

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA E RECURSOS NATURAIS
DEPARTAMENTO DE BOTÂNICA

**O papel dos polissacarídeos algais extracelulares na dinâmica de
metais no reservatório de Barra Bonita**

SANDRA PROTTER GOUVÊA

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Recursos Naturais da Universidade Federal de São Carlos, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências (Campo de Pesquisa: Fisiologia e Bioquímica dos Microrganismos).

SÃO CARLOS – SP

2004

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da
Biblioteca Comunitária/UFSCar**

G719pp

Gouvêa, Sandra Protter.

O papel dos polissacarídeos algais extracelulares na
dinâmica de metais no reservatório de Barra Bonita / Sandra
Protter Gouvêa. -- São Carlos : UFSCar, 2004.

97 p.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São Carlos,
2004.

1. Bioquímica. 2. Cádmio. 3. Cobre. 4. Complexação. 5.
Anabaena spiroides. 6. *Aulacoseira granulata*. 7. *Microcystis
aeruginosa*. I. Título.

CDD: 574.192 (20^a)

Orientador: Prof. Dr. Armando Augusto Henriques Vieira

Agradecimentos

Ao orientador Prof. Dr. Armando A. H. Vieira, obrigada pela orientação científica na área de fisiologia e cultivo de microalgas, pelos ensinamentos imprescindíveis ao ambiente acadêmico, e sobretudo pela amizade e paciência.

À co-orientadora Profa. Dra. Ana T. Lombardi, obrigada pela orientação na área de coleta e análise de metais-traço, pela ajuda com os artigos, sugestões ao projeto e a oportunidades de estágio, e também pela amizade e paciência, que foram as mais prezadas qualidades de meus orientadores.

Ao técnico Luis Sartori, por ter soluções a todos os problemas de laboratório e experimentos, e pelo apoio inestimável em todos estes anos de convivência.

Aos companheiros do laboratório de Ficologia, Danilo, Cristina, Vanessa, Zezé, Pedro, Thaís, Mic, Sebastião, Maria, Mariana, Roseli, por compartilhar o ambiente de trabalho que tenho certeza ser muito especial a todos.

Ao pessoal do Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Recursos Naturais, Prof. Dr. José Eduardo, Renata, João, Roseli, Eduardo, pelo apoio às atividades acadêmicas, principalmente na representação do programa da pós e com o preparo das defesas.

À Universidade Federal de São Carlos, pela infraestrutura.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, pelo contrato 00/03122-0, que amparou o projeto de doutoramento e o estágio no exterior.

À Banca Examinadora da defesa de qualificação, Prof. Dr. Irineu Bianchini Jr., Profa. Dra. Odete Rocha e Profa. Dra. Mirna J. L. Godinho, pelas críticas e correções ao artigo.

À Banca Examinadora da defesa de doutorado, Prof. Dra. Ana Teresa Lombardi, Prof. Dra. Odete Rocha, Prof. Dr. Otaciro R. do Nascimento, Prof. Dr. Antônio A. Mozeto e Prof. Dr. Armando A. H. Vieira, pelo aceite do convite da participação e pelas opiniões.

Aos técnicos de campo Luiz A. Joaquim e Airton S. Soares, pelo apoio incondicional nas coletas de campo.

Ao Prof. Dr. Pedro Senna (in memorian) e Maria da Graça M. Souza (UnB) pela ajuda na identificação das espécies

À Zezé (Maria José Dellamano de Oliveira), pelas dicas de contagem de células e preservação de amostras de fitoplâncton.

À Vanessa Colombo, pelo apoio nas análises fluorométricas.

Ao Prof. Dr. Irineu Bianchini Jr. e Marcela B. C. Santino, pelo uso do TOC.

À Telma Blanco, do CCDM – UFSCar, pela análise de metais por espectrometria de absorção atômica.

Ao Prof. Dr. Orlando Fatibello, pelas dicas, empréstimo de eletrodos e de mercúrio.

Ao Prof. Dr. Marco Grassi e Fernando Sodré, do laboratório de química ambiental da UFPR, pela complementa o de análises por DPASV, e pela hospitalidade.

Ao Prof. Dr. Michael Twiss, pelo estágio e projeto de trabalho na Clarkson University (Potsdam, NY, USA), pelos ensinamentos em limnologia e coleta nos Grandes Lagos.

Ao pessoal da Clarkson University e de Potsdam:  ngela e Andrew + Lucie, Ming the Mercyless, Mousie e Max (in memorian), Alan e John Paul + Baby, Lucky e Socks, Carrol e Jim + Jedi, Penny, Wizard e Angel, Siew Hee + Billy, Diane, Monaj, Dr. Twiss e sua família Tammy, Madeleine, Mary, Avery + Tippy e o gato, pela hospitalidade.

Em especial aos meus pais Bonina e Firmino, e   minha avó Carmela, que sempre me apoiaram, e tiveram muita paciência e amor.

Ao José Ricardo, que, segundo a filosofia da existência como uma ilha, tem sido a ilha mais próxima.

SUMÁRIO

A) ABREVIACÕES	8
B) LISTA DE FIGURAS	9
C) LISTA DE TABELAS	11
D) RESUMO	14
E) ABSTRACT	15
1) INTRODUÇÃO	16
2) HIPÓTESES E OBJETIVOS	24
3) METODOLOGIA	26
3.1) Área de estudo	26
3.2) Espécies fitoplancônicas. Isolamento e manutenção em laboratório	28
3.3) Seleção dos metais estudados	30
3.4) Estudo de campo	31
3.4.1) Coleta das amostras	31
3.4.2) Variáveis físico-químicas	32
3.4.3) Análise dos monossacarídeos de amostras da água do reservatório	33
3.4.4) Análises dos metais	33
3.4.4.1) Especificação de Cu e Cd na água do reservatório	34
3.4.4.2) Capacidade de complexação da água do reservatório com Cu e Cd	39
3.4.4.3) Modelagem dos dados de especificação	40
3.5) Estudo de laboratório	41
3.5.1) Curvas de crescimento das microalgas	41
3.5.2) Obtenção dos materiais de alta massa molecular das culturas e da água do reservatório	42
3.5.3) Análises dos materiais de alta massa molecular das culturas e da água do reservatório	42
3.5.3.1) Capacidade de complexação com Cu e Cd	43
3.5.3.2) Composição monossacarídica	43
3.5.3.3) Proporção dos elementos C, H, N e S	44
3.5.3.4) Análise de fluorescência do material de alta massa molecular da água do reservatório	44

4) RESULTADOS	45
4.1) Estudo de campo	45
4.1.1) Parâmetros físico-químicos	45
4.1.2) Composição monossacarídica de amostras da água do reservatório	52
4.1.3) Metais na água do reservatório: especiação e complexação de Cu e Cd	54
4.2) Estudo de laboratório	64
4.2.1) Cultivo das microalgas e rendimento dos materiais de alta massa molecular	64
4.2.2) Complexação de Cu e Cd pelos materiais de alta massa molecular	66
4.2.3) Composição monossacarídica e elementar	71
4.2.4) Fluorescência do material de alta massa molecular da água do reservatório	74
5) DISCUSSÃO	76
6) CONCLUSÕES	85
7) REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	86

A) ABREVIACOES

ANOVA: análise de variância

ccap: capacidade de complexaco aparente

CL: concentrao de ligantes

COD: carbono orgânico dissolvido

COT: carbono orgânico total

Da: dltons

DPASV: voltametria de redissoluo anódica por pulso diferencial

E: irradiância

HPLC: cromatografia líquida de alta resoluo

I: força iônica

ISE: eletrodos in-seletivos

K': constante de estabilidade condicional

k_d : coeficiente de extino vertical

MAMM: materiais de alta massa molecular

M_L : metal ligado

$M_{lb}$: metal lábil

M_{MO} : metal associado  matéria orgânica

MOD: matéria orgânica dissolvida

M_{tot} : metal total

M^+ : metal iônico

NTA: cido nitrilo-triactico

PC: policarbonato

PIPES: Piperazina – N, N' – bis [2 – cido etanosulfônico]

