos de exposição. A partir desses resultados foram calculadas as taxas de crescimento diário pelo programa BANAL[®], utilizadas nas análises estatísticas.

A porcentagem de inibição do crescimento de *D. tertiolecta* foi calculada a partir da taxa de crescimento celular e de incremento de clorofila-a, pela seguinte fórmula (ASTM 1218, 1992):

$$I = (k_1 - k_2) 100 / k_1$$

sendo

I a porcentagem de inibição (%);

k₁ a taxa de crescimento (duplicação/dia) do controle;

k₂ a taxa de crescimento (duplicação/dia) da amostra.

A concentração que causou inibição a 50 % dos organismos após os períodos de exposição, CI₅₀, foi calculada pelo método Trimmed Spearman-Kärber (Hamilton *et al.*, 1977) no programa BANAL[®].

A correlação das variáveis físicas e químicas, pH e salinidade, com a taxa de crescimento foi analisada pela correlação de Pearson.

Os resultados obtidos pelo método de determinação da densidade celular e do conteúdo de clorofila-a foram comparados pelo Teste-t, utilizando o pacote estatístico BioEstat[®] 5.0, para $p < 0,05$.

As cartas-controle foram elaboradas conforme descrito na norma ABNT NBR 12648 (2005) com os valores das CI₅₀, com a média e os limites (± 2 o desvio-padrão) superior e inferior obtidos nos cinco ensaios com cada substância de referência testada, em cada período de exposição. O coeficiente de variação entre os ensaios foi calculado a partir da equação (Nipper, 2002):

$$CV = (\delta / \bar{x}) 100$$

sendo

- CV** o coeficiente de variação (%);
 δ o desvio padrão da média dos ensaios;
 $\bar{x}$ a média das CI50 entre os ensaios.

A maior concentração do agente tóxico que não causou efeito significativo ao organismo-teste, CENO, e a menor concentração do agente tóxico que causou efeito significativo ao organismo-teste, CEO, foram estabelecidas comparando a taxa de crescimento de *D. tertiolecta* obtida nas amostras-teste com o controle pela análise de variância (ANOVA). Para resultados paramétricos, que passaram nos testes de normalidade e de homocedasticidade, Shapiro-Wilk (Shapiro & Wilk, 1965) e Bartlett (Bartlett, 1937), respectivamente, foi aplicado o teste Dunnett (Dunnett, 1964) e para resultados não paramétricos o teste Kruskal-Wallis (Kruskal & Wallis, 1952) pelo programa ToxStat[®] 3.4, para $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1. Curva de crescimento

Durante 10 dias de cultivo, foram determinadas a densidade celular e a taxa de crescimento diário de *D. tertiolecta* e os resultados estão apresentadas na Tabela 3, com as médias e desvios-padrão de três ensaios.

Entre as fases de crescimento, a densidade celular aumentou, entretanto a taxa de crescimento diminuiu. Na fase exponencial, a taxa média de crescimento foi de 2,0 duplicações/dia e ao final desta fase a densidade celular foi de $2,5 \times 10^5$ cél/mL. Na fase estacionária, a taxa de crescimento foi, em média, de 1,5 duplicações/dia, com uma média de densidade celular de $2,7 \times 10^6$ cél/mL.

Nos períodos de interesse para este estudo, 48 h, 72 h e 96 h (2 dias, 3 dias e 4 dias, respectivamente), a taxa de crescimento e a densidade celular aumentaram. Em 48 h de crescimento houve 1,70 duplicações/dia, totalizando uma densidade de aproximadamente $1,0 \times 10^4$ cél/mL; em 72 h de crescimento houve 1,80 duplicações/dia, totalizando aproximadamente $5,3 \times 10^4$ cél/mL; e em 96 h de crescimento houve uma média 1,96 duplicações/dia totalizando aproximadamente $2,3 \times 10^5$ cél/mL.

Tabela 3. Crescimento celular de *Dunaliella tertiolecta* obtido por (A) densidade celular (cél/mL) e (B) taxa de crescimento (duplicações/dia).

A) Densidade celular										
Ensaio	Réplica	Início	Tempo (Dias)							
			1	2	3	4	5	6	7	Fase estacionária
1	R1	625	3750	18750	66250	160781	1776875	2844375	3299375	3086875
	R2	938	4687	8437	60937	462187	1889062	3074062	2874062	2586562
	R3	625	2500	10938	208125	588125	1666875	2769375	3784375	2864375
2	R1	1250	4375	13125	37813	272813	1326250	3106250	3588750	4008750
	R2	938	3438	15000	31563	192500	1584063	3739063	3069063	4239063
	R3	1250	4063	10000	25000	256250	1326250	3233750	4598750	3468750
3	R1	313	2031	625	3594	88594	304063	1164688	2219688	2087188
	R2	469	6094	2969	8906	34688	246406	1177031	2149531	1919531
	R3	469	5000	7969	33594	21875	652031	1517031	1622031	1009531
Média			764	3993	9757	52865	230868	1196875	2513958	3022847
Desvio padrão			345	1250	5652	61784	191160	634150	965640	1036807
B) Taxa de crescimento										
Ensaio	Réplica	Início	1	2	3	4	5	6	7	Fase estacionária
			Tempo (Dias)							
1	R1	-	2,52	2,33	2,15	2,43	2,24	1,98	1,73	1,50
	R2	-	2,88	1,81	2,11	2,31	2,26	2,00	1,70	1,47
	R3	-	2,03	1,96	2,70	2,40	2,22	1,97	1,75	1,48
2	R1	-	2,88	2,12	1,89	2,12	2,16	2,00	1,74	1,54
	R2	-	2,52	2,19	1,80	2,00	2,20	2,04	1,71	1,55
	R3	-	2,80	1,94	1,70	2,10	2,15	2,01	1,79	1,52
3	R1	-	1,62	0,15	0,78	1,72	1,73	1,76	1,64	1,43
	R2	-	3,10	1,08	1,21	1,38	1,67	1,77	1,64	1,41
	R3	-	2,84	1,73	1,83	1,22	1,95	1,83	1,58	1,30
Média			2,58	1,70	1,80	1,96	2,06	1,93	1,70	1,47
Desvio padrão			0,47	0,68	0,55	0,44	0,23	0,11	0,07	0,08

A partir desses resultados foi construída uma curva de crescimento na

qual podem ser observadas as fases de crescimento exponencial e estacionária (Figura 4).

Figura 4. Curva de crescimento de *Dunaliella tertiolecta* obtida durante 10 dias de cultivo, determinada pela densidade celular (cél/mL) e pela taxa de crescimento (duplicações/dia).

Do início ao 5º dia do ensaio, a densidade de *D. tertiolecta* aumentou, caracterizando a fase exponencial de crescimento. A partir do 6º dia ocorreu uma redução da taxa de crescimento, embora a densidade celular tenha aumentado, indicando o início da fase estacionária, que se estabeleceu em seguida.

4.2. Curva de salinidade

A linhagem CF1 de *Dunaliella tertiolecta*, utilizada neste estudo foi submetida a diversas salinidades para verificação do crescimento da microalga em salinidades diferentes daquela em que é cultivada, 36 ± 1 , e os resultados estão apresentados na Tabela 4 e representada na Figura 5.

Tabela 4. Taxa de crescimento (duplicações/dia) de *Dunaliella tertiolecta* após 24 h, 48 h, 72 h e 96 h de exposição a diferentes salinidades obtida pela densidade celular (cél/mL).

Salinidade	24 h		48 h		72 h		96 h	
	Dens. celular	Taxa de cresc.	Dens. celular	Taxa de cresc.	Dens. celular	Taxa de cresc.	Dens. celular	Taxa de cresc.
	(cél/mL)	(dupl./dia)	(cél/mL)	(dupl./dia)	(cél/mL)	(dupl./dia)	(cél/mL)	(dupl./dia)
Início	2292	-	2292	-	2292	-	2292	-
0	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
5	0	0,00	156	0,48	0	0,00	16094	0,75
10	0	0,00	3021	0,61	0	0,00	62083	1,20
15	885	0,47	341	0,10	0	0,00	1302	0,16
20	208	0,13	0	0,00	0	0,00	208	0,03
25	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
30	521	0,30	0	0,00	521	0,10	2240	0,25
35	52	0,03	42	0,01	0	0,00	10260	0,61
40	0	0,00	7083	1,02	0	0,00	4635	0,40
45	0	0,00	8906	1,14	417	0,08	4479	0,39

Após 24 h do início do experimento, as maiores taxas de crescimento de *D. tertiolecta* ocorreram nas salinidades 15 e 30, com 0,47 duplicação/dia e 0,30 duplicação/dia, respectivamente (Figura 5 A). Em 48 h, a taxa de crescimento celular de *D. tertiolecta* foi maior nas salinidades 40 e 45, com 1,02 duplicação/dia e 1,14 duplicações/dia, respectivamente (Figura 5 B). Em 72 h houve crescimento celular, apenas nas salinidades 30 e 45, com 0,10 duplicação/dia e 0,08 duplicação/dia, respectivamente (Figura 5 C). Em 96 h houve dois picos de crescimento celular, em 10, entre as salinidades mais baixas e em 35 entre as salinidades mais altas, com 1,20 duplicações/dia e 0,61 duplicação/dia, respectivamente. Em salinidades 0 e 25, não houve crescimento celular em nenhum dos períodos analisados (Figura 5 D).

A) 24 h **B) 48 h** **C) 72 h** **D) 96 h**

Figura 5. Densidade celular (cél/mL) e taxa de crescimento (duplicações/dia) de *Dunaliella tertiolecta* após (A) 24h, (B) 48 h, (C) 72 h e (D) 96 h de exposição a diferentes salinidades.

A densidade e taxa de crescimento de *D. tertiolecta* em salinidades próximas às recomendadas nos protocolos de ensaios ecotoxicológicos, 24 a 35, estão representadas na Figura 6.

A) Densidade celular

B) Taxa de crescimento

Figura 6. (A) Densidade celular (cél/mL) e (B) taxa de crescimento (duplicações/dia) de *Dunaliella tertiolecta* após 24h, 48 h, 72 h e 96 h de exposição a diferentes salinidades.

4.3. Efeito algicida/algistático

A verificação do efeito algistático ou algicida de cada substância está apresentado na Tabela 5.

Após 96 h de exposição às diferentes substâncias de referência, uma alíquota do tratamento que inibiu o crescimento de *D. tertiolecta* foi transferida

para um meio de cultura fresco para observação da ocorrência, ou não, de crescimento celular, caracterizando um efeito algistático ou algicida, respectivamente.

Tabela 5. Densidade celular (cél/mL) de *Dunaliella tertiolecta* novamente cultivada em meio de cultura fresco após 96 h de exposição ao dicromato de potássio, dodecil sulfato de sódio, cromato de potássio, sulfato de zinco ou sulfato de cobre.

Exposição	K ₂ Cr ₂ O ₇ 10 mg/L	DSS 0,1 mg/L	K ₂ CrO ₄ 10 mg/L	ZnSO ₄ 10 mg/L	CuSO ₄ 10 mg/L
início	781	469	469	0	313
24 h	1406	0	0	6563	781
48 h	0	0	0	0	3125
72 h	469	938	0	313	63750
96 h	0	469	2031	5469	468
120 h	1563	20313	2813	19219	1093
144 h	156	0	4063	193281	0

Como pode ser observado, o efeito destas substâncias de referência foi algistático, e não algicida. As culturas de *D. tertiolecta* foram reestabelecidas após as primeiras 24 h de incubação para as células expostas ao dicromato de potássio, sulfato de zinco e sulfato de cobre, após 72 h de exposição ao dodecil sulfato de sódio e após 96 h de exposição ao cromato de potássio.

4.4. Ensaios ecotoxicológicos

4.4.1. Dicromato de potássio

4.4.1.1. Ensaio preliminar

Os resultados preliminares do ensaio ecotoxicológicos de *D. tertiolecta* após 24 h, 48 h e 72 h de exposição ao dicromato de potássio, foram obtidos pela densidade celular e após 72 h pelo conteúdo de clorofila-a (Anexo 1).

A partir dos resultados de densidade celular foram calculadas as taxas de crescimento e a porcentagem de inibição, apresentadas na Tabela 6.

Tabela 6. Taxa de crescimento (duplicações/dia) e inibição (%) de *Dunaliella tertiolecta* após 24 h, 48 h e 72 h de exposição ao dicromato de potássio obtidas pela densidade celular e após 72 h pelo conteúdo de clorofila-a.

K ₂ Cr ₂ O ₇ (mg/L)	Contagem celular						Conteúdo de Clorofila-a	
	24 h		48 h		72 h		72 h	
	Taxa de crescim. (dupl./dia)	Inibição (%)	Taxa de crescim. (dupl./dia)	Inibição (%)	Taxa de crescim. (dupl./dia)	Inibição (%)	Taxa de incremento (Cl-a/dia)	Inibição (%)
Controle	3,10	-	2,66	-	2,32	-	2,34	-
0,5	2,79	10	2,49	7	2,47	-6	2,35	0
1,0	2,38	23	2,56	4	2,41	-4	2,41	-3
10	2,80	9	2,49	6	2,44	-5	2,34	0
100	1,52	51	2,13	20	1,54	34	1,59	32
500	1,75	44	1,02	62	0,64	72	0,67	71

* Valores negativos significam estímulo ao crescimento.

Como pode ser observado, o dicromato de potássio interferiu no crescimento de *D. tertiolecta*. A taxa de crescimento da microalga após 24 h e 48 h de exposição ao dicromato de potássio foi menor em todas as concentrações-teste, em relação ao grupo controle. Após 72 h de exposição, houve um estímulo ao crescimento da microalga, em relação ao grupo controle, em concentrações mais baixas da substância, 0,5 mg/L, 1,0 mg/L e 10 mg/L e inibição em concentrações maiores, 100 mg/L e 500 mg/L.

As concentrações de 0,5 mg/L, 1,0 mg/L e 10 mg/L de dicromato de potássio causaram inibições entre 4 % e 23 % do crescimento celular de *D. tertiolecta* após 24 h e 48 h de exposição e estimulou o crescimento após 72 h. Entre estes períodos a concentração de 100 mg/L causou entre 20 % e 51 % de inibição.

A partir destes resultados, uma concentração de 50 mg/L da substância, intermediária entre 0,5 mg/L e 100 mg/L, foi estabelecida como a menor concentração a ser testada, para se obter uma inibição próxima a 10 %.

Como a concentração de 500 mg/L não chegou a inibir 90 % do crescimento da microalga, foi escolhido 600 mg/L como a maior concentração a ser testada.

Os resultados obtidos pelo conteúdo de clorofila-a reforçou a necessidade de se testar uma concentração entre 10 mg/L e 100 mg/L e outra maior que 500 mg/L, para que as concentrações causassem entre 10% e 90% de inibição (ISO, 1995).

As concentrações estabelecidas para os ensaios definitivos foram, portanto, 50 mg/L, 100 mg/L, 200 mg/L, 300 mg/L, 400 mg/L e 600 mg/L de dicromato de potássio.

4.4.1.2. Ensaios definitivos

Os resultados de densidade celular para *D. tertiolecta* após 48 h, 72 h e 96 h de exposição ao dicromato de potássio e de conteúdo de clorofila-a após 96 h, estão apresentados no Anexo 2. As médias e desvios-padrão obtidos em cinco ensaios definitivos estão apresentados na Tabela 7 e representados na Figura 7.

Tabela 7. Crescimento médio de *Dunaliella tertiolecta* após 48 h, 72 h e 96 h de exposição ao dicromato de potássio (mg/L) avaliado pela densidade celular (cél/mL) e após 96 h pelo conteúdo de clorofila-a (µg/L).

Método	Exposição	Ensaio	N° inicial	Controle	Dicromato de potássio (mg/L)					
					50	100	200	300	400	600
Contagem celular (cél/mL)	48 h	1	1146	34167	14271	5938	2083	2813	2083	1042
		2	729	32396	16354	7813	2708	1667	1771	1771
		3	1146	40104	18646	7604	4479	3333	3333	3229
		4	729	13438	17083	11771	4167	3438	2292	2708
		5	1146	13854	14583	7708	3125	3021	3021	1979
		Média	979	26792	16188	8167	3313	2854	2500	2146
		Desv. pad.	228	12336	1811	2157	1000	709	655	848
	72 h	1	1146	158750	48438	16667	2396	1875	1042	833
		2	729	155208	68646	24792	3958	2396	3438	1979
		3	1146	186667	72500	17813	4792	2396	1875	1875
		4	729	112500	76042	22396	4271	3646	3333	1771
		5	1146	32604	23750	10000	1667	1667	1875	1354
		Média	979	129146	57875	18333	3417	2396	2313	1563
		Desv. pad.	228	60128	21872	5716	1325	769	1037	472
	96 h	1	1146	484792	165417	42188	3125	1042	417	833
		2	729	834167	273750	30729	3958	1979	2396	1563
		3	1146	561250	183229	29167	3958	833	1042	521
		4	729	565208	190208	37188	3229	2813	1875	1042
		5	1146	241667	125000	21354	2292	1250	1146	729
		Média	979	537417	187521	32125	3313	1583	1375	938
		Desv. pad.	228	211919	54449	7962	693	812	770	397
Conteúdo de clorofila-a (µg/L)	96 h	1	1,8	1197,9	295,9	75,2	10,2	4,8	1,8	4,2
		2	2,0	1069,5	398,7	75,8	14,4	4,8	3,0	0,6
		3	2,0	698,7	276,3	30,5	4,2	0,6	0,6	2,5
		4	2,0	794,8	336,9	65,5	12,8	4,2	3,7	2,4
		5	1,78	225,2	225,7	47,5	6,6	1,2	0,6	0,0
		Média	1,9	797,2	306,7	58,9	9,7	3,1	1,9	2,0
		Desv. pad.	0,1	378,1	65,1	19,6	4,2	2,1	1,4	1,7

Nos cinco ensaios realizados, ao final de 96 h, a densidade celular do grupo controle aumentou aproximadamente 550 vezes o valor do inóculo.

Com o aumento a concentração de dicromato de potássio, a densidade de *D. tertiolecta* foi reduzida em todos os tratamentos, em relação ao grupo controle. No entanto, comparando os resultados obtidos após 48 h, 72 h e 96 h de exposição à substância de referência, a densidade celular média aumentou nas concentrações de 50 mg/L e 100 mg/L, mas não se modificou na concentração de 200 mg/L. Nas concentrações de 300 mg/L, 400 mg/L e 600 mg/L, a densidade celular aumentou entre 48 h e 72 h e diminuiu entre 72 h e 96 h.

A média de conteúdo de clorofila-a da microalga mostrou-se maior que a média do inóculo, cerca de 420 vezes. Entretanto, à medida que a concentração da substância aumentou, o conteúdo de clorofila-a diminuiu, em relação ao grupo controle.

Figura 7. Média de densidade celular (cél/mL) de *Dunaliella tertiolecta* após 48 h, 72 h e 96 h de exposição ao dicromato de potássio (mg/L) e média do conteúdo de clorofila-a (µg/L) após 96 h.

A partir dos resultados de densidade celular e do conteúdo de clorofila-a foram calculadas as taxas de crescimento e a porcentagem de inibição, apresentadas na Tabela 8.

Tabela 8. Taxas médias de crescimento (duplicações/dia) e inibição (%) de *Dunaliella tertiolecta* após 48 h, 72 h e 96 h de exposição ao dicromato de potássio obtidas pela densidade celular e Taxas médias de incremento de após 96 h pelo conteúdo de clorofila-a.