PSF: polisulfona

r: ndice de correlao de Pearson

TDS: total de sólidos dissolvidos

TEP: transparent exopolymer particles

UV: Ultra-violeta

Z_{DS} : profundidade do Disco de Secchi ou transparência da gua

Z_{eu} : zona eufótica

Z_{max} : zona máxima

μ : taxa específica de crescimento

B) LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Representação esquemática da ciclagem de metais-traço em um lago. Adaptado de Sigg (1993). ML = metal associado a ligante. 19
- Figura 2.** Reservatório de Barra Bonita, com o ponto de coleta das microalgas e de amostras de campo. Adaptado de Calijuri (1999). 27
- Figura 3.** Esquema de especiação dos metais Cu e Cd para a água filtrada (0,45 µm) do reservatório. ISE = eletrodos íon-seletivos. DPASV = voltametria de redissolução anódica. 35
- Figura 4.** Curva de calibração para o eletrodo íon seletivo de Cd. Eletrodo de referência: Ag/AgCl. 36
- Figura 5.** Curva de calibração para o eletrodo íon-seletivo de Cu. Eletrodo de referência: Ag/AgCl. 36
- Figura 6.** Perfis de variáveis físico-químicas das coletas realizadas em 20/03/2001 – outono (A) e 09/07/2001 – inverno (B). 46
- Figura 7.** Perfis de variáveis físico-químicas das coletas realizadas em 17/10/2001 – primavera (A) e 21/01/2002 – verão (B). 47
- Figura 8.** Perfis de variáveis físico-químicas das coletas de 25/06/2002 – inverno (A) e 14/10/2002 – primavera (B). 48
- Figura 9.** Perfis de variáveis físico-químicas das coletas de 13/01/2003 – verão (A) e 28/04/2003 – outono (B). 49
- Figura 10.** Exemplo de perfil da irradiação solar. Porcentagens de incidência em relação à superfície são indicadas abaixo dos pontos de leitura. E = irradiância. 50

Figura 11. Exemplos de polarogramas obtidos nas determinações de Cu (A) e Cd (B), através de DPASV. 56

Figura 12. Exemplos de curvas de titulação da água do reservatório com Cu (●) e Cd (□). Não complexação (---) : $[\text{metal total}] = [\text{M}^{2+}]$. Barras: erro da média (n = 3). 58

Figura 13. Exemplo de análise gráfica pelo método de Scatchard para titulação da água do reservatório com Cu. (---) Regressão linear para cálculo dos parâmetros de complexação das classes (1) e (2) de ligantes. 59

Figura 14. Exemplos de adição de padrão interno e regressão linear das leituras em DPASV para obtenção das inclinações de reta de brancos e da água do reservatório, em análises da capacidade de complexação aparente de Cu e Cd. 61

Figura 15. Concentrações de Cu^{2+} obtidas por ISE e pela modelagem dos dados, em função das concentrações totais obtidas em cada coleta sazonal. Barras: erro da média (n = 3). 63

Figura 16. Curvas de crescimento de *Aulacoseira granulata*, *Microcystis aeruginosa* e *Anabaena spiroides* por número de células por ml e concentração de clorofila-a por mL. 65

Figura 17. Curvas de titulação dos materiais de alta massa molecular (MAMM) com Cu (●) e Cd (□). (A) Barra Bonita, (B) mistura dos MAMM das três microalgas, (C) *A. granulata*, (D) *A. spiroides*, (E) *M. aeruginosa*. $I = 1,0 \times 10^{-1}$ M (NaNO_3), pH = 6,8 – 7,0 (PIPES $7,5 \times 10^{-3}$ M). Valores em log da concentração de metal livre em função do log de metal total. (---): Não complexação (---) : $[\text{metal total}] = [\text{M}^{2+}]$. Barras: erro da média (n = 3). 67

Figura 18. Exemplos de análises gráficas pelo método de Scatchard das titulações dos materiais de alta massa molecular de *A. spiroides* com Cu e Cd. Metal associado aos ligantes por metal livre (M_L/M^{2+}) versus metal associado aos ligantes (M_L). (---) Regressões lineares para cálculo dos parâmetros das classes de ligantes 1 e 2. 69

Figura 19. Constantes de estabilidade condicional da classe 1 de ligantes (K'_1) em função das respectivas concentrações de ligantes (CL_1) divididas pelo conteúdo de carbono orgânico total (COT). (---): Regressão linear. 72

Figura 20. Gráficos das concentrações de soluções do MAMM de Barra Bonita versus intensidade (pico de fluorimetria), soluções versus carbono orgânico total (COT) e COT x intensidade. 75

C) LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Exemplos de formas metálicas de importância toxicológica e ambiental. Fonte: Twiss *et al.* (2001). 18

Tabela 2. Características principais do reservatório de Barra Bonita. 28

Tabela 3. Condições de cultivo das microalgas. 29

Tabela 4. Concentrações totais de dez metais presentes no reservatório, analisadas no Centro de Caracterização de Materiais – UFSCar, por espectrometria de absorção atômica. 31

Tabela 5. Parâmetros para a determinação dos metais cobre e cádmio por DPASV. 37

Tabela 6. Teste de destruição da matéria orgânica presente na amostra filtrada do reservatório usando-se o reator de fotodegradação. Temperatura interna do reator \cong 50 °C. 38

Tabela 7. Teste de fotodegradação da matéria orgânica em 8 h de exposição ao reator de fotodegradação. Leituras de fluorescência em λ excitação = 313 nm e λ emissão = 330-600 nm. 38

Tabela 8. Dados de transparência da água pelo disco de Secchi (Z_{DS}), coeficiente de extinção vertical da luz (k_d), zona eufótica (Z_{eu}), profundidade máxima (Z_{max}),

concentrações de clorofila-a e carbono orgânico dissolvido (COD) das coletas sazonais. Média \pm erro da média. 50

Tabela 9. Composição e quantificação dos monossacarídeos totais dissolvidos da água do reservatório, nas coletas sazonais. Concentração em mg L^{-1} e porcentagem em relação à concentração total quantificada. 53

Tabela 10. Concentrações totais de Cu e Cd e das espécies iônicas e associadas à matéria orgânica. Média e \pm erro da média ($n = 3$). 55

Tabela 11. Concentrações de cobre lábil, total dissolvido, total recuperável, da fração do total recuperável proveniente da fase particulada, e a concentração recuperável por g de total de sólidos dissolvidos. 58

Tabela 12. Complexação de Cu pela água filtrada de Barra Bonita. Parâmetros constante de estabilidade condicional (K') e concentração de ligantes (CL), obtidos por ISE e capacidade de complexação aparente (ccap), obtida por DPASV. Média e \pm erro da média ($n = 3$). 59

Tabela 13. Valores médios das coletas sazonais dos parâmetros de complexação K' e CL, metal total e metal iônico medidos nas coletas, e metal iônico estimado pelo modelo de especiação. 62

Tabela 14. Espécies de Cu e Cd, concentrações e constantes de estabilidade condicional para a modelagem da fração dissolvida da água do reservatório. CuBB: Cu associado à classe 1 de ligantes de alta massa molecular da água do reservatório. 62

Tabela 15. Dados dos cultivos das microalgas e da coleta de água do reservatório para obtenção dos materiais de alta massa molecular (MAMM). Dia de isolamento do MAMM nos cultivos e de coleta de campo, concentrações de clorofila-a, taxas de crescimento específicas (μ), rendimento do MAMM e concentrações de carbono orgânico total (COT) das soluções de $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ de MAMM. Média \pm erro da média, $n=3$. 66

Tabela 16. Parâmetros de complexação de Cu e Cd obtidos pelo método de Scatchard e os dados de titulações com os materiais de alta massa molecular excretados pelas 3 microalgas estudadas, da mistura destes, e da água do reservatório, e total de metal complexado por mg dos materiais. Constante de estabilidade condicional (K') reportada em log e concentração de ligantes (CL) reportada em M. Erros-padrão de trélicas das titulações: $\log K'_1$ até $\pm 0,1$, CL_1 até $\pm 0,5$, $\log K'_2$ e CL_2 até $\pm 0,3$. 68

Tabela 17. Teste ANOVA paramétrico das comparações entre as constantes de estabilidade condicional ($\log K'$) e concentração de ligantes correspondentes entre os MAMM. ns = diferenças não significativas. * = diferenças significativas. 70

Tabela 18. Capacidade de complexação aparente (ccap) de soluções dos materiais de alta massa molecular (MAMM) com Cu e Cd por DPASV e as concentrações de carbono orgânico total (COT) das soluções tituladas. Média \pm erro da média (n = 3). 72

Tabela 19. Composição dos monossacarídeos e análise elementar dos materiais de alta massa molecular (MAMM). Monossacarídeos reportados em porcentagens referentes ao material total. C, H, N e S reportados em proporções e sem correção da massa atômica. Média \pm erro da média (n=3). 73