Dicromato de potássio (mg/L)	Ensaio	Contagem celular				Conteúdo de Clorofila-a			
		48 h		72 h		96 h		96 h	
		Taxa de crescimento (dupl./dia)	Inibição (%)	Taxa de crescimento (dupl./dia)	Inibição (%)	Taxa de crescimento (dupl./dia)	Inibição (%)	Taxa de incremento (Cl-a/dia)	Inibição (%)
Controle	1	2,44	-	2,30	-	2,17	-	2,29	-
	2	2,71	-	2,57	-	2,54	-	2,26	-
	3	2,43	-	2,53	-	2,22	-	2,08	-
	4	2,07	-	2,34	-	2,40	-	2,15	-
	5	1,79	-	1,60	-	1,93	-	1,70	-
	Média	2,3	-	2,3	-	2,3	-	2,1	-
	Desv. pad.	0,4	-	0,4	-	0,2	-	0,2	-
50	1	1,81	26	1,79	22	1,79	18	1,80	22
	2	2,24	17	2,18	15	2,13	16	1,91	16
	3	1,99	21	2,01	18	1,82	18	1,77	15
	4	2,27	-10	2,22	5	2,00	17	1,84	14
	5	1,83	-2	1,45	10	1,69	12	1,69	1
	Média	2,0	10,3	1,9	14,0	1,9	16,1	1,8	13,4
	Desv. pad.	0,2	15,6	0,3	6,7	0,2	2,3	0,1	7,8
100	1	1,18	52	1,28	44	1,30	40	1,31	43
	2	1,70	37	1,70	34	1,29	49	1,30	42
	3	1,31	46	1,36	46	1,16	48	0,96	54
	4	2,00	3	1,64	30	1,41	41	1,21	44
	5	1,36	24	1,04	35	1,05	45	1,06	37
	Média	1,5	32,5	1,4	37,9	1,2	44,7	1,2	45,8
	Desv. pad.	0,3	19,4	0,3	6,9	0,1	4,0	0,2	5,6
200	6	0,42	83	0,34	85	0,35	84	0,51	78
	7	0,94	65	0,81	68	0,60	76	0,68	70
	8	0,68	62	0,96	72	0,44	80	0,24	88
	9	1,26	39	0,85	64	0,53	78	0,57	74
	10	0,72	60	0,18	89	0,25	87	0,41	76
	Média	0,8	61,8	0,6	75,7	0,4	81,0	0,5	77,0
	Desv. pad.	0,3	15,6	0,3	10,8	0,1	4,5	0,2	7,0
300	11	0,62	74	0,22	91	0,00	100	0,15	93
	12	0,58	78	0,53	80	0,35	86	0,30	87
	13	0,35	70	0,76	85	0,00	100	0,00	100
	14	1,10	47	0,73	69	0,48	80	0,30	86
	15	0,69	62	0,17	89	0,02	99	0,00	100
	Média	0,7	66,2	0,5	82,8	0,2	91,6	0,2	93,2
	Desv. pad.	0,3	12,6	0,3	8,8	0,2	10,1	0,2	6,8
400	16	0,41	83	0,00	100	0,00	100	0,00	100
	17	0,58	78	0,71	72	0,42	83	0,11	95
	18	0,24	70	0,77	90	0,00	100	0,00	100
	19	0,78	62	0,73	69	0,33	86	0,25	88
	20	0,69	61	0,21	87	0,00	100	0,00	100
	Média	0,5	71,0	0,5	83,7	0,1	94,0	0,1	96,7
	Desv. pad.	0,2	9,7	0,4	12,9	0,2	8,3	0,1	5,1
600	21	0,00	100	0,00	100	0,00	100	0,01	99
	22	0,52	81	0,48	81	0,24	90	0,00	100
	23	0,01	100	0,69	73	0,00	100	0,00	100
	24	0,94	54	0,41	83	0,11	95	0,08	96
	25	0,39	78	0,03	98	0,00	100	0,00	100
	Média	0,4	82,6	0,3	87,0	0,1	97,2	0,0	99,1
	Desv. pad.	0,4	18,8	0,3	11,6	0,1	4,3	0,0	1,7

* Valores negativos significam estímulo

A taxa média de crescimento do grupo controle foi de 2,3 duplicações/dia para o método de determinação da densidade celular e a taxa de incremento de clorofila-a foi de 2,1 Cl-a/dia para o método de conteúdo

de clorofila-*a*. Em presença de dicromato de potássio, as taxas médias de crescimento celular e incremento de clorofila-*a*, nos diferentes tratamentos, foram menores em relação ao grupo controle. Em 600 mg/L, por exemplo, a taxa média de crescimento celular diminuiu quase 8 vezes. Houve em média, apenas 0,4 duplicação/dia em 48 h, 0,3 duplicação/dia em 72 h e 0,1 duplicação/dia em 96 h de exposição pelo método de determinação da densidade celular e não houve incremento de clorofila-*a* (Figura 8).

Figura 8. Taxas médias de crescimento (duplicações/dia) de *Dunaliella tertiolecta* após 48 h, 72 h e 96 h de exposição ao dicromato de potássio (mg/L) obtidas pelo densidade celular e após 96 h e pelo conteúdo de clorofila-*a*.

Com o aumento da concentração de dicromato de potássio, a porcentagem de inibição da microalga aumentou, em relação ao controle, independentemente do tempo de exposição. Na menor concentração testada, 50 mg/L, a substância inibiu entre 10 % e 16 % do crescimento celular e 13 % do incremento de clorofila-*a*. Na maior concentração testada, 600 mg/L a inibição foi entre 83 % e 100 % do crescimento celular e 100 % do incremento de clorofila-*a* (Figura 9).

Figura 9. Médias de inibição (%) de *Dunaliella tertiolecta* após 48 h, 72 h e 96 h de exposição ao dicromato de potássio (mg/L), obtidas pela densidade celular e após 96 h pelo conteúdo de clorofila-a.

A razão média de clorofila-a por célula está apresentada na Tabela 9 e representada na Figura 10.

Tabela 9. Razão de clorofila-a por célula (Pg Cl-a/cél) para *Dunaliella tertiolecta* após 96 h de exposição ao dicromato de potássio.

Ensaio	N° inicial	Controle	Dicromato de potássio (mg/L)					
			50	100	200	300	400	600
1	1,6	2,5	1,8	1,8	3,0	5,8	4,8	8,7
2	2,0	1,3	1,5	3,0	3,8	2,5	1,5	0,2
3	2,0	1,2	1,5	1,1	1,1	1,0	0,5	4,1
4	0,0	4,3	9,2	21,7	5,3	2,6	3,9	3,8
5	1,6	0,9	1,9	2,4	2,8	0,8	0,5	0,0
Média	1,4	2,0	3,2	6,0	3,2	2,5	2,2	3,4
Desv. pad.	0,8	1,4	3,4	8,8	1,5	2,0	2,0	3,5

A razão média de clorofila-a por célula foi maior na presença de dicromato de potássio, quando comparada ao grupo controle, sem mostrar correlação com a quantidade da substância.

Figura 10. Razão média de clorofila-a por célula (Pg Cl-a/cél) para *Dunaliella tertiolecta* após 96 h de exposição ao dicromato de potássio.

Nos ensaios com o dicromato de potássio, o pH não variou mais que uma unidade entre o início e o fim do ensaio e a salinidade se manteve dentro da faixa estabelecida, 36 ± 1 (Anexo 2).

Estas variáveis, pH e salinidade, foram analisadas pela correlação de Pearson (r) para $p < 0,05$ e os resultados estão apresentados na Tabela 10.

Tabela 10. Correlação de Pearson (r) entre as variáveis físicas e químicas, pH e salinidade, e a taxa de crescimento e a concentração de dicromato de potássio, para $p < 0,05$.

Variáveis	Ensaio	Coeficiente	Taxa de crescimento				Concentração de $K_2Cr_2O_7$		
			48 h	72 h	96 h	Cl-a	48 h	72 h	96 h
pH	1	r	0,9767	0,9894	0,9705	0,9727	-0,9419	-0,9168	-0,7918
		p	0,0002	0,9998	0,9947	0,0002	0,0015	0,0037	0,0338
	2	r	0,6383	0,9172	0,9750	0,9486	-0,7205	-0,8174	-0,8018
		p	0,1229	0,0036	0,0002	0,0011	0,0677	0,0247	0,0301
	3	r	0,8299	0,9871	0,9314	0,9442	-0,5785	-0,7492	-0,7285
		p	0,0208	< 0,0001	0,0023	0,0014	0,1735	0,0525	0,0632
	4	r	0,1828	0,9568	0,9506	0,9286	-0,1340	-0,7604	-0,7387
		p	0,6949	0,0007	0,0010	0,0025	0,7745	0,0472	0,0578
	5	r	0,9230	0,9589	0,9610	0,9373	-0,9140	-0,8379	-0,7660
		p	0,0030	0,0006	0,0006	0,0018	0,0040	0,0186	0,0446
Salinidade	1	r	-0,6840	-0,7721	nc	nc	0,8657	0,8657	nc
		p	0,0900	0,0419	nc	nc	0,0118	0,0118	nc
	2	r	-0,3668	0,5488	nc	nc	0,3393	-0,8455	nc
		p	0,4182	0,2020	nc	nc	0,4566	0,0165	nc
	3	r	-0,6429	-0,9275	-0,8068	-0,7549	0,8455	0,6741	0,8657
		p	0,1193	0,0026	0,0283	0,0498	0,0165	0,0967	0,0118
	4	r	-0,9615	nc	-0,7352	-0,7965	0,8136	nc	0,8111
		p	0,0005	nc	0,0597	0,0320	0,0260	nc	0,0268
	5	r	-0,6155	-0,9650	nc	nc	0,8455	0,8136	nc
		p	0,1411	0,0004	nc	nc	0,0165	0,0260	nc

nc = valor não calculado

A taxa de crescimento celular e a taxa de incremento de clorofila-a de *D. tertiolecta* apresentaram uma correlação positiva significativa com o pH. Essa correlação pode estar relacionada com a respiração e a fotossíntese da microalga. Quanto maior o número de células, maior o consumo do gás carbônico para a conversão de energia luminosa, e consequente elevação do pH (Lourenço, 2006).

O aumento da concentração da substância de referência resultou em uma correlação significativa negativa com o pH. O dicromato de potássio apresentou pH menor que 4 na concentração da solução-estoque e foi corrigido para $8 \pm 0,5$. Portanto, a partir da diluição da solução-estoque, para obtenção das soluções-teste, menores quantidades de dicromato de potássio podem ter resultado em um pH menos ácido, com valores mais próximos ao do meio de cultura.

Como pode ser observada, a taxa de crescimento celular e a taxa de incremento de clorofila-*a* de *D. tertiolecta* apresentaram correlações significativas negativas com a salinidade, pois quando a salinidade aumentou, as taxas de crescimento diminuíram. Com a concentração de dicromato de potássio, a salinidade, em geral, apresentou uma correlação significativa positiva, indicando que a salinidade pode ter se elevado com o aumento da concentração da substância. A adição de um sal, dicromato de potássio, pode ter elevado a salinidade da solução-teste, e influenciado negativamente o aumento do número de células, não exatamente pela elevação da salinidade, mas pela quantidade do agente tóxico, lembrando que *D. tertiolecta* responde bem às salinidades altas.

A partir dos valores das Cl₅₀ de dicromato de potássio, calculadas para ambos os métodos utilizados, densidade celular e conteúdo de clorofila-*a*, foram elaboradas as cartas-controle preliminares para cada período de exposição, e estão apresentados na Tabela 11 e representados pela Figura 11.

Tabela 11. Concentrações de inibição (Cl₅₀) de *Dunaliella tertiolecta* após 48 h, 72 h e 96 h de exposição ao dicromato de potássio (mg/L), obtidas pela densidade celular e após 96 h pelo conteúdo de clorofila-*a*.

Ensaio	Contagem celular			Conteúdo de clorofila- <i>a</i>
	Cl ₅₀ -48h	Cl ₅₀ -72h	Cl ₅₀ -96h	Cl ₅₀ -Cl- <i>a</i>
1	95,8 (80,9 - 111,6)	103,6 (90,6 - 118,6)	110,4 (98,1 - 124,4)	109,6 (95,1 - 126,4)
2	136,8 (116,6 - 160,4)	143,5 (123,2 - 167,2)	107,1 (94,11 - 121,9)	120,5 (105,8 - 137,3)
3	128,9 (103,4 - 103,4)	112,8 (97,94 - 129,9)	103,7 (91,3 - 117,8)	94,5 (84,7 - 105,4)
4	319,0 (247,9 - 410,5)	172,6 (149,9 - 198,6)	116,4 (101,7 - 133,3)	116,8 (103,0 - 132,4)
5	205,0 (177,2 - 237,2)	116,5 (105,2 - 129,1)	104,6 (94,4 - 115,9)	123,6 (113,7 - 134,3)
Média	177,1	129,8	108,5	113,0
Desv. pad.	88,7	28,1	5,2	11,6
CV (%)	50	22	5	10

As Cl₅₀ médias de dicromato de potássio para *D. tertiolecta* pelo método de determinação da densidade celular foram Cl₅₀-48h = 177,1 (88,4-265,8) mg/L, Cl₅₀-72h = 129,8 (101,7-157,9) mg/L e Cl₅₀-96h = 108,5 (103,3-113,7) mg/L e para o método de avaliação do conteúdo de clorofila-*a* foi Cl₅₀-Cl-*a* = 113,0 (101,4-124,6) mg/L.

Figura 11. Carta-controlre preliminar para *Dunaliella tertiolecta* exposta ao dicromato de potássio (mg/L). Método de determinação da densidade celular de **A** a **C** e de conteúdo de clorofila-a em **D**.

O coeficiente de variação (CV) entre os ensaios, obtido pelo método de determinação da densidade celular, no período de 48 h de exposição foi de 50 %, para 72 h foi de 22 %, para 96 h foi de 5 % e para o método de conteúdo de clorofila-a foi de 10 %. No período de 48 h de exposição, o coeficiente de variação foi maior que o recomendado pela *Environment Canada* (1990),

CV ≤ 30 %, indicando que houve boa repetibilidade dos resultados apenas nos ensaios realizados com 72 h e 96 h de exposição ao dicromato de potássio, pela determinação da densidade celular e após 96 h pelo método de conteúdo de clorofila-a.

A comparação entre os resultados dos dois métodos, determinação da densidade celular e conteúdo de clorofila-a, não apresentou diferença significativa ($p=0,55$), para $p<0,05$, indicando que ambos os métodos podem ser utilizados com esta substância.

As maiores concentrações testadas que não causaram efeito (CENO) e as menores concentrações testadas que causaram efeito (CEO) no crescimento de *D. tertiolecta*, em cada ensaio estão apresentadas na Tabela 12. Resultados paramétricos, que passaram no teste de normalidade de Shapiro Wilk e de homocedasticidade de Bartlett, foram analisados pelo teste Dunnett e não paramétricos pelo teste de Kruskal-Wallis.

Tabela 12. Concentrações de efeito não observado (CENO) e concentrações de efeito observado (CEO) de dicromato de potássio (mg/L) para *Dunaliella tertiolecta* após 48 h, 72 h e 96 h de exposição, obtidas pela densidade celular e após 96 h pelo conteúdo de clorofila-a.

Ensaio	Contagem celular				Conteúdo de clorofila-a			
	48 h		72 h		96 h		96 h	
	CENO	CEO	CENO	CEO	CENO	CEO	CENO	CEO
1	<50 ^a	50 ^a	<50 ^a	50 ^a	<50 ^a	50 ^a	300 ^b	400 ^b
2	50 ^a	100 ^a	<50 ^a	50 ^a	<50 ^a	50 ^a	<50 ^a	50 ^a
3	<50 ^a	50 ^a	300 ^b	400 ^b	<50 ^a	50 ^a	50 ^a	100 ^a
4	100 ^a	200 ^a	50 ^a	100 ^a	<50 ^a	50 ^a	200 ^b	300 ^b
5	400 ^b	600 ^b	400 ^b	600 ^b	<50 ^a	50 ^a	50 ^a	100 ^a

^a teste Dunnett

^b teste Kruskal Wallis

Para os resultados obtidos pelo método de determinação da densidade celular, a CENO e a CEO para *D. tertiolecta* exposta ao dicromato de potássio variaram desde a menor até a maior concentração testada, 50 mg/L a 600 mg/L, nos primeiros nos períodos do ensaio, 48 h e 72 h de exposição. Após 96 h de exposição à primeira concentração de dicromato de potássio testada já causou um efeito sobre o crescimento da microalga, a CEO foi calculada em 50 mg/L, e a CENO foi menor do que as concentrações testadas, portanto, diluições adicionais são necessárias para se obter concentrações menores para estabelecer os valores de CENO. Para os resultados obtidos

pelo conteúdo de clorofila-a, neste mesmo período, 96 h, a CENO e a CEO variaram entre 50 mg/L e 400 mg/L.

4.4.2. Dodecil sulfato de sódio (DSS)

4.4.2.1. Ensaio preliminar

O resultado do ensaio ecotoxicológico preliminar de *D. tertiolecta* após 72 h e 96 h de exposição ao dodecil sulfato de sódio foram obtidos pelo método de determinação da densidade celular e estão apresentados na Tabela 13, juntamente com as taxas de crescimento e a porcentagem de inibição.

Tabela 13. Densidade celular (cél/mL), taxa de crescimento (duplicações/dia) e inibição (%) de *Dunaliella tertiolecta* após 72 h e 96 h de exposição ao dodecil sulfato de sódio, obtidas pela densidade celular.

DSS (mg/L)	Contagem celular					
	72 h			96 h		
	Densidade celular (cél/mL)	Taxa de crescim. (dupl./dia)	Inibição (%)	Densidade celular (cél/mL)	Taxa de crescim. (dupl./dia)	Inibição (%)
Inóculo	3438	-	-	3438	-	-
Controle	94063	1,59	-	426875	1,74	-
1,6	22188	0,90	44	113750	1,26	27
3,1	9375	0,48	70	29688	0,78	55
6,2	625	0,00	100	2500	0,00	100
12,5	1875	0,00	100	1250	0,00	100
25	2188	0,00	100	2813	0,00	100
50	3125	0,00	100	3438	0,00	100
100	3750	0,04	97	625	0,00	100

Neste ensaio, foram utilizadas concentrações-teste que variam entre 1,6 mg/L e 100 mg/L de DSS para determinação da densidade celular e cálculo da taxa de crescimento de *D. tertiolecta*. De acordo com os resultados, a presença do surfactante influenciou o crescimento celular da microalga, diminuindo sua taxa de crescimento, em relação ao grupo controle.

A inibição total do crescimento celular ocorreu a partir da concentração de 6,2 mg/L do surfactante, portanto, foi estabelecida a concentração de 5 mg/L de DSS como a maior concentração-teste para o ensaio definitivo. Para que fossem obtidas inibições entre 10 % e 90 % do crescimento da microalga, outras concentrações foram estabelecidas, utilizando um fator 2 de diluição,

resultando nas concentrações-teste de 0,3 mg/L, 0,6 mg/L, 1,2 mg/L, 2,5 mg/L, e 5,0 mg/L de dodecil sulfato de sódio.

4.4.2.2. Ensaios definitivos

Os resultados de densidade celular de *D. tertiolecta* após 48 h, 72 h e 96 h de exposição ao dodecil sulfato de sódio e de conteúdo de clorofila-*a* após 96 h, estão apresentados no Anexo 3. As médias de crescimento e desvios-padrão obtidos em cinco ensaios estão apresentados na Tabela 14 e representados na Figura 12.

Tabela 14. Crescimento médio de *Dunaliella tertiolecta* após 48 h, 72 h e 96 h de exposição ao dodecil sulfato de sódio obtido pela densidade celular (cél/mL) e após 96 h pelo conteúdo de clorofila-*a* (µg/L).

Método	Exposição	Ensaio	N° inicial	Controle	Dodecil sulfato de sódio (mg/L)				
					0,3	0,6	1,2	2,5	5
Contagem celular (cél/mL)	48 h	1	2396	2865	3385	5677	6823	365	0
		2	521	260	1146	729	781	0	0
		3	260	1875	5052	2031	208	0	0
		4	2396	52	104	0	0	0	0
		5	313	156	938	313	0	0	0
		Média	1177	1042	2125	1750	1563	73	0
		Desv. pad.	1117	1264	2038	2328	2958	163	0
	72 h	1	2396	12656	21563	21875	16823	938	469
		2	521	1406	5990	2552	3385	0	0
		3	260	8594	9583	6198	4010	0	0
		4	2396	313	1458	1094	0	0	0
		5	313	6406	5469	2656	208	0	0
		Média	1177	5875	8813	6875	4885	188	94
		Desv. pad.	1117	5113	7687	8593	6915	419	210
	96 h	1	2396	32083	34375	54479	41875	260	52
		2	521	56250	26406	54427	17865	0	0
		3	260	75677	58229	55469	40052	0	104
		4	2396	11354	22031	9063	0	0	0
		5	313	1042	1458	2865	0	0	0
		Média	1177	35281	28500	35260	19958	52	31
		Desv. pad.	1117	30930	20590	26837	20525	116	47
Conteúdo de clorofila- <i>a</i> (µg/L)	96 h	1	3,3	182,6	293,9	233,9	200,1	0,3	4,8
		2	5,0	161,6	200,6	177,5	131,2	0,0	0,0
		3	3,0	185,3	193,0	138,1	88,1	0,3	0,0
		4	9,9	76,5	49,8	55,7	1,4	0,0	0,0
		5	7,9	112,9	162,9	116,0	9,9	0,0	0,0
		Média	5,8	143,8	180,0	144,3	86,1	0,1	1,0
		Desv. pad.	3,0	47,5	87,8	66,7	83,7	0,2	2,2

O crescimento médio de *D. tertiolecta* após 48 h, 72 h e 96 h de exposição ao dodecil sulfato de sódio foi alterado pela presença de DSS, em relação ao grupo controle.

Em geral, a densidade celular média foi maior em concentrações mais baixas do surfactante e menor em concentrações mais altas, em todos os períodos de exposição, para ambos os métodos.

Figura 12. Média de crescimento (cél/mL) de *Dunaliella tertiolecta* após 48 h, 72 h e 96 h de exposição ao dodecil sulfato de sódio (mg/L), obtida pela densidade celular e após 96 h pelo conteúdo de clorofila-a.

A partir dos dados de densidade celular e do conteúdo de clorofila-a foram calculadas as taxas de crescimento e a porcentagem de inibição do crescimento (Tabela 15).

Tabela 15. Taxas médias de crescimento (duplicações/dia) e inibição (%) de *Dunaliella tertiolecta* após 48 h, 72 h e 96 h de exposição ao dodecil sulfato de sódio, obtidas pela densidade celular e após 96 h pelo método de clorofila-a.

Dodecil sulfato de sódio (mg/L)	Ensaio	Contagem celular				Conteúdo de Clorofila-a			
		48 h		72 h		96 h		96 h	
		Taxa de crescim. (dupl./dia)	Inibição (%)	Taxa de crescim. (dupl./dia)	Inibição (%)	Taxa de crescim. (dupl./dia)	Inibição (%)	Taxa de incremento (Cl-a/dia)	Inibição (%)
Controle	1	0,45	-	0,88	-	0,95	-	1,49	-
	2	0,00	-	0,44	-	1,63	-	1,26	-
	3	1,41	-	1,64	-	2,03	-	1,48	-
	4	0,00	-	0,00	-	0,62	-	0,78	-
	5	0,10	-	1,00	-	0,46	-	0,98	-
	Média	0,4	-	0,8	-	1,1	-	1,2	-
	Desv. pad.	0,6	-	0,6	-	0,7	-	0,3	-
0,3	1	0,63	-41	1,05	-20	0,98	-4	1,65	-11
	2	0,83	nc	1,16	nc	1,39	15	1,34	-6
	3	2,09	-49	1,74	-6	1,94	4	1,51	-2
	4	0,00	28	0,00	-12	0,83	-34	0,64	18
	5	0,63	nc	0,95	5	0,54	-16	1,10	-13
	Média	0,8	-20,6	1,0	-8,2	1,1	-6,9	1,2	-2,7
	Desv. pad.	0,8	42,5	0,6	10,6	0,5	18,8	0,4	12,2
0,6	1	0,85	-89	1,10	-25	1,13	-20	1,57	-6
	2	0,53	nc	0,53	-22	1,62	1	1,29	-2
	3	1,38	2	1,45	12	1,93	5	1,39	6
	4	0,00	-9	0,00	-57	0,56	10	0,68	13
	5	0,33	nc	0,94	6	0,76	-63	0,97	1
	Média	0,6	-32,0	0,8	-17,2	1,2	-13,2	1,2	2,5
	Desv. pad.	0,5	49,5	0,6	27,8	0,6	29,8	0,4	7,4
1,2	1	0,96	nc	1,00	-14	1,05	-11	1,52	-2
	2	0,55	nc	0,92	nc	1,26	23	1,12	11
	3	0,00	100	1,34	18	1,82	11	1,27	14
	4	0,00	-12	0,00	nc	0,00	100	0,00	100
	5	0,00	100	0,11	89	0,00	100	0,26	73
	Média	0,3	62,6	0,7	31,2	0,8	44,5	0,8	39,3
	Desv. pad.	0,4	64,7	0,6	52,6	0,8	52,1	0,7	44,6
2,5	1	0,00	100	0,00	100	0,00	100	0,00	100
	2	0,00	nc	0,00	100	0,00	100	0,00	100
	3	0,00	100	0,00	100	0,00	100	0,00	100
	4	0,00	nc	0,00	nc	0,00	100	0,00	100
	5	0,00	nc	0,00	100	0,00	100	0,00	100
	Média	0,0	100,0	0,0	100,0	0,0	100,0	0,0	100,0
	Desv. pad.	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
5,0	1	0,00	100	0,00	100	0,00	100	0,18	88
	2	0,00	nc	0,00	100	0,00	100	0,00	100
	3	0,00	100	0,00	100	0,00	100	0,00	100
	4	0,00	nc	0,00	nc	0,00	100	0,00	100
	5	0,00	nc	0,00	100	0,00	100	0,00	100
	Média	0,0	100,0	0,0	100,0	0,0	100,0	0,0	97,6
	Desv. pad.	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,1	5,4

* Valores negativos significam estímulo

Em concentrações mais baixas, 0,3 mg/L e 0,6 mg/L de DSS, houve estímulo ao crescimento celular após 48 h, 72 h e 96 h de exposição. A inibição do crescimento de *D. tertiolecta* só ocorreu em concentrações mais altas de DSS, 2,5 mg/L e 5,0 mg/L.

A taxa média de crescimento do grupo controle obtida pela densidade celular foi de 0,4 duplicação/dia em 48 h, 0,8 duplicação/dia em 72 h e 1,1 duplicações/dia em 96 h de exposição. A taxa média de incremento de clorofila-a, 1,2 CI-a/dia, foi semelhante à taxa de crescimento celular após 96 h de exposição ao DSS (Figura 13).

Em presença de dodecil sulfato de sódio, a taxa média de crescimento celular foi maior nas concentrações de 0,3 mg/L e 0,6 mg/L e 1,2 mg/L, e não houve crescimento celular nas concentrações de 2,5 mg/L e 5,0 mg/L. A taxa média de incremento de clorofila-a se manteve nas concentrações de 0,3 mg/L e 0,6 mg/L, foi menor na concentração de 1,2 mg/L e também não ocorreu nas concentrações de 2,5 mg/L e 5,0 mg/L.

Figura 13. Médias das taxas de crescimento (duplicações/dia) de *Dunaliella tertiolecta* após 48 h, 72 h e 96 h de exposição ao dodecil sulfato de sódio (mg/L), obtidas pela densidade celular e após 96 h pelo conteúdo de clorofila-a.

Concentrações mais baixas de DSS, 0,3 mg/L e 0,6 mg/L, em, geral, estimularam o crescimento celular nos três períodos de exposição. A inibição do crescimento de *D. tertiolecta* só ocorreu em concentrações mais altas de

DSS, 1,2 mg/L 2,5 mg/L e 5,0 mg/L, sem correlação com o tempo de exposição e do método utilizado (Figura 14).

O dodecil sulfato de sódio estimulou o incremento de clorofila-a na concentração de 0,3 mg/L e inibiu nas concentrações de 0,6 mg/L, 1,2 mg/L 2,5 mg/L e 5,0 mg/L.

Figura 14. Médias de inibição (%) de *Dunaliella tertiolecta* após 48 h, 72 h e 96 h de exposição ao dodecil sulfato de sódio (mg/L), obtidas pela densidade celular e de conteúdo de clorofila-a.

A razão média de conteúdo de clorofila-a por célula de *D. tertiolecta* está apresentada na Tabela 16 e representada na Figura 15.

Tabela 16. Razão média de clorofila-a por célula (Pg Cl-a/cél) para *Dunaliella tertiolecta* após 96 h de exposição ao dodecil sulfato de sódio.

Ensaio	N° inicial	Controle	Dodecil sulfato de sódio (mg/L)				
			0,3	0,6	1,2	2,5	5,0
1	2,2	5,7	8,5	4,5	4,6	0,8	9,4
2	9,9	3,9	9,2	5,6	10,2	0,0	0,0
3	9,5	2,5	3,6	2,6	2,3	0,0	0,0
4	5,2	6,6	2,5	6,1	22,6	0,0	0,0
5	25,2	127,0	160,9	54,5	85,9	0,0	0,0
Média	10,4	29,2	36,9	14,7	25,1	0,2	1,9
Desv. pad.	8,8	54,7	69,4	22,3	34,9	0,4	4,2

A razão média de clorofila-a por célula, em média, diminuiu com a presença do surfactante, em relação ao grupo controle, na concentração de 0,3 mg/L houve aumento. Entretanto somente as concentrações de 2,5 mg/L e 5,0 mg/L de DSS foram significativamente diferentes do controle.

Figura 15. Razão média de clorofila-a por célula (Pg Cl-a/cél) de *Dunaliella tertiolecta* após 96 h de exposição ao dodecil sulfato de sódio.

Nos cinco ensaios realizados, o pH não variou mais que uma unidade e a salinidade se manteve dentro da faixa estabelecida, 36 ± 1 (Anexo 3). Estas variáveis foram analisadas pela correlação de Pearson ($p < 0,05$) para verificação da correlação com a taxa de crescimento e com a concentração de DSS. Os resultados estão apresentados na Tabela 17.

Tabela 17. Correlação de Pearson (r) entre as variáveis físicas e químicas, pH, e taxa de crescimento e concentração de dodecil sulfato de sódio, para $p < 0,05$.

Variável	Ensaio	Coeficiente	Taxa de crescimento				Concentração de DSS			
			48 h	72 h	96 h	Cl-a	48 h	72 h	96 h	Cl-a
pH	1	r	0,4878	0,9930	0,9234	0,8862	-0,4813	-0,0030	-0,6617	-0,8453
		p	0,3263	< 0,0001	0,0086	0,0187	0,3337	0,9955	0,1522	0,0340
	2	r	0,6914	0,0758	0,3044	0,3347	-0,3242	0,2033	-0,3686	-0,8989
		p	0,1280	0,8865	0,5575	0,5167	0,5307	0,6992	0,4721	0,0148
	3	r	0,0639	0,2140	0,9563	0,950	0,2075	-0,4840	-0,8040	-0,8991
		p	0,9043	0,6839	0,0028	0,0037	0,6933	0,3307	0,0538	0,0147
	4	r	nc	nc	0,7130	0,6512	0,8384	0,9183	-0,1731	-0,7533
		p	nc	nc	0,1117	0,1612	0,0370	0,0097	0,7430	0,0837
	5	r	-0,8902	-0,7765	-0,3177	-0,5279	0,5649	0,6503	0,5274	-0,8398
		p	0,0174	0,0693	0,5394	0,2816	0,2427	0,1620	0,2822	0,0364

nc = valor não calculado

As taxas de crescimento apresentaram, em todos os períodos de exposição, uma correlação positiva com o pH, exceto para o 5º ensaio, em que a correlação foi negativa, assim como a taxa de incremento de clorofila-a de *D. tertiolecta*, embora em geral, as correlações não tenham sido significativas.

Não houve variação de salinidade nas diferentes concentrações de dodecil sulfato de sódio. Portanto, não houve correlação entre a taxa de crescimento com essa variável.

A partir dos valores das CI₅₀ (Tabela 18) calculadas para ambos os métodos utilizados, densidade celular e conteúdo de clorofila-a, foram elaboradas as cartas-controle preliminares somente para o período de 96 h de exposição (Figura 16).

Tabela 18. Concentrações de inibição (CI₅₀) de *Dunaliella tertiolecta* após 48 h, 72 h e 96 h de exposição ao dodecil sulfato de sódio (mg/L), obtida pela densidade celular e após 96 h pelo conteúdo de clorofila-a.

Ensaio	Contagem celular			Conteúdo de clorofila-a
	CI ₅₀ -48h	CI ₅₀ -72h	CI ₅₀ -96h	CI ₅₀ -Cl-a
1	1,48 (1,44-1,52)	1,68 (1,65-1,71)	1,68 (1,64-1,71)	1,72 (1,71-1,74)
2	nc	1,27 (1,25-1,28)	1,27 (1,20-1,35)	1,48 (1,43-1,54)
3	0,78 (0,77-0,79)	1,16 (1,09-1,23)	1,49 (1,43-1,55)	1,41 (1,34-1,49)
4	nc	nc	0,66 (0,64-0,68)	0,74 (0,73-0,76)
5	0,65 (0,64-0,66)	0,87 (0,83-0,90)	0,79 (0,77-0,81)	0,95 (0,91-0,99)
Média	0,97	1,25	1,18	1,26
Desvio padrão	0,5	0,3	0,4	0,4
Coef. Variaç. (%)	46	27	33	29

nc = valor não calculado

Em 48 h e 72 h de exposição não foi possível obter os cinco valores para se calcular a CI₅₀ média, o desvio-padrão e o coeficiente de variação para elaboração das respectivas cartas-controlle preliminares, pois nos ensaios 1 e 4 ocorreu apenas estímulo ou inibição total do crescimento celular, impossibilitando o cálculo da CI₅₀.

As CI₅₀ médias de DSS para *D. tertiolecta* após 96 h de exposição, obtida pela densidade celular foram, CI₅₀-48h = 0,97 (0,47-1,47) mg/L, CI₅₀-72h = 1,25 (0,95-1,55) mg/L e CI₅₀-96h = 1,18 (0,78-1,58) mg/L e pelo método de avaliação do conteúdo de clorofila-a foi CI₅₀-Cl-a = 1,26 (0,89-1,69) mg/L de DSS.

Os coeficientes de variação (CV) que apresentaram uma boa repetibilidade e, portanto, considerados satisfatórios (CV < 30 %) foram obtidos pelo método de determinação da densidade celular CV-72 h = 27 % e pelo método de conteúdo de clorofila-a CV-96 h = 29 %. Para 48 h e 96 h, CV = 46 % e CV = 33 %, respectivamente, foram considerados insatisfatórios, ou seja, os resultados dos ensaios não apresentaram uma boa repetibilidade.

A) Contagem celular 96 h

Carta-controle para densidade de células de *Dunaliella tertiolecta* para 96 horas de exposição ao dodecil sulfato de sódio

B) Conteúdo de clorofila-a 96 h

Carta-controle para conteúdo de clorofila-a de *Dunaliella tertiolecta* para 96 horas de exposição ao dodecil sulfato de sódio

Figura 16. Cartas-controle preliminares para *Dunaliella tertiolecta* exposta ao dodecil sulfato de sódio (mg/L). Método de determinação da densidade celular em **A** e conteúdo de clorofila-a em **B**.

A comparação entre os resultados obtidos pelos métodos de determinação da densidade celular e conteúdo de clorofila-a, após 96 h de exposição ao dodecil sulfato de sódio não apresentou diferença significativa ($p=0,84$) para $p<0,01$, indicando que ambos os métodos podem ser utilizados para ensaios nestas condições.

A CENO e CEO de dodecil sulfato de sódio para *D. tertiolecta*, em cada tratamento, estão apresentadas na Tabela 19. Resultados paramétricos, que passaram no teste de normalidade de Shapiro Wilk e de homocedasticidade de Bartlett, foram analisados pelo teste Dunnett e os não paramétricos pelo teste de Kruskal-Wallis.

Tabela 19. Concentrações de efeito não observado (CENO) e concentrações de efeito observado (CEO) para *Dunaliella tertiolecta* após 48 h, 72 h e 96 h de exposição ao dodecil sulfato de sódio (mg/L), obtidos pela densidade celular e após 96 h pelo conteúdo de clorofila-a.

Ensaio	Contagem celular				Conteúdo de clorofila-a			
	48 h		72 h		96 h		96 h	
	CENO	CEO	CENO	CEO	CENO	CEO	CENO	CEO
1	2,5 ^a	5 ^a	1,2 ^a	2,5 ^a	1,2 ^a	2,5 ^a	1,2 ^a	2,5 ^a
2	2,5 ^a	5 ^a	>5,0 ^b	>5,0 ^b	>5,0 ^b	>5,0 ^b	>5,0 ^b	>5,0 ^b
3	>5,0 ^b	>5,0 ^b	>5,0 ^b	>5,0 ^b	>5,0 ^b	>5,0 ^b	>5,0 ^b	>5,0 ^b
4	1,2 ^a	2,5 ^a	>5,0 ^b	>5,0 ^b	>5,0 ^b	>5,0 ^b	1,2 ^b	2,5 ^b
5	1,2 ^a	2,5 ^a	2,5 ^a	5,0 ^a	>5,0 ^b	>5,0 ^b	1,2 ^b	2,5 ^b

^a teste Dunnet

^b teste Kruskal Wallis

As maiores concentrações que não causaram efeito de inibição do crescimento da microalga foram as concentrações mais altas de DSS, CENO entre 1,2 e maior que 5,0 mg/L em todos os períodos de exposição pelo método de determinação da densidade celular e de conteúdo de clorofila-a.

4.4.3. Cromato de potássio

4.4.3.1. Ensaio preliminar

Os resultados do ensaio ecotoxicológico preliminar para o crescimento de *D. tertiolecta* após 72 h de exposição ao cromato de potássio estão apresentados na Tabela 20, juntamente com a taxa de crescimento e a porcentagem de inibição, obtidas pela densidade celular.

Tabela 20. Taxa de crescimento (duplicações/dia) e inibição (%) de *Dunaliella tertiolecta* após 72 h de exposição ao cromato de potássio (mg/L), obtidas pela densidade celular.

K ₂ CrO ₄ (mg/L)	Contagem celular		
	72 h		
	Densidade (cél/mL)	Taxa de crescimento (dupl./dia)	Inibição (%)
Nº inicial	10000	-	-
Controle	100000	1,11	-
50	70000	0,94	16
100	76000	0,98	12
200	25000	0,44	60
300	15000	0,19	82
400	14000	0,16	85
500	13000	0,13	89

Uma vez que a menor concentração de cromato de potássio, 50 mg/L, causou 16 % de inibição do crescimento da microalga, a concentração de 25 mg/L foi estabelecida como a menor concentração a ser utilizada nos ensaios definitivos, para que a inibição fosse próxima a 10 %.

As concentrações de 300 mg/L, 400 mg/L e 500 mg/L apresentaram uma inibição do crescimento celular semelhante, entre 82 % e 89 %. Para se obter uma inibição próxima a 90%, utilizando um fator de diluição 2, apenas a concentração-teste de 400 mg/L foi mantida como a maior concentração-teste.

As cinco concentrações para os ensaios definitivos foram, portanto, 25 mg/L, 50 mg/L, 100 mg/L, 200 mg/L e 400 mg/L de cromato de potássio.

4.4.3.2. Ensaios definitivos

Os resultados dos ensaios de sensibilidade de *D. tertiolecta* após 48 h, 72 h e 96 h de exposição ao cromato de potássio, estão apresentados no Anexo 5. As médias e desvios-padrão obtidos em três ensaios estão apresentados na Tabela 21 e representados na Figura 17.

Tabela 21. Crescimento médio de *Dunaliella tertiolecta* após 48 h, 72 h e 96 h de exposição ao cromato de potássio (mg/L), obtido pela densidade celular (cél/mL) e após 96 h pelo conteúdo de clorofila-a (µg/L).

Método	Exposição	Ensaio	N° inicial	Controle	Cromato de potássio (mg/L)				
					25	50	100	200	400
Contagem celular (cél/mL)	48 h	1	260	1146	833	625	1719	781	677
		2	469	313	573	833	1042	833	938
		3	729	2083	885	573	6458	990	1042
		Média	486	1181	764	677	3073	868	885
		Desv. pad.	235	886	167	138	2951	108	188
	72 h	1	260	2396	8385	9271	15469	5781	1875
		2	469	4583	1250	1823	2656	1510	1563
		3	729	3802	1667	1406	5208	8281	677
		Média	486	3594	3767	4167	7778	5191	1372
		Desv. pad.	235	1109	4005	4425	6782	3424	621
	96 h	1	260	2448	2656	4688	2552	4844	625
		2	469	3281	2500	5260	8646	2813	729
		3	729	12708	13021	16510	8958	7865	885
		Média	486	6146	6059	8819	6719	5174	747
		Desv. pad.	235	5699	6030	6667	3612	2542	131
Conteúdo de clorofila-a (µg/L)	96 h	1	8,7	353,4	332,7	199,9	130,5	54,1	9,8
		2	9,7	366,3	413,6	229,7	113,2	45,1	15,5
		3	13,6	621,7	458,8	281,7	179,0	74,8	28,1
		Média	10,7	447,2	401,7	237,1	140,9	58,0	17,8
		Desv. pad.	2,6	151,3	63,9	41,4	34,1	15,2	9,4

Para os resultados obtidos pela determinação da densidade celular, o efeito da substância variou entre os tratamentos, em relação ao controle. Após 48 h de exposição, a densidade celular média na concentração de 100 mg/L de cromato de potássio foi maior em relação ao controle, e menor nas demais concentrações. Após 72 h de exposição, houve um maior crescimento em todas as concentrações-teste, exceto na concentração de 400 mg/L, em que o crescimento foi menor. Após 96 h de exposição, houve uma redução da densidade celular, em relação ao controle, nas concentrações de 25 mg/L, 200 mg/L e 400 mg/L e um aumento nas concentrações de 50 mg/L e 100 mg/L.

Somente nos resultados obtidos pelo método de conteúdo de clorofila-a houve uma relação dose-resposta crescente, ou seja, quando a concentração de cromato de potássio aumentou, o conteúdo de clorofila-a da alga *D. tertiolecta* diminuiu, em relação ao controle.

Figura 17. Densidade celular média (cél/mL) de *Dunaliella tertiolecta* após 48 h, 72 h e 96 h de exposição ao cromato de potássio (mg/L) e conteúdo de conteúdo de clorofila-a após 96 h.

A partir dos resultados de densidade celular e conteúdo de clorofila-a foram calculadas as taxas de crescimento e a porcentagem de inibição, apresentados na Tabela 22.

Tabela 22. Taxas médias de crescimento (duplicações/dia) e inibição (%) de *Dunaliella tertiolecta* após 48 h, 72 h e 96 h de exposição ao cromato de potássio (mg/L), obtidas pela densidade celular e após 96 h pelo conteúdo de clorofila-a.

Cromato de potássio (mg/L)	Ensaio	Contagem celular				Conteúdo de Clorofila-a			
		48 h		72 h		96 h		96 h	
		Taxa de crescimento (dupl./dia)	Inibição (%)	Taxa de crescimento (dupl./dia)	Inibição (%)	Taxa de crescimento (dupl./dia)	Inibição (%)	Taxa de crescimento (dupl./dia)	Inibição (%)
Controle	1	1,02	-	0,98	-	0,54	-	1,32	-
	2	0,00	-	0,83	-	0,67	-	1,29	-
	3	0,74	-	0,54	-	0,60	-	1,36	-
	Média	0,6	-	0,8	-	0,6	-	1,3	-
	Desv. pad.	0,5	-	0,2	-	0,1	-	0,0	-
25	1	0,49	52	1,56	-60	0,68	-26	1,30	2
	2	0,01	100	0,46	44	0,58	14	1,34	-3
	3	0,00	100	0,37	100	0,71	-17	1,26	8
	Média	0,2	83,9	0,8	28,0	0,7	-9,7	1,3	2,1
	Desv. pad.	0,3	27,9	0,7	81,1	0,1	20,7	0,0	5,6
50	1	0,47	54	1,30	-32	0,93	-71	1,12	16
	2	0,33	100	0,57	31	0,72	-7	1,13	13
	3	0,00	-	0,31	100	0,67	-12	1,07	22
	Média	0,3	77,2	0,7	32,8	0,8	-29,9	1,1	16,8
	Desv. pad.	0,2	32,3	0,5	66,2	0,1	35,8	0,0	4,5
100	1	1,12	-9	1,95	-99	0,75	-38	0,96	27
	2	0,30	100	0,52	37	0,71	-5	0,87	33
	3	0,37	100	0,86	-	0,40	33	0,92	33
	Média	0,6	63,5	1,1	-31,0	0,6	-3,5	0,9	31,0
	Desv. pad.	0,5	63,2	0,7	96,8	0,2	35,5	0,0	3,1
200	1	0,57	44	1,44	-47	1,01	-85	0,65	51
	2	0,15	100	0,52	37	0,61	10	0,54	58
	3	0,13	100	1,10	-	0,48	20	0,60	56
	Média	0,3	81,5	1,0	-5,3	0,7	-18,6	0,6	55,1
	Desv. pad.	0,2	32,1	0,5	59,3	0,3	58,1	0,1	3,5
400	1	0,47	54	0,60	39	0,20	64	0,00	100
	2	0,16	100	0,48	43	0,14	80	0,16	88
	3	0,08	100	0,00	100	0,00	100	0,23	83
	Média	0,2	84,8	0,4	60,4	0,1	81,1	0,1	90,2
	Desv. pad.	0,2	26,3	0,3	34,4	0,1	18,2	0,1	8,7

* Valores negativos significam estímulo

A taxa média de crescimento celular no controle variou de 0,6 duplicação/dia a 0,8 duplicação/dia entre os períodos de exposição. A taxa de incremento de clorofila-a foi de 1,3 Cl-a/dia no grupo controle. Após o período de 48 h, a taxa de crescimento celular foi menor em todas as concentrações de cromato de potássio, em relação ao controle. Após 72 h de exposição aumentou em todas as concentrações e após 96 h de exposição voltou a reduzir (Figura 18).