D) RESUMO

A influência do fitoplâncton e de seus produtos excretados resultantes da fotossíntese em corpos d'água têm sido o enfoque de vários trabalhos que investigam a especiação e o destino de metais. Este estudo teve como hipótese a potencial influência dos materiais de alta massa molecular excretados por três espécies fitoplanctônicas (*Anabaena spiroides*, *Microcystis aeruginosa* e *Aulacoseira granulata*), dominantes no reservatório de Barra Bonita, em relação à especiação e complexação dos metais Cu e Cd na água do reservatório. Para tanto o estudo foi dividido em investigações de campo e experimentos de laboratório. Coletas sazonais por um período de dois anos no reservatório foram avaliadas quanto às espécies dissolvidas totais, orgânicas e iônicas de Cu e Cd, a determinação dos parâmetros de complexação destes metais com ligantes presentes na água, assim como o conteúdo de carbono orgânico dissolvido e os parâmetros físico-químicos da coluna d'água. Uma modelagem da especiação química dos metais estudados foi feita com o uso das concentrações totais e os parâmetros de complexação adquiridos nas coletas sazonais. No laboratório foram obtidos os materiais de alta massa molecular excretados em cultivos das microalgas selecionadas, e o material de alta massa molecular dissolvido na água do reservatório, isolado seguindo-se o mesmo procedimento usado para os excretados algais. Estes materiais foram analisados quanto aos parâmetros de complexação com Cu e Cd, e composição monossacarídica e elementar (C, H, N e S). A especiação do Cd na água do reservatório foi dominada por formas iônicas, enquanto o Cu estava em grande maioria associado à matéria orgânica dissolvida. A água do reservatório apresentou, nas coletas sazonais, ligantes para Cu com parâmetros de complexação semelhantes em todo o período estudado. Nas condições experimentais empregadas, não foi detectada a complexação de Cd com ligantes oriundos da água do reservatório. A modelagem da especiação de Cu resultou em uma concentração semelhante de Cu^{2+} àquela medida em amostras de campo, e maior associação do Cu aos ligantes caracterizados neste estudo. O Cu foi complexado tanto pelos materiais de alta massa molecular das microalgas como também pela água do reservatório, enquanto o Cd foi complexado somente pelo material excretado pelas cianofíceas. Maiores proporções de monossacarídeos ácidos nos materiais corresponderam a parâmetros de complexação de Cu e Cd com valores mais elevados. No entanto, não foi observada uma relação entre as proporções de C, H, N e S e a complexação dos metais. Os excretados das microalgas dominantes no reservatório apresentaram ligantes para Cu com força de associação de intermediária a fraca, assim como os ligantes presentes no reservatório. Estes resultados confirmam o potencial de influência dos excretados na especiação, mobilidade e destino de metais com comportamento semelhante ao Cu, no reservatório de Barra Bonita.

Palavras-chave: Cádmiu, cobre, complexação, materiais de alta massa molecular, microalgas de água doce, reservatório de Barra Bonita, *Aulacoseira granulata*, *Anabaena spiroides*, *Microcystis aeruginosa*

E) ABSTRACT

The influence of phytoplankton and their excreted materials in natural waters have been considered important issues among metal speciation studies. This work focused on the potential influence of the high molecular weight materials excreted by dominant phytoplankton species of Barra Bonita reservoir (*Anabaena spiroides*, *Microcystis aeruginosa* and *Aulacoseira granulata*) in the speciation and complexation of Cu and Cd. Therefore, this study comprised field and laboratory studies. Seasonal samplings were made during a period of two years in the reservoir. The total, ionic and organic concentrations of Cu and Cd were determined, as well as the complexation parameters with ligands present in the reservoir water. Also, the dissolved organic carbon and physico-chemical parameters of the water column were obtained. A speciation model was applied to metal complexation parameters and total metal concentrations obtained in field investigations. Laboratory cultures of the selected microalgae were made to obtain high molecular weight excreted materials. In a similar manner, the high molecular weight materials were isolated from the reservoir water. These materials were analysed for metal complexation with Cu and Cd, monosaccharide composition and elemental analysis (C, H, N and S). In the reservoir water, Cd speciation was dominated by ionic species, while Cu was mostly associated to the dissolved organic matter. Seasonal samplings presented Cu ligands with similar complexation parameters for the entire period studied. Cd complexation was not detected in the reservoir water. The speciation model resulted in similar Cu²⁺ concentration to the mean value obtained in field analyses, and indicated higher Cu association to the ligands of the reservoir water. Cu was complexed by all high molecular weight materials studied, while Cd was complexed solely by the cyanophyte materials. Higher proportions of acid monosaccharides in the high molecular weight materials corresponded to higher Cu and Cd complexation parameters, whereas no relation between C, H, N and S proportions and metal complexation properties of the high molecular weight materials was observed. The excreted materials of dominant microalgae from Barra Bonita reservoir had Cu ligands with intermediate to weak binding strength, as those present in the reservoir water. These results indicate the potential influence of such organic materials in metal speciation, bioavailability and mobility of metals with similar behaviour to that of Cu in the reservoir water.

Keywords: Cadmium, copper, complexation, high molecular weight materials, freshwater microalgae, reservoir water, *Aulacoseira granulata*, *Anabaena spiroides*, *Microcystis aeruginosa*

1) INTRODUÇÃO

Os processos químicos e biológicos são complementares e intimamente ligados na regulação dos ecossistemas aquáticos (Buffle & DeVitre, 1993). Como exemplo, nutrientes essenciais ao crescimento e sobrevivência do fitoplâncton são transformados, através da fotossíntese, em componentes celulares. Estes compreendem as células vivas e debris após senescência e morte, como também substâncias orgânicas dissolvidas, liberadas por excreção ativa ou após a autólise. Esse conjunto de materiais fica sujeito ao consumo por heterótrofos, formação de agregados, decomposição até a remineralização e reutilização, como também são envolvidos em processos biogeoquímicos ligados à sedimentação e resuspensão de compostos na coluna d'água. Portanto, os microrganismos aquáticos podem, em muitos aspectos, afetar e modificar o ambiente abiótico aos quais estão expostos (Brönmark & Hansson, 1998).

A topografia local, hidrologia, biologia, geologia, condições climáticas e precipitação determinam a entrada e balanço de metais em corpos d'água como lagos, reservatórios e rios. No entanto, a atividade humana tem aumentado a concentração de metais em muitos dos sistemas aquáticos naturais, através de drenagem de mineração, efluentes domésticos, industriais e de agricultura. Isto tem aumentado o interesse em estudos relacionados às concentrações e transporte de metais em corpos d'água (Neubecker & Allen, 1983; Gundersen & Steinnes, 2003).

Os compostos aquáticos são constituídos de alguns poucos elementos principais, presentes em altas concentrações, e.g. C, H, O, N, S, Mg, Ca, Cl, K, Na, Si. Elementos-traço, assim chamados por normalmente estarem presentes em baixas concentrações, incluem metais essenciais à nutrição da biota, assim como metais e metalóides tóxicos. Entre os metais micronutrientes essenciais à fisiologia celular destacam-se o ferro (Fe) e cobre (Cu), presentes na composição e funcionamento de várias enzimas, como as catalases, superóxido-dismutases, citocromo oxidases, cupreínas entre outras. Outros metais como o cádmio (Cd) e mercúrio (Hg) não têm função biológica conhecida e são tóxicos. Alguns metais-traço, como o Cu, podem tornar-se tóxicos quando presentes em concentrações pouco mais elevadas que aquela requerida para o crescimento do plâncton (Simkiss, 1979; Stokes, 1983; Buffle & DeVitre, 1993).

A exposição dos organismos aquáticos aos metais-traço pode dar-se em três níveis: metais no ambiente externo, circundando a célula; interações dos metais com a membrana biológica que separa a célula do ambiente exterior; partição de metais dentro

do organismo e os efeitos biológicos inerentes da presença intracelular (Twiss *et al.* 2001). Os efeitos tóxicos do excesso dos metais aos organismos podem ser intensificados ou amenizados dependendo das características fisiológicas e genéticas dos organismos, da presença de um mecanismo intracelular de desintoxicação, e da mitigação da toxicidade no ambiente aquático antes que os metais interajam diretamente com o organismo (Jardim, 1983).

Tanto a limitação quanto a toxicidade de metais para organismos aquáticos são função da biodisponibilidade destes elementos, que por sua vez é dependente das formas químicas e físicas do metal, ou seja, da especiação. A especiação física dos metais compreende as formas dissolvidas, coloidais e particuladas, enquanto a especiação química inclui formas não complexadas e complexadas a compostos inorgânicos, como OH^- , HCO_3^- , NH_3 , PO_4^{3-} , Cl^- , e orgânicos, como exemplo aminoácidos, proteínas, ácidos húmicos e polissacarídeos (Neubecker & Allen, 1983; Allen & Hansen, 1996; Twiss *et al.* 2001). Espécies metálicas são exemplificadas na Tabela 1 (Twiss *et al.* 2001).

O estudo da especiação em águas naturais é imprescindível ao entendimento dos ciclos biogeoquímicos dos elementos nestes ambientes. A ciclagem biológica inclui a bioacumulação, a bioconcentração, a biodisponibilidade e a toxicidade, e a ciclagem geoquímica envolve o transporte, adsorção e precipitação dos elementos nos sistemas aquáticos (Florence, 1986).