A correlação entre as taxas de crescimento de *D. tertiolecta* e as concentrações-teste obtida após 96 h de exposição apresentou maior coeficiente, tanto pelo método de determinação da densidade celular quanto pelo conteúdo de clorofila-a ($r = -0,82$ e $r = -0,99$, respectivamente).

Figura 18. Taxa média de crescimento (duplicações/dia) de *Dunaliella tertiolecta* após 48 h, 72 h e 96 h de exposição ao cromato de potássio (mg/L), obtida pela densidade celular e taxa de incremento de clorofila-a após 96 h.

A porcentagem de inibição do crescimento da microalga, obtida pela densidade celular, não apresentou uma correlação significativa com a concentração de cromato de potássio, variou no período de 48 h. Para 72 h e 96 h, a substância tanto inibiu como estimulou o crescimento da microalga. A correlação das taxas de inibição com as concentrações de K_2CrO_4 , foi significativa ($r = 0,99$) para os resultados obtidos pelo método de conteúdo de clorofila-a (Figura 19).

Figura 19. Inibição média (%) de *Dunaliella tertiolecta* após 48 h, 72 h e 96 h de exposição ao cromato de potássio (mg/L) obtida pela densidade celular e após 96 h pelo conteúdo de clorofila-a.

A razão de clorofila-a por célula de *D. tertiolecta*, obtida após 96 h de exposição ao cromato de potássio está apresentada na Tabela 23.

Tabela 23. Razão de clorofila-a por célula (Pg Cl-a/cél) para *Dunaliella tertiolecta* após 96 h de exposição ao cromato de potássio (mg/L).

Ensaio	Início	Controle	Cromato de potássio (mg/L)				
			25	50	100	200	400
1	33,4	144,4	125,2	42,7	51,1	11,2	15,6
2	20,7	111,6	165,5	43,7	13,1	16,1	21,3
3	18,7	48,9	35,2	17,1	20,0	9,5	31,8
Média	24,3	101,6	108,6	34,5	28,1	12,2	22,9
Desv. pad.	8,0	48,5	66,7	15,1	20,3	3,4	8,2

A Correlação de Pearson entre a razão da clorofila-a por célula e as concentrações-teste foi negativa ($r = -0,657$). Como pode ser observado na Figura 20, a razão média de clorofila-a por célula diminuiu a partir da concentração de 50 mg/L de cromato de potássio.

Figura 20. Razão média de clorofila-a por célula (Pg Cl-a/cél) para *Dunaliella tertiolecta* após 96 h de exposição ao cromato de potássio (mg/L).

Nos ensaios com o cromato de potássio, o pH não variou mais que uma unidade e a salinidade se manteve dentro da faixa estabelecida, 36 ± 1 (Anexo 4).

A correlação das variáveis físicas e químicas ($p < 0,05$) está apresentada na Tabela 24.

Tabela 24. Correlação de Pearson (r) entre as variáveis físicas e químicas, pH, taxa de crescimento e concentração de cromato de potássio (mg/L), para $p < 0,05$.

Variável	Ensaio	Coeficiente	Taxa de crescimento				Concentração de K_2CrO_4			
			48 h	72 h	96 h	Cl-a	Início	48 h	72 h	96 h
pH	1	r	-0,3619	-0,5378	-0,4867	-0,9960	-0,6077	-0,4673	-0,2316	-0,5385
		p	0,4808	0,2710	0,3276	< 0,0001	0,2006	0,3501	0,6588	0,2702
	2	r	-0,3619	-0,5126	-0,9056	-0,9689	0,4299	0,3125	-0,5984	-0,9616
		p	0,4808	0,2984	0,0129	0,0014	0,3948	0,5464	0,2095	0,0022
	3	r	0,2775	-0,2584	-0,9177	-0,9765	-0,9818	-0,9351	-0,4629	-0,9847
		p	0,5945	0,6211	0,0099	0,0008	0,0005	0,0062	0,3552	0,0003

A taxa média de crescimento de *D. tertiolecta* apresentou uma correlação negativa com o pH, significativa somente no período de 96 h de exposição.

A correlação entre o pH e a concentração de cromato de potássio foram negativas, significativas apenas nos ensaios 2 para 96 h e ensaio 3, exceto para 72 h.

Salinidade não se modificou ao longo do experimento e, portanto, não possibilitou a correlação com a taxa de crescimento e com a concentração de cromato de potássio.

Os valores de Cl_{50} de cromato de potássio, calculadas para os três ensaios, estão apresentadas na Tabela 25.

Tabela 25. Concentrações de inibição (Cl_{50}) de *Dunaliella tertiolecta* após 48 h, 72 h e 96 h de exposição ao cromato de potássio (mg/L), obtida pela densidade celular e após 96 h pelo conteúdo de clorofila-a.

Ensaio	Contagem celular			Conteúdo de clorofila-a $Cl_{50}-Cl-a$
	$Cl_{50}-48h$	$Cl_{50}-72h$	$Cl_{50}-96h$	
Ensaio 1	293,8 (200,5-430,3)	nc	344,9 (17,6 - 374,5)	144,1 (129,3 - 160,6)
Ensaio 2	nc	nc	298,1 (284,8 - 312,1)	153,8 (134,4 - 176,0)
Ensaio 3	nc	nc	176,8 (163,2 - 191,6)	153,8 (130,6 - 181,1)
Média	-	-	273,3	150,6
Desvio Padrão	-	-	86,8	5,6
Coef. de Variaç. (%)	-	-	32	4

nc = valor não calculado

As Cl50 médias de cromato de potássio para *D. tertiolecta* foram Cl50-96 h = 273,3 (186,5-360,1) mg/L e Cl50-Cl-a = 150,6 (145,0-156,2) mg/L. Os coeficientes de variação entre os ensaios foram CV-96 h = 32 % e CV-Cl-a = 4 %, indicando uma boa repetibilidade dos resultados apenas para o método de conteúdo de clorofila-a.

A carta-controle preliminar é construída a partir de cinco valores, portanto não foi obtida para o cromato de potássio. Para os períodos de 48 h e 72 h as Cl50 não foram obtidas, pois os resultados dos ensaios apresentaram inibições de crescimento de *D. tertiolecta* semelhantes em todas as concentrações-teste de cromato de potássio, não permitindo o cálculo adequado.

De acordo com o coeficiente de variação obtido entre os ensaios com a microalga, após 96 h de exposição ao cromato de potássio, o método de determinação da densidade celular não apresentou uma boa repetibilidade, CV = 32 %. A *Environment Canada* (1990) recomenda que esse valor seja inferior a 30 %. Já para os resultados obtidos pelo método de conteúdo de clorofila-a os resultados apresentaram uma boa repetibilidade, CV = 4 %.

A comparação entre o método de determinação da densidade celular e o conteúdo de clorofila-a não mostrou diferença significativa ($p = 0,42$) pelo Teste-t para $p < 0,05$, indicando que os dois métodos podem ser utilizados para o cromato de potássio.

As maiores concentrações que não causaram efeito (CENO) e as menores concentrações que causaram efeito (CEO) no crescimento de *D. tertiolecta* exposta a diversas concentrações de cromato de potássio, por ensaio, estão apresentadas na Tabela 26. Todos os resultados passaram no teste de normalidade e homocedasticidade e foram analisados pelo teste Dunnett.

Tabela 26. Concentração de efeito não observado (CENO) e concentração de efeito observado (CEO) para *Dunaliella tertiolecta* após 48 h, 72 h e 96 h de exposição ao cromato de potássio (mg/L), obtidas pela densidade celular e após 96 h pelo conteúdo de clorofila-a.

Ensaio	Contagem celular				Conteúdo de clorofila-a			
	48 h		72 h		96 h		96 h	
	CENO	CEO	CENO	CEO	CENO	CEO	CENO	CEO
1	<25	25	<25	25	<25	25	25	50
2	<25	25	<25	25	<25	25	25	50
3	<25	25	<25	25	200	400	25	50

Para os resultados obtidos pela densidade celular, a primeira concentração-teste para *D. tertiolecta* exposta ao cromato de potássio, 25 mg/L, já causou um efeito no crescimento da microalga após os períodos de 48 h, 72 h e 96 h, exceto no ensaio 3 para 96 h, em que a CEO para este último período foi de 400 mg/L de K_2CrO_4 . Para se obter o valor exato da CENO para estes períodos, são necessárias concentrações menores que 25 mg/L.

Já pelo método de conteúdo de clorofila-a, a CEO foi de 50 mg/L e a CENO foi de 25 mg/L de cromato de potássio, nos três ensaios realizados.

4.4.4. Sulfato de zinco

4.4.4.1. Ensaio preliminar

Os resultados do ensaio ecotoxicológico preliminar para o crescimento de *D. tertiolecta* após 48 h, 72 h e 96 h de exposição ao sulfato de zinco, obtidos pela densidade celular, estão apresentados na Tabela 27.

Tabela 27. Crescimento duplicações/dia) e inibição (%) de *Dunaliella tertiolecta* após 48 h, 72 h e 96 h de exposição ao sulfato de zinco (mg/L), obtidos pela densidade celular (cél/mL).

ZnSO ₄ (mg/L)	Contagem celular								
	48 h			72 h			96 h		
	Densidade (cél/mL)	Taxa de crescim. (dupl./dia)	Inibição (%)	Densidade (cél/mL)	Taxa de crescim. (dupl./dia)	Inibição (%)	Densidade (cél/mL)	Taxa de crescim. (dupl./dia)	Inibição (%)
N° inicial	2813	-	-	2813	-	-	2813	-	-
Controle	0	0,00	-	53906	1,44	-	48438	1,05	-
0,4	0	0,00	-	121563	1,82	-26	128438	1,39	-32
0,8	0	0,00	-	135938	1,87	-30	223438	1,58	-51
1,6	0	0,00	-	101563	1,74	-20	44688	1,02	3
3,1	0	0,00	-	129688	1,85	-28	135938	1,41	-34
6,3	0	0,00	-	86563	1,66	-1	107813	1,32	-27
12,5	0	0,00	-	82813	1,64	-14	30313	0,89	15
25	0	0,00	-	65000	1,53	-6	13438	0,63	40
50	4063	0,64	-	59063	1,49	-3	8750	0,51	51
100	1250	0,27	-	14688	0,88	39	4375	0,34	68
200	1875	0,37	-	7344	0,62	57	0	0,00	100

* Valores negativos significam estímulo ao crescimento.

A densidade celular de *D. tertiolecta* no grupo controle, em relação ao inóculo, não aumentou após 48 h. Após 72 h, a densidade celular aumentou 19 vezes e após 96 h 17 vezes, em relação ao inóculo.

Em relação ao grupo controle, a microalga apresentou taxa de crescimento e densidade celular maiores em concentrações mais baixas, de 0,4 mg/L a 50 mg/L de sulfato de zinco, indicando um estímulo ao seu crescimento. Em concentrações mais altas da substância, 100 mg/L e 200 mg/L, houve inibição e a taxa de crescimento e consequentemente a densidade celular, foram menores.

Em altas concentrações, o sulfato de zinco precipitou após os períodos de exposição, mesmo com as agitações diárias e não foi utilizado nos ensaios definitivos.

Além de dificultar a contagem das células, a ocorrência da precipitação pode não ter disponibilizado totalmente o composto, gerando erros na interpretação dos resultados.

4.4.5. Sulfato de cobre

4.4.5.1. Ensaio preliminar

Os resultados dos ensaios preliminares para o crescimento de *D. tertiolecta* após 48 h, 72 h e 96 h de exposição ao sulfato de cobre foram obtidos pela densidade celular e estão apresentados na Tabela 28.

Tabela 28. Taxa de crescimento (duplicações/dia) e inibição (%) de *Dunaliella tertiolecta* após 48 h, 72 h e 96 h de exposição ao sulfato de cobre (mg/L), obtidas pela densidade celular.

CuSO ₄ (mg/L)	Contagem celular								
	48 h			72 h			96 h		
	Densidade (cél/mL)	Taxa de crescim. (dupl./dia)	Inibição (%)	Densidade (cél/mL)	Taxa de crescim. (dupl./dia)	Inibição (%)	Densidade (cél/mL)	Taxa de crescim. (dupl./dia)	Inibição (%)
N° inicial	2813	-	-	2813	-	-	2813	-	-
Controle	0	0,00	-	53906	1,44	-	48438	1,05	-
0,4	0	0,00	-	137500	1,88	-30	190938	1,53	-46
0,8	0	0,00	-	164063	1,96	-36	280938	1,66	-59
1,6	0	0,00	-	157188	1,94	-35	349688	1,74	-66
3,1	0	0,00	-	11250	0,77	46	334688	1,73	-65
6,3	0	0,00	-	8125	0,65	55	117188	1,35	-29
12,5	8594	1,01	-	28750	1,16	20	190938	1,53	-46
25	26406	1,69	-	46563	1,38	5	138438	1,41	-35
50	27344	1,71	-	53438	1,44	0	68438	1,17	-11
100	1250	0,27	-	18438	0,97	33	118438	1,36	-30

* Valores negativos significam estímulo ao crescimento.

Após 48 h de exposição, a densidade celular de *D. tertiolecta* no controle não aumentou em relação ao inóculo, não permitindo o cálculo da porcentagem de inibição do crescimento celular entre os tratamentos. Entretanto pode ser observado um crescimento celular nas concentrações de 12, 5 mg/L, 25 mg/L, 50 mg/L e 100 mg/L de sulfato de cobre.

Após 72 h de exposição, as concentrações de 0,8 mg/L, 1,6 mg/L e 3,1 mg/L da substância apresentaram um estímulo ao crescimento celular enquanto as demais concentrações-teste causaram inibição. Após 96 h de exposição, todas as concentrações-teste estimularam o crescimento celular.

O sulfato de cobre também precipitou e não foram utilizados ensaios definitivos.

Como dito anteriormente, a ocorrência da precipitação pode gerar erros na interpretação dos resultados, tanto por dificultar a contagem das células como por não disponibilizar totalmente o composto.

5. DISCUSSÃO

Ensaio ecotoxicológicos com organismos aquáticos têm sido mundialmente utilizados como instrumento analítico para avaliação de toxicidade aguda e crônica de substâncias químicas, efluentes líquidos industriais e domésticos, lixiviados de resíduos sólidos e águas continentais e marinhas.

Como em qualquer outro método de análise, os ensaios de toxicidade também apresentam variabilidade nos resultados obtidos. A variabilidade destes ensaios pode ser atribuída, dentre outros fatores, à habilidade dos técnicos na execução dos ensaios, a possíveis variações das condições abióticas mantidas durante o período de exposição (temperatura, oxigênio dissolvido, pH, qualidade da água, etc.) e à variabilidade intrínseca da sensibilidade do lote de organismos-teste utilizados em cada ensaio.

Substâncias de referência, como já mencionado, são utilizadas para avaliar as condições de “saúde” / sensibilidade dos organismos-teste, sejam eles oriundos do campo ou cultivados em laboratório. Estas substâncias são utilizadas com o objetivo de definir condições essenciais de ensaio para cada espécie. Uma vez estabelecidas essas condições ótimas de ensaio, é possível se obter resultados comparáveis, isto é, que apresentem boa repetibilidade (Zagatto, 2006).

O termo repetibilidade de resultados é empregado para se designar a precisão analítica intralaboratorial, ou seja, variações dentro de um mesmo laboratório. Reprodutibilidade é designada para se avaliar a precisão e exatidão de resultados obtidos através de uma mesma metodologia porém, realizada por diferentes operadores.

Não é realístico esperar que uma simples resposta dos organismos a um único agente químico, no caso a substância de referência, possa demonstrar a “saúde” dos indivíduos. Seria ideal o uso de várias substâncias de referência para se avaliar a sensibilidade dos organismos-teste, o que se torna praticamente inviável devido ao aumento do custo e do tempo dispendido. Entretanto, a substância de referência escolhida, segundo critérios pré-estabelecidos, deve ser utilizada para avaliar, conjuntamente, as condições nas quais o ensaio foi realizado e a sensibilidade do lote de organismos utilizados nos ensaios (Environment Canada, 1990).

5.1. Curva de crescimento

A curva de crescimento de microalgas é característica para cada espécie e varia com a concentração de nutrientes, intensidade luminosa, entre outros fatores. Em geral, apresenta cinco fases distintas: fase de adaptação, fase de crescimento exponencial, fase de redução de crescimento, fase estacionária e fase de declínio (Lourenço, 2006).

Segundo o autor, Lourenço (*op. cit.*), na fase de adaptação, as células recém-transferidas (inóculo) para o meio de cultura fresco sofrem defasagem para iniciar o crescimento no novo ambiente. Na fase de crescimento exponencial, a taxa de crescimento torna-se maior e as células apresentam um melhor estado fisiológico. Essa fase pode durar alguns dias, dependendo principalmente da disponibilidade de nutrientes e luz. Na fase de crescimento estacionário a cultura atinge seu rendimento máximo, com crescimento menor e variável devido ao balanço entre as células que se duplicam e os indivíduos que morrem. No caso do gênero *Dunaliella*, esta fase pode durar meses, com células plenamente viáveis. A fase de declínio é marcada pela morte e lise de muitas células, o que torna a taxa de crescimento negativa.

Neste estudo, a curva de crescimento teve início já na fase exponencial. Segundo Lourenço (*op. cit.*), em condições de cultivo semelhantes, a fase de adaptação pode ser muito curta ou não ocorrer. Aidar *et al.* (2002) explicaram que a inoculação de células provenientes de um cultivo novo, quando os metabólitos intracelulares não estão em nível baixo, como é o caso da pré-cultura utilizada nos ensaios deste estudo, pode viabilizar a divisão celular imediata e contribuir para uma adaptação mais rápida às condições desejadas.

Neste trabalho, destacam-se os períodos de 48 h, 72 h e 96 h (2 dias, 3 dias e 4 dias, respectivamente), em que a taxa de crescimento e a densidade celular de *D. tertiolecta* aumentaram. A taxa de crescimento passou de 1,70 duplicações/dia para 1,80 duplicações/dia e 1,96 duplicações/dia em 48 h, 72 h e 96 h, respectivamente, totalizando uma densidade celular de

$1,0 \times 10^4$ cél/mL, após 48 h, $5,3 \times 10^4$ cél/mL após 72 h e $2,3 \times 10^5$ cél/mL após 96 h.

Levy *et al.* (2007) encontraram uma taxa de crescimento menor, de 1,4 duplicações/dia em um período de 72 h para a mesma espécie, cultivada em meio de cultura, temperatura e fotoperíodo semelhantes.

Nieves *et al.* (2005) encontraram uma densidade celular maior, $9,0 \times 10^5$ cél/mL ao final de 96 h, comparada à densidade obtida neste estudo. Embora seus resultados de crescimento de *D. tertiolecta* tenham sido obtidos com inóculo semelhante, as condições experimentais foram diferentes, temperatura maior (25 ± 1 °C), iluminação e agitação contínuas, em meio de cultura *Guillard "f"* – com o dobro da quantidade de nutrientes, enquanto que neste estudo os ensaios foram realizados com a temperatura de 20 ± 1 °C, fotoperíodo de 12 h/12 h e o meio *Guillard "f/2"*.

Fábregas *et al.* (1986), estudando diferentes quantidades de nutrientes observaram um crescimento máximo na fase exponencial de 0,61 duplicações/dia para *D. tertiolecta*, cerca de três vezes menos que o encontrado neste trabalho, após 96 h.

Um dos critérios de aceitabilidade dos ensaios ecotoxicológicos segundo Aidar *et al.* (2002) é que o aumento da densidade celular seja maior que 10 vezes o valor do inóculo ao final de 96 h. Como neste ensaio, a densidade celular de *D. tertiolecta* aumentou 300 vezes após 96 h, as condições utilizadas para a realização dos ensaios com *D. tertiolecta* foram adequadas.