Além da atividade biológica e biodisponibilidade, o destino de metais nos ambientes aquáticos também é dependente da especiação metálica (McCrary & Chapman, 1979). Elementos-traço, introduzidos em lagos e reservatórios através de rios, escoamento de água dos solos ou deposição atmosférica, são envolvidos em vários processos químicos, biológicos e físicos que determinarão as concentrações presentes na coluna d'água, em sólidos suspensos e nos sedimentos (Figura 1). Enquanto os metais nas formas livre e em solução são determinantes nas interações com a biota, a associação e deposição com materiais particulados são considerados os processos mais importantes de remoção de íons metálicos da coluna d'água. A distribuição dos metais entre compostos dissolvidos e particulados depende da composição do material particulado e dos processos de associação (adsorção a superfícies, assimilação pela biota, precipitação de fases sólidas), assim como da especiação dos íons metálicos em solução (complexação a compostos dissolvidos inorgânicos ou orgânicos). Nestes processos, tanto materiais orgânicos biogênicos (e.g. algas, debris, agregados,

excretados) quanto materiais inorgânicos (e.g. óxidos de ferro e manganês, carbonato de cálcio) contribuem para a associação e transporte dos metais. Em lagos e reservatórios, a produção fotossintética e a excreção das algas, assim como a sedimentação destes produtos são considerados processos dominantes e essenciais na remoção de íons metálicos para o sedimento (Sigg *et al.* 1987; Sigg, 1993).

Tabela 1. Exemplos de espécies metálicas de importância toxicológica e ambiental. Adaptada de Twiss *et al.* (2001).

Forma do metal	Exemplos
A. Íons livres	$Al^{3+}(H_2O)_6$ $Cu^{2+}(H_2O)_6$
B. Complexos hidroximetálicos	$AlOH^{2+}$, $Al(OH)_2^+$, $Al(OH)_4^-$ $FeOH^{2+}$, $Fe(OH)_2^+$, $Fe(OH)_4^-$ $Cu(OH)_2^0$
C. Complexos inorgânicos simples	AlF^{2+} , AlF_2^+ $CdCl^+$, $CdCl_2^0$, $CdCl_3^-$ $HgCl_2^0$, $HgOHCl^0$ $CuCO_3^0$ $CdSO_4^0$
D. Complexos orgânicos simples:	
i) sintéticos	$Cu-EDTA^{2-}$ $Cd-NTA^-$
ii) naturais	Cd -alanina Cd -citrato Fe -sideróforo
E. Complexos orgânicos poliméricos	Al , Fe , Cu , Pb ou Hg – ácidos fulvicos ou húmicos
F. Compostos mistos orgânicos e inorgânicos (Bevilacqua, 1992)	Al , Fe , Cu , Pb , Hg - ácidos fúlvicos – sílica ou alumina

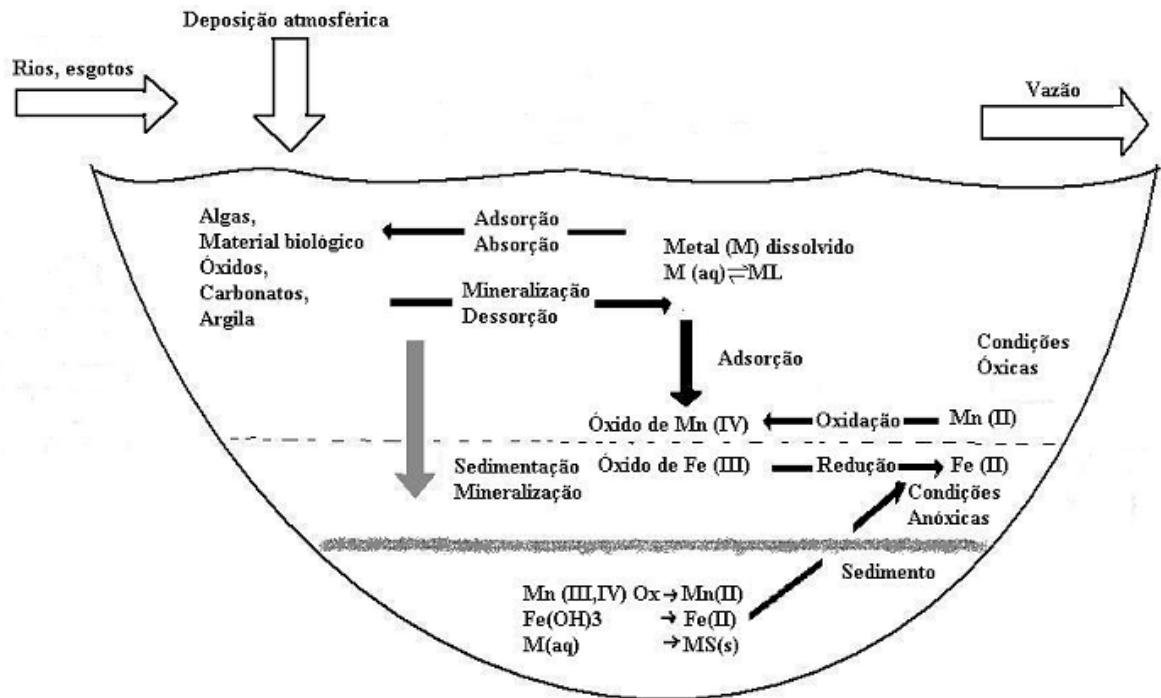


Figura 1. Representação esquemática da ciclagem de metais-traço em um lago. Adaptado de Sigg (1993). ML = metal associado a ligante.

A toxicidade de metais ao fitoplâncton tem sido relacionada diretamente às concentrações de íons livres ao invés da concentração total (Anderson & Morel, 1978; Sunda & Lewis, 1978). A complexação geralmente diminui a biodisponibilidade e toxicidade dos metais (McKnight & Morel, 1979; Bruland *et al.* 1991, Sunda & Huntsman, 1998) embora exceções ao modelo do íon livre para explicar a toxicidade tenham sido reportados. Como exemplo deste fenômeno podem ser citados os complexos com carbonatos, lipídios e citrato, que facilitam a entrada de metais nas células (Phinney & Bruland, 1994; Allen & Hansen, 1996; Errecalde *et al.* 1998, Errecalde & Campbell, 2000). Deste modo, estudos da especiação de metais em sistemas aquáticos têm aumentado em número e importância pois são obtidas informações imprescindíveis para a predição e interpretação da toxicidade dos metais aos organismos aquáticos (Twiss, 1996; Sunda & Huntsman, 1998).

Várias são as metodologias e equipamentos usados no estudo da especiação e complexação de metais em meio aquoso. Alguns deles são citados abaixo, com exemplos de trabalhos que os empregaram:

a) Voltametria de redissolução catódica com troca de ligantes competitivos, LE-CSV (Xue & Sigg, 1993; Moffett, 1995; Achterberg *et al.* 2002; Twiss & Moffett, 2002); voltametria de redissolução anódica com pulso diferencial, DPASV (Chau *et al.* 1974; Kozarac *et al.* 1989; Mylon *et al.* 2003).

b) Gradiente de difusão em filmes finos, DGT (Zhang & Davidson, 2001; Twiss & Moffett, 2002)

c) Eletrodos íon seletivos, ISE (Fish & Morel, 1983; Lombardi & Vieira, 1998)

d) Bioensaios (Morrison & Florence, 1989)

e) Espectrometria de absorção atômica, AAS (Mylon *et al.* 2003)

f) Resinas de troca iônica (Morrison & Florence, 1989)

g) Traçadores radioativos (Achterberg *et al.* 2002; Garnier & Guieu, 2003)

h) Extinção de fluorescência (Saar & Weber, 1982; Lombardi & Jardim, 1997)

A especiação dos metais é muitas vezes determinada através da combinação entre várias técnicas (e.g. Morrison & Florence, 1989; Achterberg *et al.* 2002; Twiss & Moffett, 2002; Mylon *et al.* 2003). Também são muito utilizadas modelagens da especiação de metais, feitas com auxílio de programas de computador, desde que haja informação detalhada das reações de complexação, como concentrações e constantes de estabilidade condicional dos ligantes e estequiometria dos compostos. Estes modelos são usados para cálculo indireto da concentração dos íons livres em ambientes naturais

(e.g. Mylon *et al.* 2003), como também em estudos do efeito dos íons no crescimento e toxicidade para células algais (e.g. Macfie *et al.* 1994; Ahner & Morel, 1995; Lombardi *et al.* 2002).

Vários estudos de especiação em meio aquoso consideram a importância da matéria orgânica dissolvida (MOD) como agente complexante de metais. Sunda & Lewis (1978) relataram que mais de 99 % do Cu em água filtrada (< 0,45 µm) do Rio Newport encontrava-se complexado, e que após tratamento com ultra-violeta (UV), apenas um mínimo de Cu continuou complexado, provavelmente a carbonatos e hidróxido-complexos. O estudo demonstrou a natureza orgânica dos ligantes dissolvidos. Gächter *et al.* (1978) relataram que em águas naturais cerca de 70 % do Cu encontrava-se presente entre as frações dissolvidas (< 0,45 µm) e não ultrafiltradas (> 1000 Da), confirmando as macromoléculas orgânicas como as responsáveis pela complexação. Vários outros trabalhos mostraram que em lagos, uma grande fração (> 90 %) do Cu dissolvido encontrava-se complexado a ligantes orgânicos (Xue & Sigg, 1993; Achterberg *et al.* 2002).

Ubíqua nos ambientes aquáticos, a MOD encontra-se presente em concentrações da ordem de 1 a 15 mg C L⁻¹. Geralmente, ácidos húmicos e fúlvicos são os constituintes da MOD presentes em maiores quantidades, principalmente quando são considerados os ambientes aquáticos dulcícolas. As substâncias húmicas constituem cerca de 50 a 80 % da MOD (Buffle, 1988). O tamanho destes compostos, considerados de difícil degradação, varia de pequenas moléculas (< 1000 Da) a macromoléculas (> 100.000 Da), com uma grande variedade de grupos funcionais que contêm oxigênio, como ácidos carboxílicos e grupos fenólicos em maioria, mas também em menor quantidade grupos sulfidríla, aminas e outros (Campbell *et al.* 1997). Rijstenbil & Gerringa (2002) sugerem que os ligantes orgânicos para metais incluem exudatos algais e produtos da biodegradação de várias origens, como também compostos sintéticos, como aqueles oriundos de efluentes industriais.

Alguns trabalhos propõem origem mais recente aos agentes complexantes de metais na coluna d'água. Bruland *et al.* (1991) citam que a concentração de ligantes para muitos metais é maior na zona eufótica do mar aberto e decresce até níveis não detectáveis em águas profundas. Os autores concluem que tal distribuição dos ligantes nos oceanos indica a origem biológica recente ao invés de compostos refratários. Outros autores mostraram que altas concentrações de ligantes coincidiram com máximos de clorofila no Mar de Sargasso, sugerindo a produção fitoplanctônica como

fonte dos agentes complexantes de Cu (Moffett, 1995). Xue & Sigg (1993) concluíram que os ligantes para Cu presentes no lago eutrófico Greifen foram produzidos por algas, pois os autores encontraram que as concentrações iônicas de Cu foram baixas durante o crescimento excessivo de algas na primavera, e altas no inverno. Dessa maneira, Xue e Sigg mostraram que a concentração de Cu iônico obedeceu um padrão sazonal similar ao da produtividade algal. Achterberg *et al.* (1997) acharam a maior concentração de ligantes naturais dissolvidos para o Cu durante um período de crescimento excessivo do fitoplâncton no lago Esthwaite Water, reforçando a importância dos materiais algais (exudatos e produtos de decomposição) na complexação deste metal.

Em particular, estudos da interação dos produtos fitoplanctônicos com metais-traço em sistemas aquáticos naturais são de grande interesse devido ao papel do fitoplâncton como a base de cadeias alimentares (Kozarac *et al.* 1989). Além disso, sabe-se que células fitoplanctônicas liberam grande quantidade de materiais orgânicos ao ambiente (Vieira & Myklestad, 1986; Myklestad, 1995). Os materiais orgânicos das células algais são produtos finais originados da atividade fotossintética. A liberação destes materiais para o ambiente pode ocorrer por diferentes processos, entre eles a morte celular e consequente autólise das células ou lise por parasitas intra e extracelulares, o 'grazing' e quebra mecânica pelo zooplâncton, e ainda a excreção celular, por células saudáveis ou não (Fogg, 1977, 1983; Sharp, 1977; Aaronson, 1978; Mague *et al.* 1980).

A excreção do carbono fotoassimilado para o meio aquático é considerada um processo natural e comum entre as algas, podendo representar de 1 a 95 % da fotossíntese líquida (Fogg, 1983). Esta variação depende da disponibilidade de nutrientes, fatores físico-químicos como irradiação e temperatura, diferenças inter-específicas e condições fisiológicas das células (Hellebust, 1965; Vieira, 1982; Vieira & Teixeira, 1982; Vieira & Myklestad, 1986; Cáceres & Vieira, 1988). Uma ampla variedade de moléculas biológicas constitui os produtos de excreção das células algais, como proteínas, ácidos nucleicos, lipídios e carboidratos (Fogg, 1983). Entretanto, materiais de alta massa molecular, como os polissacarídeos, compõem a maior parte da excreção total de materiais orgânicos (Vieira & Myklestad, 1986; Myklestad, 1995).

O papel ecológico e fisiológico dos polissacarídeos excretados por microalgas é bastante especulado. Várias funções têm sido propostas, como a utilização dos polissacarídeos como fonte de energia por microrganismos heterotróficos (Fogg, 1983), efeitos na coevolução de comunidades microbianas complexas (Wood & van Valen,

1990), interferência na troca de substâncias com o meio, como por exemplo captura de nutrientes e associações com íons metálicos (Brook, 1981; Lombardi & Vieira, 1999, 2000). Além disso, têm sido propostas as funções de redução das taxas de afundamento devido às cápsulas e bainhas extracelulares (Hutchinson, 1967; Walsby & Reynolds, 1980), que também dificultariam a predação por organismos zooplancônicos (Porter, 1973; Reynolds, 1984), promoveriam condições favoráveis para a manutenção da atividade de determinadas enzimas (Spijkerman & Coesel, 1998), além da participação na formação de agregados gelatinosos (Leppard, 1995; Grossart & Simon, 1993; Grossart *et al.* 1997).

Materiais de alta massa molecular (MAMM), em grande parte polissacarídeos excretados por microalgas de água doce e marinhas, foram caracterizados e quantificados (Lupescu *et al.* 1991; Paulsen & Vieira, 1994; Vieira & Paulsen, 1994; Vieira *et al.* 1994; Huang *et al.* 1998; Nicolaus *et al.* 1999; Gouvêa *et al.* 2000). Estima-se que a complexação com metais ocorra através das interações de cargas negativas de grupos aniônicos presentes nas macromoléculas (Manzini *et al.* 1984), tais como os grupos carboxila presentes nos polissacarídeos com cátions tais como o Cu no meio aquático (Leppard, 1995). Estudos da complexação dos MAMM com cátions divalentes como o Cu sugerem que ambos, o metal e os MAMM, têm os mesmos destinos no ambiente aquático enquanto durar esta associação (Kaplan *et al.* 1988; Lombardi & Vieira, 1998, 1999, 2000). Ainda, os MAMM podem contribuir significativamente ao conteúdo de carbono orgânico dissolvido (COD) local, particularmente no fim do crescimento excessivo do fitoplâncton (Mopper *et al.* 1995). Para tanto, cultivos em laboratório auxiliam no estabelecimento da importância de associações entre metais e excretados de microalgas e sua contribuição para a especiação de metais em águas naturais (Rijstenbil & Gerringa, 2002).

Trabalhos sobre a comunidade fitoplanctônica do reservatório de Barra Bonita têm demonstrado a dominância de algumas microalgas, principalmente representadas pelos gêneros *Microcystis aeruginosa*, *Anabaena spiroides* e *Aulacoseira granulata*, comumente em crescimento excessivo neste reservatório eutrofizado (Calijuri & Dos Santos, 1996; Jati, 1998). Baseando-se nas considerações apresentadas anteriormente, é estimado que a especiação e complexação de metais na água do reservatório de Barra Bonita sofra grande influência de espécies fitoplanctônicas dominantes, através da produção e excreção de materiais orgânicos que atuam como ligantes de metais.

2) HIPÓTESES E OBJETIVOS

A hipótese deste trabalho está centrada no potencial dos materiais de alta massa molecular excretados por microalgas dominantes no reservatório de Barra Bonita atuarem como ligantes e influenciadores da especiação de íons metálicos na coluna d'água. Em complemento à hipótese, o trabalho abordou também o estudo da complexação e especiação de metais na água do reservatório de Barra Bonita.

Este trabalho teve como objetivo principal o estudo da complexação de metais com os materiais excretados por espécies dominantes no reservatório eutrofizado de Barra Bonita. É esperado que estes compostos orgânicos atuem como ligantes para metais, tanto no microhabitat próximo às células, quanto no restante da coluna d'água. Assim, os compostos orgânicos excretados pelas microalgas influenciariam a especiação, biodisponibilidade, mobilidade e toxicidade dos metais presentes nestes ambientes, além de representarem potenciais contribuidores para a carga local de matéria orgânica. Cabe ressaltar que o enfoque na fração de alta massa molecular (MAMM) se deve ao fato de a mesma ser considerada como a maior parte na excreção de compostos orgânicos pelo fitoplâncton. Para tanto, os objetivos específicos deste trabalho foram:

i- Fazer um levantamento da especiação dos metais previamente selecionados (Cu e Cd), assim como a complexação destes com compostos dissolvidos na água do reservatório, em investigações de campo sazonais durante um período de dois anos. As seguintes determinações foram feitas:

i.a- determinação das concentrações totais, iônicas e associadas à matéria orgânica na fração dissolvida ($< 0,45 \mu\text{m}$);

i.b- determinação dos parâmetros de complexação dos metais com os ligantes presentes na fração dissolvida, quando houver associação;

i.c- quantificação do carbono orgânico dissolvido e de parâmetros físico-químicos da coluna d'água.

ii- Estudar a associação dos metais selecionados com os materiais de alta massa molecular (MAMM) excretados por três espécies oriundas do reservatório e consideradas como dominantes na comunidade fitoplanctônica local, envolvendo:

ii.a- cultivo unialgal ou axênico das espécies selecionadas e análise das curvas de crescimento;

ii.b- obtenção dos materiais de alta massa molecular na fase estacionária do cultivo;

ii.c- determinação dos parâmetros de complexação dos MAMM com os metais selecionados;

ii.d- análises da composição monossacarídica e das proporções dos elementos C, H, N e S dos MAMM.