5.2. Curva de salinidade

A salinidade ótima para o crescimento de *D. tertiolecta* é ligeiramente menor que a salinidade da água do mar, em torno de 0,5 M de NaCl, entretanto o gênero *Dunaliella*, em geral, suporta um amplo estresse osmótico (Cifuentes *et al.*, 2001; Donmez & Akzu, 2002; Fazeli *et al.*, 2006;).

Nos estudos de Jahnke & White (2003), *D. tertiolecta* foi a espécie do gênero que melhor tolerou salinidades baixas, 0,05 M de NaCl, e suportou também salinidades altas, 3 M de NaCl, mas com indícios de danos celulares.

Espécies halotolerantes crescem em baixas salinidades, 0,4 % a 4 % de NaCl, enquanto espécies halofílicas crescem melhor em salinidades de

6 % a 12 % de NaCl (Massjuk, 1973 *apud* Gonzáles *et al.*, 2009), entretanto, espécies como *D. tertiolecta* respondem diferentemente às várias salinidades (Gonzáles *et al.*, 2009).

No ensaio realizado com salinidades variando entre 0 e 45, houve crescimento de *D. tertiolecta* na maioria dos tratamentos, exceto nas salinidades de 0 e 25. Devido à grande variação no crescimento celular de *D. tertiolecta* nas salinidades recomendadas nos protocolos de ensaios ecotoxicológicos, 24 a 35, a salinidade de cultivo, 36 ± 1 (0,53 M de NaCl e 3,06 % de NaCl), foi mantida para os ensaios ecotoxicológicos.

Cifuentes *et al.* (2001) não observaram crescimento celular em salinidades 25 % e 30 % de NaCl e concluíram que culturas aclimatadas e não aclimatadas às condições do ensaio, mantidas em uma mesma salinidade, 15 % de NaCl, durante meses ou anos, apresentam uma taxa de crescimento padrão assim que transferidas para a salinidade experimental, de 1 % a 30 % de NaCl, demonstrando que essas algas não se adaptam a determinadas concentrações do sal, mas podem tolerar uma grande variação de salinidade.

Essa ampla tolerância à salinidade permite o cultivo de *D. tertiolecta* em diferentes salinidades e sua utilização em ensaios com amostras tanto de água doce, como estuarina e marinha, sem a necessidade de se ajustar a salinidade da amostra-teste.

5.3. Efeito algicida/algistático

Substâncias algistáticas inibem o crescimento de microalgas, impedindo que elas se desenvolvam durante o período de ação química enquanto substâncias algicidas inativam totalmente as células. Quando houve crescimento de *D. tertiolecta*, após exposição às substâncias de referência, a substância foi considerada algistática e quando não houve crescimento foi considerada algicida, conforme descrito na Norma ABNT NBR 12648 (2005).

Segundo Aidar *et al.* (1997), a recuperação do crescimento celular, após um período de adaptação, é esperada caso as células não sejam significativamente afetadas pela exposição à substância tóxica.

As culturas de *D. tertiolecta*, inibidas após 96 h de exposição ao dicromato de potássio, dodecil sulfato de sódio, cromato de potássio, sulfato de zinco e sulfato de cobre tornaram a crescer após sua transferência para o meio

de cultura fresco, caracterizando um efeito algistático para estas substâncias.

5.4. Ensaios ecotoxicológicos

5.4.1. Dicromato de potássio

O dicromato de potássio ($K_2Cr_2O_7$) é um sal inorgânico composto pelo metal cromo em seu estado hexavalente. Esse metal chega ao meio aquático principalmente por meio de efluentes ligados a produtos siderúrgicos, refinarias e mineradoras, indústrias de curtimento de couro e de cromagem, entre outras, que utilizam o cromo para dar cor, resistência à corrosão e um acabamento brilhante a seus produtos (Rodgher & Spíndola, 2008; Li *et al.*, 2009).

Em meio aquático, o cromo pode ser encontrado em nove estados de oxidação, sendo Cr^{6+} e Cr^{3+} as formas estáveis encontradas na natureza, da qual depende sua solubilidade e toxicidade para os organismos (Li *et al.*, *op. cit.*). O Cr^{3+} é um micronutriente para animais superiores (Mertz, 1993), entretanto, o Cr^{6+} é um forte oxidante, comprovadamente cancerígeno e cumulativo no ambiente (Peláez-Rodríguez *et al.*, 2000; Cervantes *et al.*, 2001), podendo interferir em reações metabólicas de organismos bentônicos e planctônicos da coluna d'água (Leland & Kuwabara, 1985).

Como pôde ser observado neste estudo, o crescimento de *D. tertiolecta* foi afetado pela presença de dicromato de potássio, com uma diminuição da velocidade de duplicação, de tal maneira que a porcentagem de inibição foi cada vez maior conforme aumentou a concentração da substância, até inibir totalmente o crescimento da microalga.

Mesmo com a redução da densidade celular e do conteúdo de clorofila-*a* de *D. tertiolecta* em diferentes concentrações da substância, a razão de clorofila-*a* por célula, em geral, foi 2,2 vezes maior, em relação ao controle, na presença do dicromato de potássio. Efeito oposto foi observado por Devilla (1999) quando expôs a microalga *Skeletonema costatum* a concentrações crescentes de outro metal, o chumbo, pois houve uma queda nos valores da razão clorofila-*a* por célula em relação ao seu grupo controle.

No presente trabalho, a razão média de clorofila-*a* por célula, 2,0 Pg Cl-*a*/cél, obtida para o grupo controle, foi maior que a encontrada por

Cifuentes *et al.* (2001), cujos valores variaram entre 0,47 Pg de Cl-a/cél a 1,73 Pg de Cl-a/cél para *D. tertiolecta* exposta a salinidades entre 10 e 300.

De acordo com o cálculo da concentração que causou efeito no crescimento de 50 % dos organismos em até 96 h de exposição e seus respectivos intervalos de confiança de 95 %, a sensibilidade da microalga marinha *D. tertiolecta* ao dicromato de potássio, estimada em Cl50-48h = 177,1 (0-355) mg/L, Cl50-72h = 129,8 (76,0-192) mg/L, Cl50-96h = 108,5 (98-119) mg/L e Cl50-Cl-a = 112,9 (90-133) mg/L, foi até duas ordens de magnitude maior que a encontrada para outros organismos, indicando que estes últimos são mais sensíveis ao dicromato de potássio.

Concentrações de 16,45 mg/L e 20,89 mg/L desta substância causaram efeito crônico (CE50) a ouriços do mar *Lytechinus variegatus*, após 24 h de exposição (Abessa *et al.*, 1998) e a mexilhões *Perna perna*, após 48 h de exposição (Zaroni, 2000), respectivamente. Para anfípodos *Tiburonella viscana* foi observado efeito agudo em uma concentração de 11,22 (mg/L de K₂Cr₂O₇, após 48 h de exposição (Abessa & Sousa, 2003).

Em comparação com outras espécies de microalgas, *D. tertiolecta* foi menos sensível, concentrações de 2,5 mg/L, 45 mg/L e 20,5 mg/L de dicromato de potássio causaram efeito em *Skeletonema costatum* (ISO, 1995), *Chaetoceros gracilis* (Fernandez & Orozco, 1998) e *Phaeodactylum tricornutum* (ISO, *op. cit.*), respectivamente.

Em seus estudos, Levy *et al.* (2007) atentam para a comparação de informações da literatura, devido às diferentes condições experimentais, meio de cultura utilizados, entre outros fatores, inclusive particularidades do organismo-teste.

Microalgas como *D. tertiolecta* podem adsorver e absorver o cromo e em presença de radiação luminosa e ainda reduzir o Cr⁶⁺ para Cr³⁺ e essa redução não só diminui sua toxicidade como também ajuda a precipitar o cromo em pH 8,1, tornando-o menos disponível na coluna d'água (Cervantes *et al.*, 2001; Donmez & Akzu, 2002; Li *et al.*, 2009).

Além disso, tem sido demonstrado que *D. tertiolecta* pode produzir substâncias extracelulares quelantes (González Dávila *et al.*, 1995), que podem diminuir a toxicidade de metais, assim como ocorre com o Na₂EDTA, utilizado na preparação de meios de cultura. Devilla (1999) observou que a adição de

Na₂EDTA ao meio de cultura elevou os valores médios da taxa de crescimento do grupo controle, entretanto reduziu a inibição nos tratamentos com chumbo, atenuando seu efeito tóxico. Substâncias quelantes podem afetar a disponibilidade de metais às algas alterando tanto a atividade do íon metálico como a concentração de espécies metálicas solúveis (Sunda, 1968).

O fato da *D. tertiolecta* reduzir a toxicidade de substâncias através da adsorção, absorção ou formação de quelato podem explicar os altos valores de CI₅₀ encontrados neste estudo.

5.4.2. Dodecil sulfato de sódio

O dodecil sulfato de sódio – DSS (C₁₂H₂₅SO₄Na) é um surfactante aniônico de cadeia linear. Compostos orgânicos com surfactantes como princípio ativo são capazes de reduzir a tensão superficial da água, facilitando seu contato com os objetos a serem limpos (Barbieri *et al.*, 2000).

Surfactantes estão presentes em detergentes, produtos de limpeza doméstica e de higiene pessoal (Lewis, 1990; Pavlic *et al.*, 2005), em concentrações que podem chegar a 15% da formulação (Resgalla Jr. & Laitano, 2002) e é amplamente utilizado na indústria, agricultura e rotina doméstica (Braga, 2002; Markina & Aizdaicher, 2005; Mariani, 2006), alcançando o ambiente marinho por descargas diretas e indiretas de esgoto (Aidar *et al.*, 1997).

Em grande quantidade, pode enfraquecer estruturas de proteção dos organismos, tornando-os vulneráveis, com a alteração da permeabilidade de sua membrana a nutrientes e substâncias químicas, devido à desnaturação de proteínas da parede celular (Lewis, 1990; Braga, 2002; Pavlic *et al.*, 2005).

Neste estudo, o surfactante dodecil sulfato de sódio, tido como uma das substâncias de referência para ensaios ecotoxicológicos, afetou o desenvolvimento de *D. tertiolecta*, tanto inibindo seu crescimento, em concentrações mais altas, como estimulando em concentrações mais baixas.

Lewis (1990) também observou que em baixas concentrações, o dodecil sulfato de sódio estimulou o crescimento de *D. tertiolecta*. Isto porque detergentes, em baixas concentrações, podem ser consideradas substâncias

promotoras de crescimento ou estimulantes de produção fitoplanctônica, tanto em laboratório como em campo (Aidar *et al.*, 1997).

Em seus estudos, Mastroti (1997) também descreve curvas bifásicas de dose-resposta para embriões de ouriço-do-mar, uma vez que houve uma variação no desenvolvimento de *L. variegatus* exposto ao DSS em concentrações menores e um decaimento súbito até a inibição total em concentrações maiores, indicando que o modo de ação do DSS, a partir de certa concentração, ocorre de abruptamente e não gradualmente. Esse mesmo efeito ocorreu para outro surfactante, o LAS (alquilbenzeno sulfonato de sódio linear).

Este efeito que ocorre quando doses mais baixas de uma substância produzem um efeito positivo, como o estímulo ao crescimento e doses altas resultam em efeitos negativos, como a inibição do crescimento, pode ser definido como Hormesis (Chapman, 2001).

Romanelli (2004) relacionou o fato com o estresse sofrido pelos organismos expostos a concentrações mais baixas do surfactante, que podem ter reagido ao estresse de forma a aumentar o número da sua prole. Em concentrações mais altas, o efeito tóxico foi maior, impedindo este tipo de comportamento.

Os resultados obtidos para *D. tertiolecta* exposta ao DSS, $Cl_{50-48\text{ h}} = 0,97$ (0-1,97) mg/L, $Cl_{50-72\text{ h}} = 1,25$ (0,65-1,85) mg/L e $Cl_{50-96\text{ h}} = 1,18$ (0,38-1,98) mg/L, foram valores próximos aos obtidos para outras espécies consideradas sensíveis, quando utilizada a fase embriolarval.

Para mexilhões *Perna perna*, Zaroni (2000) encontrou uma $CE_{50-48\text{ h}} = 1,3$ (1,2-1,4) mg/L de DSS, para ouriços-do-mar *Lytechinus variegatus*, Mastroti encontrou uma $CE_{50-24\text{ h}} = 1,89$ (1,83-1,97) mg/L e Rachid (1996) encontrou uma $CE_{50-24\text{ h}} = 2,07$ (1,87-2,29) mg/L de DSS.

Entretanto, neste estudo, a microalga *D. tertiolecta* foi mais sensível ao DSS, $Cl_{50-48\text{ h}} = 0,97$ (0-1,97) mg/L, quando comparada com outros organismos como o crustáceo *Artemia* sp, $CL_{50-48\text{ h}} = 22,05$ (14,25-29,85) mg/L (Prósperi, 1993) e o anfípodo *Tiburonella viscana*, $CL_{50-48\text{ h}} = 3,41$ (2,87-4,04) mg/L (Melo, 1993).

Mariani *et al.* (2006) encontraram uma $CL_{50-72\ h} = 4,8$ (3,6-6,0) mg/L de DSS para *Dunaliella tertiolecta*, quase quatro vezes maior que a encontrada neste estudo, $CL_{50-72\ h} = 1,25$ (0,65-1,85) mg/L. Para outros organismos a autora também observou uma sensibilidade menor, encontrou uma $CL_{50-15'} = 2,36$ (0,61-4,14) mg/L para a bactéria *Vibrio fischeri*, $CL_{50-24\ h} = 7,42$ (5,96-8,88) mg/L para o copépoda *Tirgriopus fulvus* e $CL_{50-96\ h} = 7,34$ (6,49-8,28) mg/L para o peixe *Dicentrarchus labrax*, assim como Nipper *et al.* (1993), que encontraram uma $CL_{50-48\ h} = 2,6$ mg/L para o crustáceo *Acartia lillgeborgi* e $CL_{50-48\ h} = 3,0$ mg/L para o copépoda *Temora stylifera*.

Comparada a outras microalgas, *D. tertiolecta*, $CL_{50-96\ h} = 1,18$ (0,38-1,98) mg/L de DSS, foi mais sensível. Pereira *et al.* (2010) encontraram uma $CL_{50-96\ h} = 16,38$ (8,56-24,19) mg/L para *Skeletonema costatum* e uma $CL_{50-96\ h} = 27,41$ (18,52-36,31) mg/L para *Tetraselmis chuii*.

De acordo com Lewis (1990), algas são mais sensíveis que invertebrados e peixes para vários tipos de detergentes surfactantes, efluentes têxteis, tintas, combustíveis sintéticos, herbicidas e uma variedade de compostos fitotóxicos e a toxicidade de diversos surfactantes a certas espécies de algas pode diferir em quatro ordens de magnitude. Neste estudo, *D. tertiolecta* foi, em média, uma ordem de magnitude mais sensível que outras algas e organismos adultos.

Todas as espécies citadas mostraram uma resposta similar após exposição ao DSS, sugerindo que este composto pode exercer um impacto em toda a cadeia trófica marinha, além da descarga contínua de DSS no ambiente marinho ser mais preocupante, pois pode causar efeitos crônicos em organismos marinhos (Mariani *et al.*, 2006).

5.4.3. Cromato de potássio

Assim como o dicromato de potássio, o cromato de potássio é um sal composto pelo elemento cromo. Em solução aquosa, o cromato é uma espécie química que predomina em pH alcalino, 8, típico da água do mar (Dalcin, 2009).

Em soluções com pH maior que 7,0, como é o caso de ensaios com água do mar, a *Environment Canada* (1990) recomenda o uso de cromato de potássio ao invés de dicromato de potássio. Em soluções básicas, o K_2CrO_4 se dissocia e predomina a espécie química com menor absorção pelos organismos, reduzindo sua toxicidade (Donmez & Aksu, 2002).

Os ensaios com *D. tertiolecta* exposta ao cromato de potássio demonstram que a substância afetou seu crescimento, embora os resultados obtidos pela determinação da densidade celular não tenham sido tão consistentes quanto os resultados obtidos para dicromato de potássio e DSS.

Não houve uma relação direta de dose-resposta entre a taxa de crescimento e a concentração do cromato de potássio.

Para o método de conteúdo de clorofila-a houve uma correlação significativa entre a concentração de cromato de potássio e a porcentagem de inibição da taxa de incremento de clorofila-a.

O coeficiente de variação indicou uma boa repetibilidade dos ensaios. Contudo, a toxicidade de cromato de potássio, $Cl_{50-96h} = 150,6$ mg/L para *D. tertiolecta* foi menor, comparada ao dicromato de potássio, $Cl_{50-96h} = 113,0$ mg/L.

Jop *et al.* (1987) estudaram duas espécies de crustáceos e quatro de peixes encontraram diferença significativa entre os resultados obtidos para dicromato de potássio e cromato de potássio apenas para os peixes. O cromato de potássio apresentou ainda a vantagem de não influenciar o pH da solução.

5.4.4. Sulfato de zinco

O sulfato de zinco ($ZnSO_4$) é um sal composto por zinco, um metal utilizado em indústrias de galvanização e de fabricação de telhas, calhas, tintas e pilhas (Semmler, 2007). É um elemento essencial aos organismos, embora certas quantidades possam alterar processos fisiológicos da cadeia respiratória (Buratini & Brandelli, 2006).

O sulfato de zinco utilizado nos ensaios ecotoxicológicos preliminares com *D. tertiolecta* estimulou o seu crescimento em pequenas concentrações. Em concentrações maiores, houve inibição do crescimento da microalga, entretanto, foi observada uma precipitação do sal nas soluções-teste.

Essa precipitação ocorre geralmente pela presença de íons cálcio e magnésio, componentes naturais da água do mar, e outros ligantes, como agentes quelantes, particularmente em pH maior que 6,0, afetando sua solubilidade, portanto, sua disponibilidade e toxicidade aos organismos (Leland & Kuwabara, 1985; *Environment Canada*, 1990).

Pelo exposto acima, não foram realizados ensaios definitivos com a substância de referência sulfato de zinco e a microalga.

5.4.5. Sulfato de cobre

O sulfato de cobre (CuSO_4) é um sal que contém cobre, um metal essencial na cadeia respiratória dos organismos, embora uma concentração de 1 $\mu\text{g/L}$ possa desencadear respostas tóxicas sobre as membranas celulares e interferência na formação de lisossomos (Rand & Petrocelli, 1985; Levy *et al.*, 2007).

A utilização desse metal está ligada a atividades de mineração e fundição além de ser amplamente utilizado em produtos fungicidas, bactericidas, algicidas, fertilizantes e tintas antiincrustantes (Zagatto, 2006).

O cobre é uma substância de referência recomendada para ensaios crônicos que avaliam o crescimento, como é o caso de ensaios ecotoxicológicos com algas, mas os resultados variam muito quando a água do mar natural é utilizada como água de diluição no preparo das soluções-teste (*Environment Canada*, 1990). A variação da densidade celular presente estudo, foi constatada independentemente do tempo de exposição.

Em água marinha natural o íon cobre é altamente reativo, formando complexos e precipitando com componentes orgânicos e inorgânicos, como carbonatos, fosfatos, aminoácidos, sólidos suspensos, substâncias húmicas etc USEPA (1980).

Devido à sua precipitação na solução-teste, o sulfato de zinco também não foi utilizado no presente estudo, pelos mesmos motivos apontados para a substância de referência sulfato de zinco.

5.5. Comparação entre os períodos de exposição

Eberius *et al.* (2002) observaram que quanto mais longo o período de exposição, menor o valor de CE50, ou seja, a sensibilidade do organismo à substância tóxica aumentou com o tempo.

Neste estudo, *D. tertiolecta* foi submetida a três períodos de exposição para cada uma das três substâncias de referência e apresentou esse mesmo padrão de efeito ao $K_2Cr_2O_7$. Quando exposta ao DSS, as CI50 variaram entre os períodos de exposição, seguindo uma ordem crescente após 72 h, 96 h e 48 h de exposição. Para o cromato de potássio, não foram obtidos os valores de CI50 para 48 h e 72 h, e os períodos não foram comparados.

Comparando-se os coeficientes de variação entre os ensaios com cada substância, foi observada a mesma relação obtida para CI50. Além disso, verificou-se que quanto maior o período de exposição, maior a precisão dos resultados e, conseqüentemente, menor a repetibilidade entre os ensaios.

5.6. Comparação entre os métodos

No presente estudo, a densidade celular e o conteúdo de clorofila-a foram utilizados para a quantificação do crescimento de *D. tertiolecta* por meio de sua biomassa final. Debelius *et al.* (2008) demonstraram que o cálculo da CI50 pela biomassa apresenta uma menor variação. Entretanto os resultados de biomassa obtidos neste estudo, foram transformados em taxa de crescimento celular e de incremento de clorofila-a, e minimizou a diferença entre as réplicas e possibilitando a comparação dos tratamentos com o grupo controle.

A determinação da densidade celular, além de consumir um tempo considerável, tem a precisão proporcional ao número de células contadas, ou seja, decai com densidades menores (ASTM E1218, 1992), como é o caso da avaliação da densidade celular no inóculo e nas concentrações-teste que causaram maior inibição do crescimento.

Eberius *et al.* (2002) sugerem que, no caso do inóculo, mesmo podendo contar o número inicial de células, seja considerado o valor teórico do inóculo, visando minimizar o erro de contagem. Entretanto, neste estudo o número inicial de células foi contado e utilizado nos cálculos.

Para Lourenço (2006), os resultados obtidos por espectrofotometria não são muito precisos, mas são bastante úteis e práticos, permitindo que o pesquisador obtenha informações bem representativas do estado ou condição pigmentar das amostras.