Da maneira acima exposta, pretendeu-se avaliar o potencial de complexação dos MAMM de microalgas dominantes no fitoplâncton do reservatório, comparando a especiação dos metais e a complexação com os ligantes presentes na água do reservatório, para então ser possível inferir sobre a contribuição destes materiais para o destino de metais no reservatório.

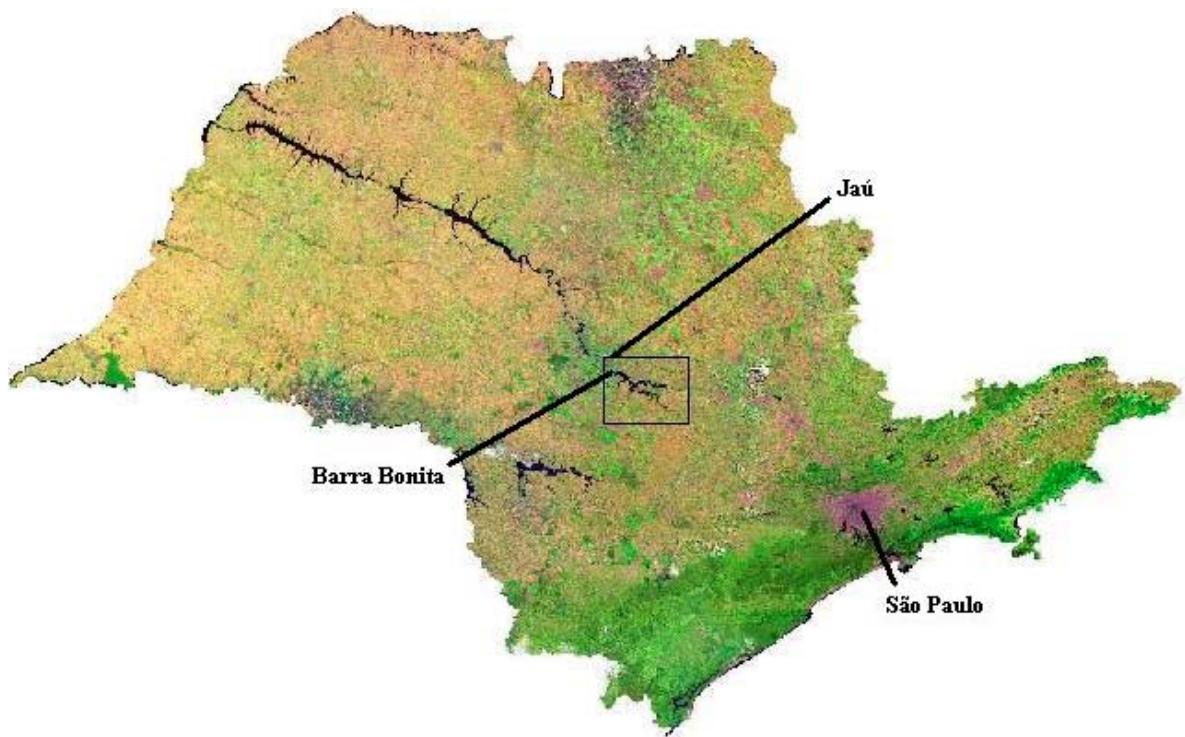
3) METODOLOGIA

3.1) Área de estudo

As amostras de campo e as microalgas do estudo de laboratório deste trabalho foram coletadas em um ponto amostral do reservatório eutrófico de Barra Bonita (Figura 2), localizado em 22° 32' 34,5" S e 48° 29' 26,4" W, a cerca de 3 km da barragem da usina hidrelétrica de Barra Bonita. Na Tabela 2 (Straškraba & Tundisi, 2000; CETESB, 2002) são apresentadas as características principais deste reservatório que é o primeiro de uma série de reservatórios artificiais do Rio Tietê. O reservatório foi construído em 1963 com o intuito principal de geração de energia elétrica para uma área de alta densidade populacional e industrializada do estado de São Paulo. Usos secundários incluem o suprimento de água, agricultura, irrigação, recreação e navegação. A descarga de efluentes domésticos e industriais recebida através dos tributários do reservatório influencia os níveis de contaminantes químicos, como também de material orgânico alóctone e autóctone gerado pela produção primária. Altos níveis de nutrientes, uma das características deste reservatório, têm favorecido o crescimento intenso do fitoplâncton. A comunidade fitoplanctônica é dominada por algumas poucas espécies, como as cianofíceas *Microcystis aeruginosa* e *Anabaena spiroides* e a diatomácea *Aulacoseira granulata*, as quais são comumente dominantes, apresentando crescimento excessivo (Calijuri & Dos Santos, 1996; Jati, 1998). Portanto, é previsto que o material orgânico produzido por estes organismos contribua significativamente à carga local de MOD (Gouvêa *et al.* 2004).

O clima da região onde localiza-se o reservatório é caracterizado pela transição entre tropical e subtropical, com o mês de janeiro como o mais quente (temperatura média $\cong 27$ °C) e julho como o mais frio ($\cong 18$ °C); porém, não há grandes diferenças entre estações a não ser pela estação chuvosa no verão e estação seca de inverno (Calijuri & Dos Santos, 2001).

Os rios Tietê e Piracicaba são os principais formadores e influenciadores da qualidade da água do reservatório de Barra Bonita. O Rio Tietê tem o regime hídrico alterado de lótico para lântico ao atingir o reservatório. Apesar do reservatório ser classificado como eutrófico, há um gradiente de melhora da qualidade da água ao longo do corpo central, o que reflete uma grande capacidade assimilativa, importante para a recuperação da qualidade da água (CETESB, 2002).



Ponto de coleta



Figura 2. Reservatório de Barra Bonita, com o ponto de coleta das microalgas e de amostras de campo. Adaptado de Calijuri (1999).

Tabela 2. Características principais do reservatório de Barra Bonita. Adaptada de Straškraba & Tundisi, 2000 e CETESB, 2002.

Bacia hidrográfica	Rio Tietê Médio-Superior
Coordenadas geográficas	22 ° 29'S; 48° 34'W
Área de drenagem da bacia hidrográfica	7.079 km ²
Volume do reservatório	3,6 x 10 ⁶ m ³
Altitude	430 m
Área superficial do reservatório	32.484 ha
Profundidade máxima	25 m
Profundidade média	10 m
Comprimento	48 km
Largura média	2 km
Forma	Vale do rio
Faixa de flutuação anual do nível de água	5 m
Tempo de retenção teórico	90 dias
Classificação trófica	Eutrófico

3.2) Espécies fitoplanctônicas. Isolamento e manutenção em laboratório

As cianofíceas *Microcystis aeruginosa* (Kützing) Lemmermann, *Anabaena spiroides* Klebahn (Cyanophyta) e a diatomácea *Aulacoseira granulata* (Ehrenberg) Simonsen var. *granulata* (Heterokontophyta) foram selecionadas por representarem espécies fitoplanctônicas dominantes no reservatório. Após a coleta, no mesmo ponto da amostragem de campo, foi feito o isolamento por lavagem das células, com o uso de micropipetas e microscópio (Pringsheim, 1946). A diatomácea foi cultivada em meio WC (Guillard & Lorenzen, 1972) e as cianofíceas em meio ASM-1 (Gorham *et al.* 1964). As condições de cultivo estão resumidas na Tabela 3. As espécies são mantidas na coleção de culturas de microalgas de água doce do laboratório de Ficologia da Universidade Federal de São Carlos (SP, Brasil). Foram obtidas culturas axênicas de *A. granulata* segundo o método desenvolvido por Vieira (1983), com o uso de 0,5 % v/v de solução de Dakin em meio WC. O estado axênico foi testado com repicagens em tubos contendo o meio WC adicionado de peptona e glicose para revelação de contaminação por bactérias e fungos. Somente cultivos unialgais das cianofíceas foram usados devido à impossibilidade de axenização destas espécies durante o desenvolvimento deste trabalho e pelo método citado.

Tabela 3. Condições de cultivo das microalgas estudadas em laboratório.

Fotoperíodo	12:12h (lâmpadas fluorescentes de 40 W)
Intensidade luminosa	265 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$
Temperatura	20 - 22 °C
pH	6,8 – 7,0

A diatomácea *A. granulata* pertence à divisão Heterokontophyta, classe Bacillariophyceae e ordem Centrales. As células são cilíndricas, mais longas do que largas e se aderem umas às outras pela superfície valvar (de frústula de sílica), sendo organizadas em filamentos longos, simples e unisseriais (Bourrely, 1968). É uma espécie planctônica, considerada importante em lagos. As células não têm mecanismo de flutuação e sua posição na coluna d'água depende tanto da taxa de afundamento quanto da resuspensão por movimentos verticais causados por ventos e correntes.

M. aeruginosa pertence à divisão Cyanophyta, classe Cyanophyceae e ordem Chroococcales. É uma espécie colonial, com um número grande de células esféricas que se dividem irregularmente e ficam envoltas em mucilagem. As populações se tornam abundantes principalmente no verão, formando acúmulos na superfície de lagos e poças devido à presença de vacúolos de gás capazes de regular a posição das colônias na coluna d'água (van den Hoek *et al.* 1995). Esta espécie tem importância sanitária devido ao potencial de formação de 'blooms' tóxicos, sendo a microcistina a toxina mais comumente produzida (Orr & Jones, 1996).

A. spiroides é outra cianofícea (divisão Cyanophyta, classe Cyanophyceae), que pertence à ordem Nostocales. As células são dispostas em tricomas (filamento + bainha de mucilagem) simples e unisseriais, e unidas por uma constricção entre elas, tornando o aspecto do filamento, que pode ser curvado ou espiralado, como um colar de pérolas (van den Hoek *et al.* 1995). Os heterocistos e acinetos são células diferenciadas que têm as funções de capacidade de fixação de N_2 e de esporo de resistência, respectivamente. As populações são encontradas em águas doces na maioria dos casos, e podem causar 'blooms' superficiais, devido à presença de vacúolos de gases. Também é uma espécie capaz de produzir toxinas.

3.3) Seleção dos metais estudados

Foi feita uma análise prévia ($n = 1$) da concentração total dissolvida (filtro de acetato de celulose Schleicher & Schuell, Dassel, Alemanha, 0,45 μm de diâmetro de poro) de dez metais-traço, selecionados devido à importância nutricional ou tóxica, de água coletada a 1 m de profundidade no ponto amostral em 26/07/2000. As amostras tiveram pH ajustado para 2 com HNO_3 ultrapuro e foram conservadas a 4° C até a análise. A digestão foi feita em capela, com HNO_3 concentrado e as concentrações dos metais (Tabela 4) foram determinadas no Centro de Caracterização de Materiais (CCDM) da UFSCar, por espectrometria de absorção atômica (AAS - Varian Spectra aa220).

Destes metais, foram selecionados o Cu e o Cd em razão de:

i. estarem presentes no reservatório em concentrações totais dissolvidas que, segundo os padrões de qualidade de água da Legislação Federal (CONAMA 20/86) para as classes de uso das águas, estão em torno dos limites máximos para a classe 1 no caso do Cu ($3,2 \times 10^{-7}$ M), e excedem os valores máximos para as classes 1, 2 e 3 ($8,9 \times 10^{-9}$ M, $8,9 \times 10^{-9}$ M e $8,9 \times 10^{-8}$ M, respectivamente) no caso do Cd;

ii. terem comportamentos distintos de afinidade por materiais orgânicos e inorgânicos dissolvidos na coluna d'água. Em águas naturais o Cu geralmente encontra-se associado à matéria orgânica, enquanto o Cd, com menor afinidade pelos materiais orgânicos, tende a ser encontrado na forma livre ou associado a complexos lábeis inorgânicos (HCO_3^- , SO_4^{2-} , Cl^- , Ca^{2+}) (Florence, 1977, 1986; Buffle & DeVitre, 1993).

iii. serem tóxicos para a biota, dependendo da concentração e da especiação físico-química.

O íon Cu^{2+} pertence ao grupo II, dos metais de transição, caracterizado por ter afinidade a sítios de ligação tanto fracos como fortes, e portanto reagir com sítios contendo oxigênio como doador de elétrons, assim como sítios carboxílicos e fenólicos, e mesmo sítios fracos que contêm N e S. (Buffle & DeVitre, 1993). É classificado como micronutriente por ser constituinte de sítios de atividade de algumas enzimas, mas torna-se tóxico em concentrações elevadas, causando, por exemplo, turgidez excessiva e lise das células fitoplanctônicas (Simkiss, 1979; Rijstenbil & Gerringa, 2002). A poluição ambiental por Cu tem como origens as indústrias de mineração, fundição e refinação, tal como a precipitação atmosférica causada por elas, efluentes de esgotos domésticos, algicidas, fungicidas e pesticidas (CETESB, 2003).

O Cd^{2+} pertence ao grupo III dos metais, com associação predominante em sítios relativamente fracos, por exemplo, os que contêm S como doador de elétrons. Não foi ainda descoberta alguma função em sistemas biológicos para este metal (Stokes, 1983), e efeitos tóxicos ao fitoplâncton já foram demonstrados (Rachlin *et al.* 1984). A contaminação ambiental por Cd é devido à queima de combustíveis fósseis, efluentes industriais e uso de inseticidas que o contém (CETESB, 2003).

Tabela 4. Concentrações totais de dez metais presentes no reservatório em uma amostra (n =1) coletada em 26/07/2000, analisada no Centro de Caracterização de Materiais – UFSCar, por espectrometria de absorção atômica.

Metais	Concentração	
	M	mg L ⁻¹
Cr	$< 5,0 \times 10^{-7}$	< 0,026
Fe	$1,1 \times 10^{-6}$	0,060
Mn	$6,6 \times 10^{-7}$	0,036
Ni	$1,9 \times 10^{-7}$	0,011
Zn	$< 1,4 \times 10^{-7}$	< 0,009
Pb	$< 5,1 \times 10^{-7}$	< 0,106
Hg	$5,6 \times 10^{-7}$	0,112
Cd	$< 1,1 \times 10^{-7}$	< 0,012
Cu	$< 3,9 \times 10^{-7}$	< 0,025
Co	$< 2,9 \times 10^{-7}$	< 0,017

3.4) Estudo de campo

3.4.1) Coleta das amostras

Coletas sazonais foram realizadas a cada 3 meses e por um período de 2 anos, entre março de 2001 a abril de 2003. A coleta de água para todas as análises foi feita a 1 m da superfície, na coluna fótica, e um ponto passível de representação da coluna d'água em situações de mistura ou desestratificação, como ocorre com frequência neste reservatório em estudos prévios (Barbosa *et al.* 1999; Calijuri & Dos Santos, 2001).

A água do reservatório foi coletada conforme Mart (1979), em garrafa de van Dorn, construída com PVC e silicone. As amostras foram acondicionadas em

Erlenmeyers de policarbonato (PC) previamente lavados por imersão em solução ácida (HNO_3 0,1 M, 10 dias).

Como todas as análises compreenderam a fração dissolvida da água do reservatório, foi feita a filtração das amostras com filtros de acetato de celulose (0,45 μm Schleicher & Schuell, Dassel, Alemanha). Os filtros foram previamente imersos em HNO_3 1 M por 24 h e lavados com 100 mL de água destilada (destilador em vidro) ou ultrapura para eliminar metais, carboidratos contaminantes e corrigir a acidez (Silva, 1996; Lombardi & Vieira, 1998). Portanto, a filtração foi feita em laboratório em seguida à coleta.

Amostras para as análises de metais e COD foram transportadas e conservadas a ± 4 °C, no escuro (Florence, 1977). As amostras para análise dos monossacarídeos foram preservadas em freezer (Mopper *et al.* 1995).

3.4.2) Variáveis físico-químicas

Dados de pH, temperatura, oxigênio dissolvido, condutividade, potencial de oxido-redução, turbidez, sólidos totais dissolvidos e concentrações dos íons amônio, nitrato e cálcio foram coletados em intervalos de 2 m na coluna d'água, com um sistema de monitoramento da qualidade de água (Horiba U-23, Kyoto, Japão).

A transparência da água foi medida com Disco de Secchi (Z_{DS}). O perfil de irradiação na coluna d'água foi obtido com as medidas de irradiância (E , $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), em radiômetro (LI-1400, LI-COR Inc., Lincoln, NE, USA) com sensor esférico de quantum (LI-190-AS). O coeficiente de extinção vertical (k_d), que caracteriza a atenuação da luz na coluna d'água, foi estimado a partir da inclinação da reta de regressão linear da profundidade versus o $\ln E$. A zona eufótica (Z_{eu}) foi calculada com a equação (1) apresentada em Wetzel (1975):

$$Z_{eu} = \ln(100) / k_d. \quad (1)$$

O carbono orgânico dissolvido (COD) das amostras filtradas foi quantificado em um analisador de carbono orgânico total (TOC-5000A - Total Organic Carbon Analyzer – Shimadzu Corporation, Kyoto, Japão).