Métodos padronizados podem ser utilizados por diferentes laboratórios, permitindo que os resultados obtidos sejam comparados entre si, mas as respostas a contaminantes variam, dependendo da espécie, concentração testada etc (Romaneli, 2004).

É importante que se conheça a precisão analítica destes ensaios, de modo a avaliar a variabilidade dos resultados obtidos, evidenciando desta forma a confiabilidade dos métodos utilizados (Zagatto, 2006).

Independentemente do método utilizado, os resultados podem ser expressos como concentração de inibição (CI), concentração de efeito não observado (CENO) e concentração de efeito observado (CEO) (Lewis, 1990; ISO, 1995; ABNT NBR 12648, 2005). De acordo com Aida *et al.* (2002), esses valores dão uma boa indicação do dano potencial que esses produtos químicos podem causar no ambiente natural.

As CI₅₀ obtidas para *Dunaliella tertiolecta* pela determinação da densidade celular e do conteúdo de clorofila-a para um mesmo período, 96 h de exposição, foram comparadas e não apresentaram diferença significativa entre os métodos para todas as substâncias testadas.

Uma vez que muitos resultados das CENO e CEO não foram obtidos entre as concentrações testadas, houve dificuldade de se fazer comparações, sendo necessários outros ensaios. Esses valores não dependem somente da toxicidade da substância, mas também das diluições definidas para o ensaio (Chapman, 1995).

5.7. Comparação entre as substâncias de referência

Entre as características desejáveis para uma boa substância de referência está a baixa variabilidade entre os ensaios, meia vida longa e estável, boa curva de concentração-resposta para o organismo, estabilidade em solução aquosa e baixo risco a saúde humana (Environmental Canada, 1990; Rand, 1995).

Neste contexto, podemos inferir que entre as substâncias de referência

testadas no presente estudo, aquela que melhor se encaixa neste perfil, embora apresente alto risco à saúde humana e ambiental, é o dicromato de potássio.

Embora o dicromato de potássio tenha apresentado maior precisão entre os resultados, metais pesados como o cromo, merecem interesse especial devido à ação residual (baixa biodegradabilidade) e principalmente seu efeito cumulativo na cadeia trófica (Peláez-Rodríguez *et al.*, 2000).

Comparando-se os resultados obtidos por outros autores, a Cl₅₀ para dicromato de potássio foi muito alta, indicando uma baixa toxicidade para *D. tertiolecta*. Entretanto o coeficiente de variação entre os ensaios realizados com esta substância de referência, em geral, foi menor, quando comparada ao DSS. Em contrapartida, a sensibilidade de *D. tertiolecta* ao surfactante foi 100 vezes maior.

O DSS possui ação rápida, não seletiva, baixa toxicidade para o homem e age dentro de uma faixa mais estreita de concentrações, entretanto possui uma alta taxa de degradação (Environment Canada, 1990) e neste estudo apresentou alta variabilidade dos resultados. Os surfactantes possuem a propriedade comum de baixar a tensão superficial dos líquidos, inibir as trocas gasosas entre a camada de ar e de água e introduzir nutrientes na água, podendo acelerar o processo de eutrofização (Rocha *et al.*, 1985).

Substâncias de referência têm sido utilizadas para comparação de resultados obtidos em diferentes laboratórios e para verificação da reprodutibilidade dos ensaios em um mesmo laboratório, apontando possíveis variações de condições abióticas, sensibilidade do lote de organismos utilizados e habilidade técnica na execução dos ensaios ecotoxicológicos (ZAGATTO, 2006).

Entretanto, a comparação dos resultados encontrados na literatura nem sempre foi possível, devido a diferenças de condições de ensaio, tais como tempo de exposição à substância, espécie utilizada e o tipo de resposta obtida. Autores com essa dificuldade utilizaram substâncias de referência para comprovar a diferença de sensibilidade de microalgas e outras espécies de organismos marinhos (Resgalla Jr. & Laitano, 2002; Rodrigues *et al.*, 2003; Debelius *et al.*, 2008).

A USEPA (1989) recomenda que para cada organismo, deve ser

adotada a substância que apresenta maior efeito tóxico e menor variabilidade de resultado. Entretanto, é importante considerar o efeito tóxico de referência para o técnico que manipula a substância e o impacto de seu descarte no ambiente (Rodrigues *et al.*, 2003).

5.8. Utilização de *Dunaliella tertiolecta* em ensaios ecotoxicológicos

A microalga *D. tertiolecta* preenche os principais requisitos para seleção de organismos-teste. Entre os principais critérios para seleção de um organismo-teste está a sensibilidade relativamente constante a diversos agentes químicos; relevância ecológica e econômica; duração do ciclo de vida; e tolerância ao manuseio em laboratório e a fatores abióticos, como salinidade e pH (Domingues & Bertoletti, 2006).

No presente trabalho, *D. tertiolecta* foi sensível às substâncias de referência utilizadas, principalmente ao DSS. Entretanto o dicromato de potássio apresentou menor variabilidade dos resultados, apresentando uma boa repetibilidade e reprodutibilidade dos mesmos.

Microalgas do gênero *Dunaliella* têm suas exigências nutricionais amplamente descritas, pois são cultivadas em larga escala para produção de carotenoides, utilizados como corantes naturais; para alimentação humana, como suplementos ricos em proteínas e vitaminas (Richmuond, 2000; Donmez & Akzu, 2002); e para a produção de biodiesel (Tsukahara & Sawayama, 2005; Chen *et al.* 2011).]

São organismos que toleram condições extremas de temperatura, salinidade, pH e iluminação (Subba Rao, 2009) e possuem um ciclo de vida curto, envolvendo algumas gerações durante o tempo de duração do experimento, que permite a avaliação de efeitos sub-letais (Anastácio *et al.*, 2000) em diversas condições.

Em geral, informações sobre organismos marinhos são escassos (Garrido-Perez *et al.*, 2008). No Brasil, o número de espécies nativas utilizadas em ensaios ecotoxicológicos é reduzido (Zaroni, 2000) e a Norma Técnica existente, “Método de ensaio com algas (Chlorophyceae)”, é específica para microalgas de água doce (ABNT NBR 12648, 2005). Além disso, Chapman & Long (1983) recomendam a utilização de espécies nativas em ensaios ecotoxicológicos, pois fornecem informações mais fiéis sobre a

biodisponibilidade e efeito de compostos tóxicos nos organismos representativos do ecossistema em questão.

Neste contexto, os resultados obtidos neste estudo contribuem com informações sobre ensaios ecotoxicológicos com *D. tertiolecta* e indicam que, nestas condições, esta microalga pode ser utilizada como organismo-teste em ensaios ecotoxicológicos.

5.9. Considerações finais

Sabendo que o surfactante possui alta capacidade de degradação enquanto os compostos metálicos, utilizados no presente trabalho, apresentam um potencial carcinogênico e que o método de conteúdo de clorofila-*a* requer um número maior de reagentes, a seleção da substância de referência e do método devem ser consideradas, principalmente devido aos resíduos gerados e a periculosidade dos reagentes, visando à qualidade dos resultados e um menor impacto ao meio ambiente.

Neste caso, são necessárias menores quantidades do surfactante para o ensaio de sensibilidade e seu descarte causa um menor impacto ao meio ambiente e entre os métodos utilizados, a determinação da densidade celular requer volumes menores de soluções-teste e em consequência, reduz a quantidade de reagentes utilizados e descartados. Entretanto, os resultados obtidos para os sais de cromo e o método de conteúdo de clorofila-*a* foram mais precisos.

Visando a obtenção de mais informações sobre a sensibilidade de *Dunaliella tertiolecta* para o aprimoramento dos ensaios ecotoxicológicos com esta espécie, outros ensaios devem ser realizados.

6. CONCLUSÃO

Para as condições de ensaio descritas neste trabalho concluiu-se que:

- Ensaios ecotoxicológicos com *D. tertiolecta* e as substâncias de referência dicromato de potássio, dodecil sulfato de sódio e cromato de potássio resultaram em uma maior sensibilidade ao surfactante.
- As substâncias de referência sulfato de zinco e sulfato de cobre não foram adequadas para os ensaios ecotoxicológicos com *D. tertiolecta*, pois precipitaram durante o ensaio.
- Os maiores períodos de exposição, 72 h e 96 h, apresentaram menor variabilidade entre os resultados dos ensaios para todas as substâncias de referência utilizadas.
- Não houve diferença significativa entre os resultados obtidos pelos métodos de determinação da densidade celular e de conteúdo de clorofila-a para nenhuma das substâncias de referência.
- As substâncias de referência dicromato de potássio, dodecil sulfato de sódio, cromato de potássio, sulfato de zinco e sulfato de cobre apresentaram um efeito algistático e não algicida sobre o crescimento de *D. tertiolecta* após 96 h de exposição.
- De acordo com os resultados, a microalga marinha *D. tertiolecta* pode ser utilizada em ensaios ecotoxicológicos, nestas condições.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABESSA, D. M. S.; Zaroni, L.P.; Rachid, B.R.F. & Souza E.C.P.M., 1998. Sensibilidade de 4 organismos utilizados em testes de toxicidade ao dicromato de potássio e ao DSS. V Enc. Brasileiro de Ecotoxicologia. Itajaí, Santa Catarina. (Resumos), p.72.

ABESSA, D. M. S. & Sousa, E. C. P. M., 2003. Sensitivity of the amphipod *Tiburonella viscana* (Platyischnopidae) to $K_2Cr_2O_7$. Braz. Archiev. Biol. Technol., v. 46, p. 53-55.

ABNT – Associação Brasileira de Normas Técnicas, 2005. Ecotoxicologia aquática – Toxicidade crônica – Método de ensaio com algas (Chlorophyceae). NBR 12648, 24p.

AIDAR, E.; SOUSA, E. C. P. M. & BRASIL-LIMA, G. M. S., 2002. Testes de toxicidade com microalgas. In: Nascimento, I. A.; Sousa, E. C. P. M. & Nipper, M., (ed). Métodos em ecotoxicologia marinha. São Paulo: Ed. artes gráficas e indústria Ltda., p. 51-61.

AIDAR, E.; SIGAUD-KUTNER, T. C. S.; NISHIHARA, L.; SCHINKE, K. P.; BRAGA, M. C. C.; FARAH, R. E. & KUTNER, M. B. B., 1997. Marine phytoplankton assay: effects of detergents. Mar. Environ. Res., v. 43, p. 55-68.

ARAGÃO & ARAÚJO, 2006. Métodos de ensaio de toxicidade com organismos aquáticos. In: Zagatto, P. A. & Bertoletti, E., (ed). Ecotoxicologia aquática – Princípios e aplicações. São Carlos: Ed. RiMa, p. 117-152.

ASTM – American Society for testing and Materials, 1992. Standard guide for conducting static 96-h toxicity tests with microalgae. E1218-90, p. 874-885.

ASTM – American Society for testing and Materials, 1992. Standard practices for measurement of chlorophyll content of algae in surface waters. D3731-87, p. 28-31.

BADARÓ-PEDROSO, C.; Reynier, M. V. & Melo, S. L. R., 2002. Garantia de qualidade e precauções de segurança e saúde em laboratórios de Ecotoxicologia aquática. In: Nascimento, I. A.; Sousa, E. C. P. M. & Nipper, M., (ed). Métodos em ecotoxicologia marinha. São Paulo: Ed. artes gráficas e indústria Ltda., p.25-50.

BARBIERI, E.; Ngan, P. V. & Gomes, V., 2000. Efeito do LAS-C12 no metabolismo de rotina de tainhas em função da temperatura em três salinidades. In: Espíndola, E. L. G.; Botta-Paschoal, C. M. R.; Rocha, O.; Bohrer, M. B. C. & Oliveira-Neto, A. L., (ed). Ecotoxicologia – perspectivas para o século XXI. São Carlos: Ed. RiMa, p. 293 - 308.

BARTLETT, M. S., 1937. Some examples of statistical methods of research in agriculture and applied biology. J. Roy. Statisc. Soc. Suppl. V.4, p.137-170.

BERTOLETTI, E. & Zagatto, P. A., 2006. Aplicação dos ensaios ecotoxicológicos e legislação pertinente. In: Zagatto, P. A. & Bertoletti, E., (ed). Ecotoxicologia aquática – Princípios e aplicações. São Carlos: Ed. RiMa, p. 347-382.

BOROWITZKA, M. A. & BOROWITZKA, L. J., 1988. *Dunaliella*. In: Borowitzka, M. A. & Borowitzka, L. J., (ed.) Micro-algal Biotechnology. Cambridge: Cambridge University Press, p. 27-58.

BOROWITZKA, M. A. & SIVA, C. J., 2007. The taxonomy of the genus *Dunaliella* (Chlorophyta, Dunaliellales) with emphasis on the marine and halophilic species. J. Appl. Phycol., v. 19, p. 567-590.

BRAGA, E. S., 2002. Bioquímica marinha – efeitos da poluição nos processos bioquímicos. 2ª edição. São Paulo: FUNDESPA, 108 p.

BRASIL. Leis, decretos, etc., 2005. Resolução CONAMA 357, de 17/03/2005. Brasília/DF. Diário Oficial da União, nº 53, de 18 de março de 2005, p. 58-63.

BURATINI, S. V. & Brandelli, A., 2006. Bioacumulação. In: Zagatto, P. A. & Bertoletti, E., (ed). Ecotoxicologia aquática – Princípios e aplicações. São Carlos: Ed. RiMa, p. 55-88.

CERVANTES, C.; Campos-García, J.; Devars, S.; Gutiérrez-Corona, F.; Loza-Tavera, H.; Torres-Guzmán, J.C. & Moreno-Sánchez, R., 2001. Interactions of chromium with microorganisms and plants. FEMS Microbiol. Rev., v. 25, p. 335–347.

CHAPMAN, P. M., 1995. Ecotoxicology and pollution – key issues. Mar. Poll. Bull., v. 14, p. 81-84.

CHAPMAN, P. M., 2001. The implications of hormesis to ecotoxicology and ecological risk assessment. Hum. Exp. Toxicol., v. 20, p. 499-505.

CHAPMAN, P. M. & LONG, E., 1983. The use of bioassay as part of comprehensive approach to marine pollution assessment. Mar. Poll. Bull. v. 14, p. 91-84.

CHEMICAL OF THE WEEK: Chlorophyll. Estrutura da clorofila-a. Altura: 203 pixels. Largura: 528 pixels. Formato: Imagem GIF. Disponível em: <http://scifun.chem.wisc.edu/chemweek/chlrphyl/chlrphyl.html> (acesso em 08 de abril 2011).

CHEMICAL OF THE WEEK: Chlorophyll. Espectro de absorção da clorofila-a. Altura: 397 pixels. Largura: 570 pixels. Formato: Imagem GIF. Disponível em: <http://scifun.chem.wisc.edu/chemweek/chlrphyl/chlrphyl.html> (acesso em 08 de abril 2011).

CIFUENTES, A. S.; González, M. A.; Inostroza, I. & Aguilera, A., 2001. Reappraisal of physiological attributes of nine strains of *Dunaliella* (Chlorophyceae): growth and pigment content across a salinity gradient. J. Phycol., v. 37, p. 334-344.

DEBELIUS, B.; Forja, J. M.; Del Valls, A. & Lubián, L. M., 2008. Effect of linear alkylbenzene sulfonate (LAS) and antrazine on marine microalgae. *Mar. Poll. Bull.*, v. 57, p. 559-568.

DEVILLA, R. A., 1999. Efeito do chumbo sobre o crescimento e biomassa de *Skeletonema costatum* e *Cylindrotheca closterium* (Bacillariophyceae) em bioensaios de laboratório. Dissertação de mestrado. Fundação Universidade Federal do Rio Grande, Instituto de Oceanografia, 88 p.

DONMEZ, G & Aksu, Z., 2002. Removal of chromium (IV) from saline wastewaters by *Dunaliella* species. *Process Biochem.*, v. 38, p. 751-762.

DOMINGUES, D. F. & Bertoletti, E., 2006. Seleção, manutenção e cultivo de organismos aquáticos. In: Zagatto, P. A. & Bertoletti, E., (ed). *Ecotoxicologia aquática – Princípios e aplicações*. São Carlos: Ed. RiMa, p. 153-184.

DUNNETT, C. W., 1964. New table for multiple comparisons with a control. *Biometrics*, v. 20, 482 p.

EBERIUS, M.; Mennicken, G.; Reuter, I. & Vandenhirtz, J., 2002. Sensitivity of different growth inhibition tests – Just a question of mathematical calculation?. *Ecotoxicol.*, v. 11, p. 293-297.

ENVIRONMENT CANADA, 1990. Guidance document on control of toxicity test precision using reference toxicants. Report EPS 1/RM/12. 85 p.

FAZELI, M. R., Tofighi, H., Samadi, N. & Jamalifar, H., 2006. Effects of salinity on β -carotene production by *Dunaliella tertiolecta* DCCBC26 isolated from the Urmia salt lake, north Iran. *Biores. Technol.*, v. 97, p. 2453-2456.

FERNANDEZ, E. & Orozco R., 1998. Exposición de la microalga *Chaetoceros gracilis* a los metales pesados como el cadmio en condiciones de cultivo. V Enc. Brasileiro de Ecotoxicologia. Itajaí, Santa Catarina. (Resumos). p. 80.

FIELD, C.B.; Behrenfeld, M.J.; Randerson, J.T. & Falkowski, P. 1998. Primary Production of the Biosphere: Integrating Terrestrial and Oceanic Components. *Science*, v. 28, p. 237-240.

GARRIDO-PEREZ, M. C.; Perales-Vargas Machuca, J. A.; Nebot-Sanz, E. & Sales-Márquez, D., 2008. Effect of the test media and toxicity of LAS on the growth of *Isochrysis galbana*. *Ecotoxicology*, v. 17, p. 738–746.

GONZÁLES, M. A.; Gómez, P. I. & Polle, J. E. W., 2009. The algae *Dunaliella*: Biodiversity, Physiology , Genomics and Biotechnology. In: Ben-Amotz, A.; Polle, J. E. W. & Subba Rao, D. V., (ed). *Taxonomy and phylogeny of the genus Dunaliella*. New Hampshire: Science Publishers, p. 15-44.

GUILLARD, R. R. L., 1975. Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates. In: *Culture of marine invertebrates animals*. Smith, W. L. & Chanley, M. H., (ed.). New York: Plenum Publishing, p. 29-60.

HAMILTON, M. A.; Russo, R. C. & Thurston, R. V., 1977. Trimmed Spearman-Kärber method for estimating median lethal concentrations in toxicity bioassays. *Environ, Sci, Technol.*, v. 11, n. 7, p. 714 – 719.

ISO – International Standardization for Organization, 1995. Water quality – Marine algae growth inhibition test with *Skeletonema costatum* and *Phaeodactylum tricornutum*. ISO10253:1995 (E), 8 p.

JAHNKE, L. & White, A., 2003. Long-term hyposaline and hypersaline stresses produce distinct antioxidant responses in the marine alga *Dunaliella tertiolecta*. *J. Plant Physiol.*, v. 160, p. 1193-1202.

JOP, K. M.; Parkerton T. F.; Rodgers Jr., J. H.; Dickson K. L, & Dorn P. B., 1987. Comparative toxicity and speciation of two hexavalent chromium salts in acute toxicity tests. *Environ. Toxicol. Chem.*, v. 6, p. 697–703.

KRUSKAL, W. H. & Wallis, W. A., 1952. The use of ranks in one criterion analysis of variance. J. Amer. Stat. Assoc., v. 47, p. 583-621.

LELAND, H. V. & KUWABARA, J. S. 1985. Trace metals. In: RAND, G. M. & PETROCELLI, S. R., (ed). Fundamentals of aquatic toxicology – Methods and applications. Washington: Hemisphere publishing corporation, p. 374-415.

LEVY, J. L.; Stauber, J. L. & Jolley, D. F., 2007. Sensitivity of marine microalgae to copper: The effect of biotic factors on copper adsorption and toxicity. Sci. Total Environ., v. 387, p 141-154.

LEWIS, M. A., 1990. Chronic toxicities of surfactants and detergent builders to algae: a review and risk assessment. Ecotoxicol. Environ. Safety, v. 20, p. 123-140.

LI, S. X.; Zheng, F. Y.; Hong, H. S.; Deng, N. S. & Lin, L. X., 2009. Influence of marine phytoplankton, transition metals and sunlight on the species distribution of chromium in surface seawater. Mar. Environ. Res., v. 67, p. 199-206.

LIMA, G. M. S. S. B., 1998. Efeitos do efluente doméstico do emissário submarino de São Sebastião (SP), sobre o fitoplâncton marinho: estudos de campo e laboratório. Tese de doutorado. Universidade de São Paulo, Instituto Oceanográfico, 160 p.

LORENZEN, C. J. 1967. Determination of chlorophyll and phaeo-pigments: spectrophotometric equations. Limnol. Oceanogr., v. 12, p. 343-345.

LOURENÇO, S. O., 2006. Cultivo de microalgas marinhas - Princípios e aplicações. São Carlos: Ed. RiMa, 588 p.

MARIANI, L.; Pascale, D. D.; Faraponova, O.; Tornambè, A.; Sarni, A.; Giuliani, S.; Ruggiero, G.; Onorati, F.; Magaletti, E., 2006. The use of a test battery in marine ecotoxicology: The acute toxicity of sodium dodecyl sulfate. Environ. Toxicol., v. 21, p. 373-379.

MARKINA, Z. V. & Aizdaicher, N. A., 2005. *Dunaliella salina* (Chlorophyta) as a test-object for assessment of detergent pollution of a marine environment. Russ. J. Mar. Biol., v. 31, p. 232–237.

MASTROTI, R., 1997. Toxicidade e Biodegradabilidade de tensoativos aniônicos em água do mar. Dissertação de mestrado. Universidade de São Paulo, Instituto oceanográfico, 112 p.

MELO, S. L. R., 1993. Testes de toxicidade com sedimentos marinhos: adequação de metodologia pra o anfípodo escavador *Tiburonella viscana*. Dissertação de mestrado. Universidade de São Paulo, Escola de Engenharia de São Carlos, 172 p.

MERTZ, W., 1993. Cromium in human nutrition: a review. Am. Inst. Nut., p. 626-633.

NIEVES, M.; Voltolina, D. & Piña, P., 2005, Growth and biomass production of *Tetraselmis suecica* and *Dunaliella tertiolecta* in a standard medium added with three products of zeolitic nature. Aquacult. Eng., v. 32, p. 403-410.

NIPPER, M.G.; Prósperi, V. P. & A. J. Zamboni. 1993. Toxicity testing with coastal species of southeastern Brazil. Echinoderm sperm and embryos. Bull. Environ. Contam. Toxicol., v. 50, p. 646-652.

NYHOLM, N., 1985. Response variable in algal growth inhibition testes – biomass or growth rate?. Water Res., v. 19, p. 273-279.

OECD – Organization for Economic Co-operation and Development, 2001. Alga, growth inhibition test. In: Guideline for testing of chemicals. Test 201, 21 p.

PARRISH, P. R., 1985. Acute Toxicity tests. In: Rand, G. M. & Petrocelli, S. R. (ed). Fundamentals of aquatic toxicology - methods and applications. New York: Hemisphere publishing corporation, p. 31-57.

PAVLIC, Z.; CIFREK, Z. V. & PUNTARIC, D., 2005. Toxicity of surfactants to green microalgae *Pseudokirchneriella subcapitata* and *Scenedesmus subspicatus* and to marine diatoms *Phaeodactylum tricornutum* and *Skeletonema costatum*. *Chemosphere*, v. 60, p. 1061-1068.

PELÁEZ-RODRÍGUEZ, M.; Peret, A. M.; Matsumura-Tundisi, T. & Rocha, O., 2000. Análise da qualidade da água e aplicação do índice de proteção da vida aquática (IVA) em duas sub-bacias da bacia hidrográfica do rio Jacaré-Guaçu. In: Espíndola, E. L. G.; Botta-Paschoal, C. M. R.; Rocha, O.; Bohrer, M. B. C. & Oliveira-Neto, A. L., (ed). *Ecotoxicologia – perspectivas para o século XXI*. São Carlos: Ed. RiMa, p. 95 - 114.

PEREIRA, S. A.; Nascimento, I. A.; Leite, M. B. N. L.; Cruz, A. C.; Barros, D.A.; Araújo, V. Q.; Sampaio, L. M. A. & Nascimento, N. C., 2010. Sensibilidade de quatro organismos-teste (*Skeletonema costatum*, *Tetraselmis chuii*, *Crassostrea rhizophorae* e *Echinometra lucunter*) ao dodecil sulfato de sódio: elaboração das cartas-controle. *Diálogos e Ciência*, v. 8, p. 1-11.

PRÓSPERI, V. A., 1993. Aplicação de testes de toxicidade com organismos marinhos para a análise de efluentes industriais lançados em áreas estuarinas. Dissertação de mestrado. Universidade de São Paulo, Escola de Engenharia de São Carlos, 120 p.

RACHID, B. R. F., 1996. Ecotoxicidade de efluentes sanitários urbanos lançados ao mar através de emissários submarinos. Dissertação de mestrado. Universidade de São Paulo, Instituto oceanográfico, 106 p.

RAND, G. M., 1995. Fundamentals of aquatic toxicology: effects, environmental fate and risk assessment. Washington USA: Taylor & Francis Publishing, 1125 p.

RAND, G. M. & Petrocelli, S. R., 1985. Introduction. In: Rand, G. M. & Petrocelli, S. R. (ed). *Fundamentals of aquatic toxicology - methods and applications*. New York: Hemisphere publishing corporation, p. 1-28.

RESGALLA Jr, C. & LAITANO, K. S., 2002. Sensibilidade dos organismos marinhos utilizados em testes de toxicidade no Brasil. Notas téc. FACIMAR, v.6, p. 153-163.

RICHMUOND, A., 2000. Microalgal Biotechnology at the turn of the millennium: A personal view. J. Appl. Phycol. v. 12, p. 441-451.

ROCHA, A. A.; Pereira, D. N. & Pádua, H. B., 1985. Produtos de pesca e contaminantes químicos na água da Represa Billings, São Paulo (Brasil). Rev. Saúde Públ., v. 19, p. 401-410.

RODGHER, S. & Spíndola, E. L. G., 2008. The influence of algal densities on the toxicity of chromium for *Ceriodaphnia dubia* Richard (Cladocera, Crustacea). Braz. J. Biol., v. 68(2), p. 341-348.

RODRIGUES, A. & RODRIGUES, R., 2006. Influência do manganês em ensaios de toxicidade com algas em amostras ambientais. J. Braz. Soc. Ecotoxicol., v. 1, p. 7-11.

RODRIGUES, L. H. R.; Arenzon, A.; Raya-Rodriguez, M. T. & Fontoura, N. F., 2003. Avaliação da sensibilidade de *Raphidocelis subcapitata* (Chlorococcales, Chlorophyta) ao sulfato de cobre e sulfato de zinco através de ensaios de toxicidade crônica. Biociências, v. 11, p. 137-144.

ROMANELI, M. F., 2004. Avaliação da toxicidade aguda e crônica dos surfactantes DSS e LAS submetidos à irradiação com feixes de elétrons. Dissertação de mestrado. Universidade de São Paulo, Instituto de pesquisas tecnológicas, 143p.

SALDANHA-CORRÊA, F. M. P.; GIANESELLA, S. M. F. & BARRERA-ALBA, J. 2004. A comparison of the retention capability among three different glass-fiber filters used for chlorophyll-a determinations. Braz. J. Oceanogr., v. 52, p. 243-247.

SEMMLER, M. G. M. C., 2007. Biomonitoração de Hg, Cd, Pb e outros elementos em áreas costeiras do estado de São Paulo por meio do mexilhão transplantado *Perna perna* (Lennaeus, 1758). Tese de doutorado. Autarquia associada à Universidade de São Paulo, Instituto de pesquisas nucleares, 140p.

SHAPIRO, S.S. & Wilk, M.B., 1965. An analysis of variance test for normality (complete samples). *Biometrika*, v. 52, p.v591-611.

SOUSA, E. C. P. M., 2002. Toxicidade Marinha: Histórico In: Nascimento, I. A.; Sousa, E. C. P. M. & Nipper, M., (ed). Métodos em ecotoxicologia marinha. São Paulo: Ed. artes gráficas e indústria Ltda., p. 9-14.

SUBBA RAO, D. V., 2009. Cultivation, growth media, division rates and applications of *Dunaliella* species. In: Ben-Amotz, A.; Polle, J. E. W. & Subba Rao, D. V., (ed). Taxonomy and phylogeny of the genus *Dunaliella*. New Hampshire: Science Publishers, p. 45-89.

SUNDA, W., 1968. The relationship between cupric ion activity and the toxicity of copper to phytoplankton. Tese de Doutorado. Massachusetts Institute of Technology, Woods Hole Oceanographic Institution, 167 p.

TSUKAHARA, K. & Sawayama, S., 2005. Liquid fuel production using microalgae. *J. Jpn Petrol. Inst.*, v. 48, p. 251-259.

USEPA - United States Environmental Protection Agency, 1980. Ambient water quality criteria for copper. EPA 440/5-80-036, p. A1-A4.

ZAGATTO, P. A., 2006. O uso de substâncias de referência no controle de qualidade de ensaios ecotoxicológicos. In: Zagatto, P. A. & Bertoletti, E., (ed). Ecotoxicologia aquática – Princípios e aplicações. São Carlos: Ed. RiMa, p. 185-197.

ZARONI L. P., 2000. Testes de toxicidade com a utilização de embriões do mexilhão *Perna perna* (Linnaeus, 1758): uma adequação do método. Dissertação de mestrado. Universidade de São Paulo, Instituto oceanográfico, 43 p.

8. ANEXOS

Anexo 1. Densidade celular (cél/mL) de *Dunaliella tertiolecta* após 24 h, 48 h e 72 h de exposição ao dicromato de potássio (mg/L) e conteúdo de clorofila-a (µg/L) após 72 h.

Ensaio preliminar

Método	Exposição	Réplica	N° inicial	Controle	Dicromato de potássio (mg/L)				
					0,5	1,0	10,0	100,0	500,0
Contagem celular (cél/mL)	24 h	R1	1250	6875	6250	3750	6250	1563	2500
		R2	625	5625	5000	3125	3750	1563	3125
		R3	313	6250	4063	4688	5625	3750	1875
		Média	729,2	6250,0	5104,2	3854,2	5208,3	2291,7	2500,0
		Desv. p.	477,4	625,0	1097,5	786,4	1301,0	1263,0	625,0
	48 h	R1	1250	26875	17500	25625	33750	14375	4375
		R2	625	23750	26875	20625	21250	8750	2188
		R3	313	38750	25625	31250	17188	21250	2813
		Média	729,2	29791,7	23333,3	25833,3	24062,5	14791,7	3125,0
		Desv. p.	477,4	7913,9	5090,3	5315,6	8632,0	6260,4	1126,7
	72 h	R1	1250	78750	118750	138750	120000	37500	3125
		R2	625	107500	132500	71875	115000	16875	3125
		R3	313	88750	117500	131250	115000	10625	2188
		Média	729,2	91666,7	122916,7	113958,3	116666,7	21666,7	2812,5
		Desv. p.	477,4	14595,2	8322,9	36637,7	2886,8	14063,7	541,3
Conteúdo de clorofila-a (µg/L)	72 h	R1	2,000	272,412	378,851	322,926	310,297	59,534	10,824
		R2	2,000	276,020	211,074	303,081	252,568	50,514	7,216
		R3	2,000	230,919	232,723	274,216	229,115	52,318	7,216
		Média	2,0	259,8	274,2	300,1	264,0	54,1	8,4
		Desv. p.	0,0	25,1	91,3	24,5	41,8	4,8	2,1

Anexo 2. Densidade celular (cél/mL) de *Dunaliella tertiolecta* após 48 h, 72 h e 96 h de exposição ao dicromato de potássio (mg/L), conteúdo de clorofila-a (µg/L) após 96 h e variáveis físicas e químicas, pH e salinidade.

Ensaio 1

Método	Exposição	Réplica	N° inicial	Controle	Dicromato de potássio (mg/L)					
					50	100	200	300	400	600
Contagem celular (cél/mL)	48 h	R1	938	25625	11250	6875	2500	3125	1563	1250
		R2	1250	39375	14063	6250	2188	1875	1875	1250
		R3	1250	37500	17500	4688	1563	3438	2813	625
		Média	1146	34166,7	14270,8	5937,5	2083,3	2812,5	2083,3	1041,7
		Desv. p.	180,4	7456,5	3130,2	1126,7	477,4	826,8	650,5	360,8
	72 h	R1	938	60000	51875	17813	2188	2500	1250	1250
		R2	1250	165625	37813	12500	1875	1250	625	625
		R3	1250	250625	55625	19688	3125	1875	1250	625
		Média	1145,8	158750,0	48437,5	16666,7	2395,8	1875,0	1041,7	833,3
		Desv. p.	180,4	95498,3	9390,6	3728,2	650,5	625,0	360,8	360,8
	96 h	R1	938	333750	197500	44688	2500	1250	625	1563
		R2	1250	602500	148125	36875	4375	625	313	625
		R3	1250	518125	150625	45000	2500	1250	313	313
		Média	1145,8	484791,7	165416,7	42187,5	3125,0	1041,7	416,7	833,3
		Desv. p.	180,4	137440,8	27813,1	4603,4	1082,5	360,8	180,4	650,5
Conteúdo de clorofila-a (µg/L)	96 h	R1	1,780	798,330	312,101	75,770	7,216	3,608	1,804	0,000
		R2	1,780	1535,250	267,000	73,966	19,845	7,216	3,608	9,020
		R3	1,780	1260,240	308,493	75,770	3,608	3,608	0,000	3,608
		Média	1,8	1197,9	295,9	75,2	10,2	4,8	1,8	4,2
		Desv. p.	0,0	372,4	25,1	1,0	8,5	2,1	1,8	4,5

Variáveis físicas e químicas

Parâmetro	Exposição	Controle	Dicromato de potássio (mg/L)					
			50	100	200	300	400	600
pH	Inicial	8,14	8,11	8,07	8,01	8,04	8,06	7,96
	48 h	7,33	7,3	7,23	7,17	7,15	7,12	7,08
	72h	7,46	7,38	7,25	7,13	7,08	7,05	6,99
	96 h	8,84	8,55	8,2	7,98	7,87	7,9	7,91
Salinidade	Inicial	35	35	35	35	36	36	36
	48 h	35	35	35	35	36	36	36
	72h	35	35	35	35	36	36	36
	96 h	35	35	35	35	35	35	35

Anexo 2. Continuação.

Ensaio 2

Método	Exposição	Réplica	N° inicial	Controle	Dicromato de potássio (mg/L)					
					50	100	200	300	400	600
Contagem celular (cél/mL)	48 h	R1	1563	29063	18438	8125	3125	1250	1250	2500
		R2	313	45000	17500	9063	2500	1875	1250	2188
		R3	313	23125	13125	6250	2500	1875	2813	625
		Média	729,2	32395,8	16354,2	7812,5	2708,3	1666,7	1770,8	1770,8
		Desv. p.	721,7	11312,0	2835,6	1432,1	360,8	360,8	902,1	1004,5
	72 h	R1	1563	123750	70000	23750	3438	1250	1875	1875
		R2	313	165000	79063	25000	4375	3750	4688	1875
		R3	313	176875	56875	25625	4063	2188	3750	2188
		Média	729,2	155208,3	68645,8	24791,7	3958,3	2395,8	3437,5	1979,2
		Desv. p.	721,7	27883,2	11155,6	954,7	477,4	1263,0	1432,1	180,4
	96 h	R1	1563	731875	247500	33750	3750	2188	1875	1250
		R2	313	918750	246250	10938	5000	2500	2188	938
		R3	313	851875	327500	47500	3125	1250	3125	2500
		Média	729,2	834166,7	273750,0	30729,2	3958,3	1979,2	2395,8	1562,5
		Desv. p.	721,7	94687,7	46553,1	18467,5	954,7	650,5	650,5	826,8
Conteúdo de clorofila (µg/L)	96 h	R1	2,000	775,743	378,851	81,182	23,453	5,412	3,608	0,000
		R2	2,000	1281,600	481,682	50,514	9,020	5,412	5,412	0,000
		R3	2,000	1151,270	335,554	95,615	10,824	3,608	0,000	1,804
		Média	2,0	1069,5	398,7	75,8	14,4	4,8	3,0	0,6
		Desv. p.	0,0	262,6	75,1	23,0	7,9	1,0	2,8	1,0

Variáveis físicas e químicas

Parâmetro	Exposição	Controle	Dicromato de potássio (mg/L)					
			50	100	200	300	400	600
pH	Inicial	8,30	8,16	7,42	8,13	7,84	8,45	8,17
	48 h	8,12	8,05	7,93	8,15	7,81	7,93	7,80
	72h	8,47	8,39	8,04	8,11	7,88	8,00	7,87
	96 h	9,00	8,56	8,04	7,94	7,76	7,83	7,70
Salinidade	Inicial	36	36	36	35	36	36	36
	48 h	36	36	36	36	36	37	36
	72h	37	37	37	37	37	36	36
	96 h	36	36	36	36	36	36	36

Anexo 2. Continuação.

Ensaio 3

Método	Exposição	Réplica	N° inicial	Controle	Dicromato de potássio (mg/L)					
					50	100	200	300	400	600
Contagem celular (cél/mL)	48 h	R1	1563	40625	20625	7500	5625	2500	3125	1875
		R2	625	25938	18125	8750	4688	3750	3125	5000
		R3	1250	53750	17188	6563	3125	3750	3750	2813
		Média	1145,8	40104,2	18645,8	7604,2	4479,2	3333,3	3333,3	3229,2
		Desv. p.	477,4	13913,6	1777,0	1097,5	1263,0	721,7	360,8	1603,6
	72 h	R1	1563	152500	91875	19688	6250	2500	1875	1250
		R2	625	136250	66250	19375	3750	2500	1875	4063
		R3	1250	271250	59375	14375	4375	2188	1875	313
		Média	1145,8	186666,7	72500,0	17812,5	4791,7	2395,8	1875,0	1875,0
		Desv. p.	477,4	73700,5	17127,7	2981,1	1301,0	180,4	0,0	1951,6
	96 h	R1	1563	493438	251875	24688	3750	625	625	625
		R2	625	404063	134688	35625	5000	625	1250	625
		R3	1250	786250	163125	27188	3125	1250	1250	313
		Média	1145,8	561250,0	183229,2	29166,7	3958,3	833,3	1041,7	520,8
		Desv. p.	477,4	199914,3	61125,8	5731,1	954,7	360,8	360,8	180,4
Conteúdo de clorofilas (µg/L)	96 h	R1	2,000	448,560	368,276	48,060	1,816	1,804	0,000	0,000
		R2	2,000	550,020	243,226	19,711	5,563	0,000	0,000	7,629
		R3	2,000	1097,370	217,490	23,612	5,340	0,000	1,829	0,000
		Média	2,0	698,7	276,3	30,5	4,2	0,6	0,6	2,5
		Desv. p.	0,0	349,0	80,7	15,4	2,1	1,0	1,1	4,4

Variáveis físicas e químicas

Parâmetro	Exposição	Controle	Dicromato de potássio (mg/L)					
			50	100	200	300	400	600
pH	Inicial	8,08	8,17	8,14	8,07	8,14	8,15	8,17
	48 h	8,30	8,16	8,05	8,06	8,03	8,07	8,07
	72h	8,53	8,39	8,15	8,06	8,05	8,07	8,05
	96 h	9,23	8,65	8,23	8,02	8,02	7,99	8,01
Salinidade	Inicial	36	35	35	36	36	36	36
	48 h	36	36	36	36	36	37	37
	72h	36	36	37	37	37	37	37
	96 h	36	36	36	36	37	37	37

Anexo 2. Continuação.

Ensaio 4

Método	Exposição	Réplica	N° inicial	Controle	Dicromato de potássio (mg/L)					
					50	100	200	300	400	600
Contagem celular (cél/mL)	48 h	R1	625	19375	16250	13750	4375	4063	3125	3125
		R2	938	9375	15625	10625	3750	3750	1250	2500
		R3	625	11563	19375	10938	4375	2500	2500	2500
		Média	729,2	13437,5	17083,3	11770,8	4166,7	3437,5	2291,7	2708,3
		Desv. p.	180,4	5257,1	2009,1	1721,1	360,8	826,8	954,7	360,8
	72 h	R1	625	66875	91250	20625	4375	1875	3125	1250
		R2	938	61875	51875	28125	3750	5625	3125	1563
		R3	625	208750	85000	18438	4688	3438	3750	2500
		Média	729,2	112500,0	76041,7	22395,8	4270,8	3645,8	3333,3	1770,8
		Desv. p.	180,4	83392,4	21161,0	5080,7	477,4	1883,7	360,8	650,5
	96 h	R1	625	643750	129375	47500	2813	2188	2500	625
		R2	938	463125	230938	31250	3750	3125	1250	1250
		R3	625	588750	210313	32813	3125	3125	1875	1250
		Média	729,2	565208,3	190208,3	37187,5	3229,2	2812,5	1875,0	1041,7
		Desv. p.	180,4	92585,1	53683,0	8965,0	477,4	541,3	625,0	360,8
Conteúdo de clorofila (µg/L)	96 h	R1	2,000	587,400	380,655	103,240	25,779	3,658	3,734	1,804
		R2	2,000	742,260	256,391	28,865	7,216	5,524	3,560	1,816
		R3	2,000	1054,650	373,800	64,448	5,376	3,560	3,658	3,584
		Média	2,0	794,8	336,9	65,5	12,8	4,2	3,7	2,4
		Desv. p.	0,0	238,0	69,8	37,2	11,3	1,1	0,1	1,0

Variáveis físicas e químicas

Parâmetro	Exposição	Controle	Dicromato de potássio (mg/L)					
			50	100	200	300	400	600
pH	Inicial	8,44	7,96	8,50	8,33	8,45	8,45	8,44
	48 h	8,20	8,11	8,30	8,10	8,17	8,19	8,16
	72h	8,46	8,35	8,26	8,04	8,08	8,08	8,09
	96 h	9,26	8,82	8,33	8,04	8,06	8,08	8,07
Salinidade	Inicial	36	36	36	36	37	37	37
	48 h	36	36	36	37	37	37	37
	72h	37	37	37	37	37	37	37
	96 h	35	36	36	36	36	36	37

Anexo 2. Continuação.

Ensaio 5

Método	Exposição	Réplica	N° inicial	Controle	Dicromato de potássio (mg/L)					
					50	100	200	300	400	600
Contagem celular (cél/mL)	48 h	R1	1250	14375	15000	9375	3125	3750	3125	1875
		R2	938	15938	13125	5625	3125	2813	2500	2188
		R3	1250	11250	15625	8125	3125	2500	3438	1875
		Média	1145,8	13854,2	14583,3	7708,3	3125,0	3020,8	3020,8	1979,2
		Desv. p.	180,4	2386,8	1301,0	1909,4	0,0	650,5	477,4	180,4
	72 h	R1	1250	39063	28750	10000	1563	1250	1563	1875
		R2	938	32500	19375	10000	1875	1875	2813	625
		R3	1250	26250	23125	10000	1563	1875	1250	1563
		Média	1145,8	32604,2	23750,0	10000,0	1666,7	1666,7	1875,0	1354,2
		Desv. p.	180,4	6406,9	4718,6	0,0	180,4	360,8	826,8	650,5
	96 h	R1	1250	274063	130938	17188	1875	1250	625	625
		R2	938	193438	104063	23125	2500	1563	1250	938
		R3	1250	257500	140000	23750	2500	938	1563	625
		Média	1145,8	241666,7	125000,0	21354,2	2291,7	1250,0	1145,8	729,2
		Desv. p.	180,4	42580,7	18690,0	3621,9	360,8	312,5	477,4	180,4
Conteúdo de clorofila (µg/L)	96 h	R1	1,780	213,600	154,388	72,980	3,560	0,000	0,000	0
		R2	1,780	205,590	263,487	14,336	8,841	3,560	1,829	0
		R3	1,780	256,320	259,261	55,307	7,315	0,000	0,000	0
		Média	1,8	225,2	225,7	47,5	6,6	1,2	0,6	0,0
		Desv. p.	0,0	27,3	61,8	30,1	2,7	2,1	1,1	0,0

Variáveis físicas e químicas

Parâmetro	Exposição	Controle	Dicromato de potássio (mg/L)						
			50	100	200	300	400	600	
pH	Inicial	8,18	8,17	8,13	8,08	7,99	7,92	7,83	
	48 h	7,93	7,99	7,95	7,88	7,85	7,82	7,80	
	72h	8,07	8,14	7,92	7,81	7,82	7,80	7,75	
	96 h	8,68	8,47	7,97	7,84	7,77	7,78	7,78	
Salinidade	Inicial	36	36	36	36	36	37	37	
	48 h	36	36	36	36	36	37	37	
	72h	36	36	36	37	37	37	37	
	96 h	37	37	37	37	37	37	37	

Anexo 3. Densidade celular (cél/mL) de *Dunaliella tertiolecta* após 48 h, 72 h e 96 h de exposição ao dodecil sulfato de sódio (mg/L), conteúdo de clorofila-a (µg/L) após 96 h e variáveis físicas e químicas, pH e salinidade.

Ensaio 1

Método	Exposição	Réplica	N° inicial	Controle	Dodecil sulfato de sódio (mg/L)				
					0,3	0,6	1,2	2,5	5,0
Contagem celular (cél/mL)	48 h	R1	4531	9375	5625	5469	10938	2500	3125
		R2	1719	4063	5625	10781	7031	2813	469
		R3	938	2344	6094	7969	9688	469	313
		Média	2395,8	5260,4	5781,3	8072,9	9218,8	1927,1	1302,1
		Desv. p.	238,7	3665,5	270,6	2657,8	1994,9	1272,6	1580,6
	72 h	R1	4531	14219	19375	33281	16875	1250	2656
		R2	1719	12500	39688	20938	19688	4219	2344
		R3	938	18438	12813	18594	21094	1250	1719
		Média	2395,8	15052,1	23958,3	24270,8	19218,8	2239,6	2239,6
		Desv. p.	1890,1	3055,2	14011,5	7890,8	2148,1	1714,0	477,4
	96 h	R1	4531	48125	33281	77500	38594	2188	2188
		R2	1719	32500	46563	45313	47031	1719	313
		R3	938	22813	30469	47813	47188	1719	1094
		Média	2395,8	34479,2	36770,8	56875,0	44270,8	1875,0	1197,9
		Desv. p.	1890,1	12771,8	8595,6	17905,5	4917,1	270,6	941,8
Conteúdo de clorofila-a (µg/L)	96 h	R1	0,000	215,034	219,830	224,316	176,220	0,914	1,780
		R2	8,010	180,091	290,339	267,000	185,662	3,584	4,450
		R3	1,780	162,561	381,416	220,232	248,185	0,000	14,531
		Média	3,3	185,9	297,2	237,2	203,4	1,5	6,9
		Desv. p.	4,2	26,7	81,0	25,9	39,1	1,9	6,7

Variáveis físicas e químicas

Parâmetro	Exposição	Controle	Dodecil sulfato de sódio (mg/L)				
			0,3	0,6	1,2	2,5	5,0
pH	Inicial	8,09	8,29	8,27	8,10	8,10	8,09
	48 h	7,87	7,89	7,97	7,93	7,77	7,94
	72h	7,71	7,84	7,89	7,86	7,60	7,63
	96 h	8,05	8,27	8,17	8,05	7,70	7,71
Salinidade	Inicial	37	37	37	37	37	37
	48 h	37	37	37	37	37	37
	72h	37	37	37	37	37	37
	96 h	37	37	37	37	37	37

Anexo 3. Continuação.

Ensaio 2

Método	Exposição	Réplica	N° inicial	Controle	Dodecil sulfato de sódio (mg/L)				
					0,3	0,6	1,2	2,5	5,0
Contagem celular (cél/mL)	48 h	R1	469	1250	1406	469	2344	156	0
		R2	781	313	1875	1563	938	313	0
		R3	313	313	1719	1719	625	0	313
		Média	520,8	625,0	1666,7	1250,0	1302,1	156,3	104,2
		Desv. p.	238,7	541,3	238,7	681,1	915,5	156,3	180,4
	72 h	R1	469	313	9531	469	5938	0	0
		R2	781	2969	7188	1094	1875	0	0
		R3	313	2344	2813	7656	3906	0	313
		Média	520,8	1875,0	6510,4	3072,9	3906,3	0,0	104,2
		Desv. p.	238,7	1388,8	3410,2	3981,6	2031,3	0,0	180,4
	96 h	R1	469	66719	19531	18594	9375	0	0
		R2	781	19844	43750	67188	23594	0	0
		R3	313	83750	17500	79063	22188	313	0
		Média	520,8	56770,8	26927,1	54947,9	18385,4	104,2	0,0
		Desv. p.	238,7	33094,2	14604,4	32038,6	7834,9	180,4	0,0
Conteúdo de clorofila-a (µg/L)	96 h	R1	6,230	178,000	247,420	229,620	197,430	1,841	1,867
		R2	6,230	138,103	176,106	126,083	41,077	3,683	1,816
		R3	2,670	183,681	193,345	191,789	170,261	0,000	1,867
		Média	5,0	166,6	205,6	182,5	136,3	1,8	1,9
		Desv. p.	2,1	24,8	37,2	52,4	83,5	1,8	0,0

Variáveis físicas e químicas

Parâmetro	Exposição	Controle	Dodecil sulfato de sódio (mg/L)				
			0,3	0,6	1,2	2,5	5,0
pH	Inicial	7,89	7,99	7,90	7,92	7,93	7,89
	48 h	7,50	7,50	7,51	7,53	7,51	7,51
	72h	7,60	7,69	7,70	7,71	7,67	7,61
	96 h	7,66	7,99	8,16	8,13	8,05	7,97
Salinidade	Inicial	35	35	35	35	35	35
	48 h	35	35	35	35	35	35
	72h	35	35	35	35	35	35
	96 h	35	35	35	35	35	35

Anexo 3. Continuação.

Ensaio 3

Método	Exposição	Réplica	N° inicial	Controle	Dodecil sulfato de sódio (mg/L)				
					0,3	0,6	1,2	2,5	5,0
Contagem celular (cél/mL)	48 h	R1	156	781	2344	2031	313	0	0
		R2	313	2500	7656	4219	156	0	0
		R3	313	3125	5938	625	781	156	0
		Média	260,4	2135,4	5312,5	2291,7	416,7	52,1	0,0
		Desv. p.	90,2	1213,7	2710,8	1811,0	325,3	90,2	0,0
	72 h	R1	156	4688	10000	2031	5000	0	0
		R2	313	13125	12344	10313	3906	0	313
		R3	313	8750	7188	7031	3906	0	0
		Média	260,4	8854,2	9843,8	6458,3	4270,8	0,0	104,2
		Desv. p.	90,2	4219,7	2581,7	4170,2	631,5	0,0	180,4
	96 h	R1	156	68438	41406	58281	35000	156	0
		R2	313	106563	57969	65938	47656	0	156
		R3	313	52813	76094	42969	38281	313	625
		Média	260,4	75937,5	58489,6	55729,2	40312,5	156,3	260,4
		Desv. p.	90,2	27648,7	17349,6	11695,1	6568,1	156,3	325,3
Conteúdo de clorofila-a (µg/L)	96 h	R1	0,000	149,520	197,544	139,857	69,972	0,927	0,000
		R2	5,340	254,985	207,453	132,579	105,751	0,954	0,000
		R3	3,560	160,200	182,877	150,913	97,445	1,907	0,000
		Média	3,0	188,2	196,0	141,1	91,1	1,3	0,0
		Desv. p.	2,7	58,1	12,4	9,2	18,7	0,6	0,0

Variáveis físicas e químicas

Parâmetro	Exposição	Controle	Dodecil sulfato de sódio (mg/L)				
			0,3	0,6	1,2	2,5	5,0
pH	Inicial	7,51	7,60	7,56	7,51	7,59	7,56
	48 h	7,56	7,55	7,70	7,63	7,53	7,52
	72h	7,67	7,64	7,66	7,64	7,57	7,59
	96 h	7,70	7,82	7,92	7,85	7,80	7,73
Salinidade	Inicial	35	35	35	35	35	35
	48 h	35	35	35	35	35	35
	72h	35	35	35	35	35	35
	96 h	35	35	35	35	35	35

Anexo 3. Continuação.

Ensaio 4

Método	Exposição	Réplica	Nº inicial	Controle	Dodecil sulfato de sódio (mg/L)				
					0,3	0,6	1,2	2,5	5,0
Contagem celular (cél/mL)	48 h	R1	1563	156	1875	1094	156	0	156
		R2	1719	1875	781	156	313	156	0
		R3	3906	156	156	156	469	0	313
		Média	2395,8	729,2	937,5	468,8	312,5	52,1	156,3
		Desv. p.	1310,4	992,3	870,0	541,3	156,3	90,2	156,3
	72 h	R1	1563	1875	5781	469	1563	156	0
		R2	1719	2344	1875	5000	156	0	0
		R3	3906	2031	781	2969	156	156	0
		Média	2395,8	2083,3	2812,5	2812,5	625,0	104,2	0,0
		Desv. p.	1310,4	238,7	2628,5	2269,7	811,9	90,2	0,0
	96 h	R1	1563	18281	25313	8281	156	0	0
		R2	1719	10313	30000	13906	625	0	0
		R3	3906	12656	17969	12188	156	0	0
		Média	2395,8	13750,0	24427,1	11458,3	312,5	0,0	0,0
		Desv. p.	1310,4	4095,4	6064,3	2882,5	270,6	0,0	0,0
Conteúdo de clorofila-a (µg/L)	96 h	R1	11,867	86,775	65,350	72,090	4,120	0,000	0,000
		R2	10,680	85,130	65,823	62,300	14,731	0,000	0,000
		R3	7,120	87,146	47,807	62,489	2,781	0,000	0,000
		Média	9,9	86,4	59,7	65,6	7,2	0,0	0,0
		Desv. p.	2,5	1,1	10,3	5,6	6,5	0,0	0,0

Variáveis físicas e químicas

Parâmetro	Exposição	Dodecil sulfato de sódio (mg/L)					
		Controle	0,3	0,6	1,2	2,5	5,0
pH	Inicial	7,50	7,57	7,61	7,69	7,82	7,79
	48 h	7,52	7,62	7,60	7,72	7,72	7,84
	72h	7,77	7,80	7,74	7,59	7,72	7,73
	96 h	7,99	8,08	8,03	7,98	8,14	7,99
Salinidade	Inicial	35	35	35	35	35	35
	48 h	35	35	35	35	35	35
	72h	35	35	35	35	35	35
	96 h	35	35	35	35	35	35

Anexo 3. Continuação.

Ensaio 5

Método	Exposição	Réplica	N° inicial	Controle	Dodecil sulfato de sódio (mg/L)				
					0,3	0,6	1,2	2,5	5,0
Contagem celular (cél/mL)	48 h	R1	313	469	1250	313	156	156	0
		R2	313	625	2188	1250	156	0	156
		R3	313	156	156	313	313	0	156
		Média	312,5	416,7	1197,9	625,0	208,3	52,1	104,2
		Desv. p.	0,0	238,7	1016,6	541,3	90,2	90,2	90,2
	72 h	R1	313	469	781	4063	625	156	156
		R2	313	17813	15625	4219	156	313	0
		R3	313	1875	938	625	625	156	156
		Média	312,5	6718,8	5781,3	2968,8	468,8	208,3	104,2
		Desv. p.	0,0	9633,2	8525,3	2031,3	270,6	90,2	90,2
	96 h	R1	313	938	469	6250	156	313	0
		R2	313	2500	2656	1406	469	0	0
		R3	313	625	2188	1875	156	156	0
		Média	312,5	1354,2	1770,8	3177,1	260,4	156,3	0,0
		Desv. p.	0,0	1004,5	1151,7	2671,5	180,4	156,3	0,0
Conteúdo de clorofila-a (µg/L)	96 h	R1	8,900	115,637	156,717	128,832	8,841	0,000	0,000
		R2	8,455	114,166	175,330	75,794	19,580	0,000	0,000
		R3	6,230	132,586	180,091	167,102	24,920	0,000	0,000
		Média	7,9	120,8	170,7	123,9	17,8	0,0	0,0
		Desv. p.	1,4	10,2	12,4	45,9	8,2	0,0	0,0

Variáveis físicas e químicas

Parâmetro	Exposição	Controle	Dodecil sulfato de sódio (mg/L)				
			0,3	0,6	1,2	2,5	5,0
pH	Inicial	7,72	7,61	7,66	7,68	7,70	7,73
	48 h	7,55	7,65	7,69	7,70	7,74	7,72
	72h	7,50	7,74	7,90	7,88	7,84	7,89
	96 h	7,75	7,80	8,03	7,86	7,88	7,89
Salinidade	Inicial	35	35	35	35	35	35
	48 h	35	35	35	35	35	35
	72h	35	35	35	35	35	35
	96 h	35	35	35	35	35	35

Anexo 4. Densidade celular (cél/mL) de *Dunaliella tertiolecta* após 48 h, 72 h e 96 h de exposição ao cromato de potássio (mg/L), conteúdo de clorofila-a (µg/L) após 96 h e variáveis físicas e químicas, pH e salinidade.

Ensaio 1

Método	Exposição	Réplica	N° inicial	Controle	Cromato de potássio (mg/L)				
					25	50	100	200	400
Contagem celular (cél/mL)	48 h	R1	313	625	156	313	1094	1094	1250
		R2	156	1406	469	1250	3594	1094	625
		R3	313	1406	1875	313	469	156	156
		Média	260,4	1145,8	833,3	625,0	1718,8	781,3	677,1
		Desv. p.	90,2	451,1	915,5	541,3	1653,6	541,3	548,7
	72 h	R1	313	3594	15625	21719	11875	8281	1094
		R2	156	2813	2969	5625	20313	2656	4375
		R3	313	781	6563	469	14219	6406	156
		Média	260,4	2395,8	8385,4	9270,8	15468,8	5781,3	1875,0
		Desv. p.	90,2	1451,8	6522,1	11084,2	4355,4	2864,1	2215,2
	96 h	R1	313	2031	1406	2188	3125	5625	1250
		R2	156	156	625	1875	3750	6875	469
		R3	313	5156	5938	10000	781	2031	156
		Média	260,4	2447,9	2656,3	4687,5	2552,1	4843,8	625,0
		Desv. p.	90,2	2525,9	2868,4	4603,4	1565,1	2514,6	563,4
Conteúdo de clorofila-a (µg/L)	96 h	R1	7,120	347,638	365,321	185,120	159,310	58,351	15,130
		R2	8,307	395,124	351,316	236,056	126,332	55,180	14,146
		R3	10,680	317,539	281,336	178,601	105,910	48,709	0,000
		Média	8,7	353,4	332,7	199,9	130,5	54,1	9,8
		Desv. p.	1,8	39,1	45,0	31,5	26,9	4,9	8,5

Variáveis físicas e químicas

Parâmetro	Exposição	Cromato de potássio (mg/L)					
		Controle	25	50	100	200	400
pH	Inicial	7,80	7,88	7,71	7,70	7,66	7,69
	48 h	7,87	7,93	7,78	7,72	7,74	7,78
	72h	7,75	8,09	7,89	7,91	7,85	7,84
	96 h	8,15	8,01	8,00	8,05	7,88	7,98
Salinidade	Inicial	37	37	37	37	37	37
	48 h	37	37	37	37	37	37
	72h	37	37	37	37	37	37
	96 h	37	37	37	37	37	37

Anexo 4. Continuação.

Ensaio 2

Método	Exposição	Réplica	N° inicial	Controle	Cromato de potássio (mg/L)				
					25	50	100	200	400
Contagem celular (cél/mL)	48 h	R1	313	469	313	469	1250	1563	625
		R2	781	156	313	1406	1719	781	2031
		R3	313	313	1094	625	156	156	156
		Média	468,8	312,5	572,9	833,3	1041,7	833,3	937,5
		Desv. p.	270,6	156,3	451,1	502,3	801,8	704,6	975,8
	72 h	R1	313	625	1094	2500	625	2031	2500
		R2	781	2813	1563	625	6719	781	469
		R3	313	10313	1094	2344	625	1719	1719
		Média	468,8	4583,3	1250,0	1822,9	2656,3	1510,4	1562,5
		Desv. p.	270,6	5080,7	270,6	1040,4	3518,2	650,5	1024,6
	96 h	R1	313	1719	3281	1250	938	4688	469
		R2	781	4531	1406	2813	1719	2031	1094
		R3	313	3594	2813	11719	23281	1719	625
		Média	468,8	3281,3	2500,0	5260,4	8645,8	2812,5	729,2
		Desv. p.	270,6	1432,1	975,8	5647,4	12680,7	1631,3	325,3
Conteúdo de clorofila-a (µg/L)	96 h	R1	10,383	290,453	316,717	191,503	120,610	39,689	14,731
		R2	8,010	378,397	451,014	275,286	84,550	46,034	15,652
		R3	10,680	430,061	473,153	222,182	134,421	49,717	16,236
		Média	9,7	366,3	413,6	229,7	113,2	45,1	15,5
		Desv. p.	1,5	70,6	84,7	42,4	25,7	5,1	0,8

Variáveis físicas e químicas

Parâmetro	Exposição	Cromato de potássio (mg/L)					
		Controle	25	50	100	200	400
pH	Inicial	7,64	7,89	8,00	8,02	8,00	7,96
	48 h	7,61	7,73	7,79	7,87	7,95	7,75
	72h	8,01	7,94	8,03	7,83	7,95	7,85
	96 h	8,12	8,14	8,04	8,00	7,89	7,79
Salinidade	Inicial	37	37	37	37	37	37
	48 h	37	37	37	37	37	37
	72h	37	37	37	37	37	37
	96 h	37	37	37	37	37	37

Anexo 4. Continuação.

Ensaio 3

Método	Exposição	Réplica	Nº inicial	Controle	Cromato de potássio (mg/L)				
					25	50	100	200	400
Contagem celular (cél/mL)	48 h	R1	625	2500	313	1094	625	625	313
		R2	313	1406	625	469	18594	1719	1875
		R3	1250	2344	1719	156	156	625	938
		Média	729,2	2083,3	885,4	572,9	6458,3	989,6	1041,7
		Desv. p.	477,4	591,6	738,4	477,4	10512,2	631,5	786,4
	72 h	R1	625	2031	1250	1406	9844	12188	1406
		R2	313	8750	2500	1719	3281	9531	469
		R3	1250	625	1250	1094	2500	3125	156
		Média	729,2	3802,1	1666,7	1406,3	5208,3	8281,3	677,1
		Desv. p.	477,4	4342,3	721,7	312,5	4033,3	4658,8	650,5
	96 h	R1	625	2656	8438	36719	1719	12188	469
		R2	313	17500	15469	5938	4531	8438	625
		R3	1250	17969	15156	6875	20625	2969	1563
		Média	729,2	12708,3	13020,8	16510,4	8958,3	7864,6	885,4
		Desv. p.	477,4	8708,5	3972,4	17507,2	10201,0	4636,0	591,6
Conteúdo de clorofila-a (µg/L)	96 h	R1	9,345	500,274	411,510	242,227	186,628	61,301	21,576
		R2	15,219	732,142	531,247	396,413	198,859	89,459	43,592
		R3	16,287	632,734	433,557	206,574	151,578	73,703	19,268
		Média	13,6	621,7	458,8	281,7	179,0	74,8	28,1
		Desv. p.	3,7	116,3	63,7	100,9	24,5	14,1	13,4

Variáveis físicas e químicas

Parâmetro	Exposição	Cromato de potássio (mg/L)					
		Controle	25	50	100	200	400
pH	Inicial	7,62	7,60	7,61	7,58	7,57	7,5
	48 h	7,66	7,62	7,63	7,6	7,59	7,55
	72h	7,68	7,91	7,9	8,08	7,72	7,65
	96 h	8,11	8,14	8,03	8,05	7,88	7,64
Salinidade	Inicial	35	35	35	35	35	35
	48 h	35	35	35	35	35	35
	72h	35	35	35	35	35	35
	96 h	36	36	36	36	36	36