A concentração de clorofila-a das amostras de fitoplâncton retido em filtro de acetato de celulose (0,45 μm de diâmetro do poro), foi determinada através de extração com acetona 90 % (24 h). Esta metodologia encontra-se descrita em Talling & Driver (1963).

3.4.3) Análise dos monossacarídeos de amostras da água do reservatório

Os monossacarídeos neutros foram identificados e quantificados por cromatografia líquida de alta resolução (HPLC –High Pressure Liquid Chromatography) com detector por pulso amperométrico (PAD ED-40) e coluna de separação PA-10 (Dionex Corporation, Sunnyvale, CA, USA) seguindo-se a metodologia descrita por Wicks *et al.* (1991), Mopper *et al.* (1992) e Gremm & Kaplan (1997). Os monossacarídeos fucose, ramnose, arabinose, galactose, glicose, manose, xilose, frutose e ribose (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, USA) foram usados na padronização. Manose e xilose apresentaram o mesmo tempo de retenção com a metodologia usada, e portanto a identificação e quantificação destes monossacarídeos foi feita em conjunto. Monossacarídeos ácidos e aminados não foram analisados devido às suas cargas. Estas os retêm no tratamento de dessalinização da amostra. Amostras de campo filtradas (0,45 µm) foram submetidas à hidrólise e dessalinização para obtenção dos monossacarídeos neutros totais, enquanto os monossacarídeos livres foram analisados em amostras filtradas mas não hidrolisadas. A dessalinização foi feita com resinas aniônica (AG 2-X8 20-50 mesh chloride form, BioRad, Hercules, CA, USA) e catiônica (AG 50W-X8 50-100 mesh hydrogen form, BioRad). A hidrólise foi feita após adição de 150 µL de HCl em 5 mL de amostra e aquecimento em estufa a 100 °C por 12 h.

3.4.4) Análises dos metais

Todas as análises, incluindo as titulações complexométricas, foram feitas com temperatura controlada (22 ± 2 °C) e força iônica (I) ajustada para 0,1 M com NaNO₃ (MicroSelect, Fluka Chemie GmbH, Buchs, Suíça). Para minimizar os efeitos da adsorção dos metais nos recipientes, foram usados recipientes plásticos e de policarbonato (PC), com exceção das celas polarográficas (vidro). Todos os recipientes foram lavados por imersão em HNO₃ analítico 1 M, e as celas polarográficas com HNO₃ 6 M. O uso de água destilada em destilador de vidro foi posteriormente substituído pelo uso de água ultrapura (início de 2002) com condutividade 18 Ω (Barnstead International, Dubuque, Iowa, USA) tanto para as lavagens quanto para a confecção de brancos das determinações de metais. Os recipientes foram lavados no momento de uso, ou então foram secados em estufa e embalados em sacos plásticos para evitar contaminação. Os padrões concentrados de Cu (1mg mL⁻¹ CuCl₂, Titrisol[®],

Merck, Whitehouse Station, New Jersey, EUA) e Cd (1mg mL^{-1} Cd $(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, Carlo Erba reagenti, Milão, Itália) foram conservados a 4°C e preparados por diluição serial em concentrações apropriadas para as titulações.

3.4.4.1) Especificação de Cu e Cd na água do reservatório

A proposta de estudo da especificação química dos metais Cu e Cd é apresentada na Figura 3.

O metal iônico (M^+) foi determinado por potenciometria com eletrodos seletivos (ISE) aos íons Cu^{2+} (ATI ORION, modelo 94-29, Boston, MA, EUA) ou Cd^{2+} (ATI ORION 9448), em conjunto com eletrodo de referência Ag/AgCl de dupla-junção (ATI ORION 90-02). Os potenciais foram obtidos com um medidor de pH/ISE (ATI ORION 710A), em pH natural mantido com $7,5 \times 10^{-3}$ M de tampão PIPES (Piperazina – N, N' – bis [2 – ácido etanosulfônico], Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA). Curvas de calibração dos eletrodos foram feitas em pH 5,0 para assegurar que todo o metal encontrava-se na forma iônica. Soluções de tampão metálico foram feitas com o uso de Cu (ou Cd), NTA (ácido nitrilo-triacético) e bórax (H_3BO_3) para estender os limites de detecção das curvas de calibração para $2,0 \times 10^{-13}$ M de Cu e $1,4 \times 10^{-10}$ M de Cd (Jardim *et al.* 1986). Informações adicionais relacionadas a tampões metálicos e limites de detecção para ISE são apresentadas em Lombardi & Vieira (2000). Foi feita uma regressão linear dos pontos da calibração para a obtenção da fórmula de cálculo da concentração de metal iônico a partir das leituras em mV e também para verificar o comportamento Nernstiano, que ocorre com coeficiente angular da reta de valor entre $25 - 30^\circ$. A descrição e teoria da equação de Nernst e cálculos citados acima são encontrados em Covington (1984) e Evans (1987). Curvas de calibração para Cd e Cu estão exemplificadas nas Figuras 4 e 5.

As concentrações de metal total (M_{tot}), metal associado à matéria orgânica (M_{MO}) e metal lábil ($\text{M}_{\text{láb}}$) foram determinadas por voltametria de redissolução anódica com pulso diferencial (DPASV) em polarógrafo com eletrodo de mercúrio gotejante (EG & G Electrochemical Trace Analyzer, modelo 394, eletrodos modelo 303A Princeton Applied Research, Princeton, New Jersey, EUA). Os parâmetros usados são descritos na Tabela 5. O limite de detecção foi calculado segundo Poldoski & Glass (1978), correspondente a duas vezes a média dos erros-padrão para duas análises distintas com baixa concentração de metais.

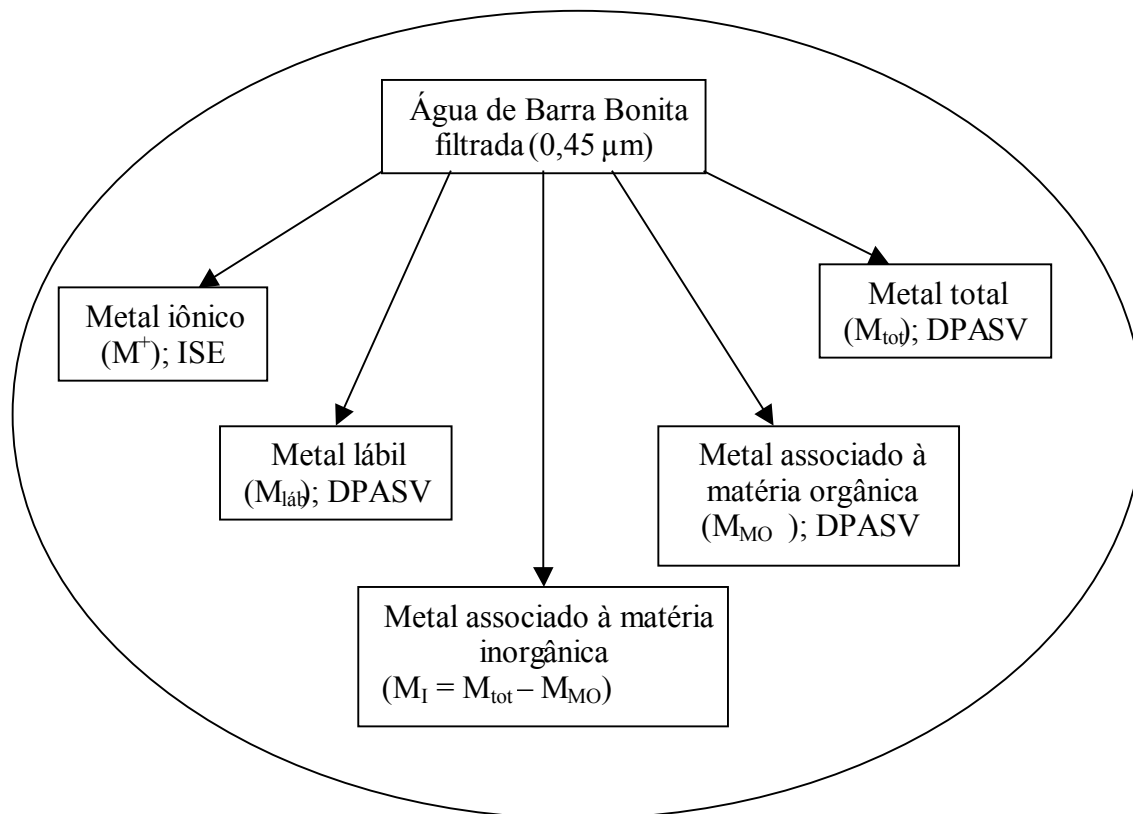


Figura 3. Esquema de especificação dos metais Cu e Cd para a água filtrada (0,45 µm) do reservatório. ISE = eletrodos íon-seletivos. DPASV = voltametria de redissolução anódica.

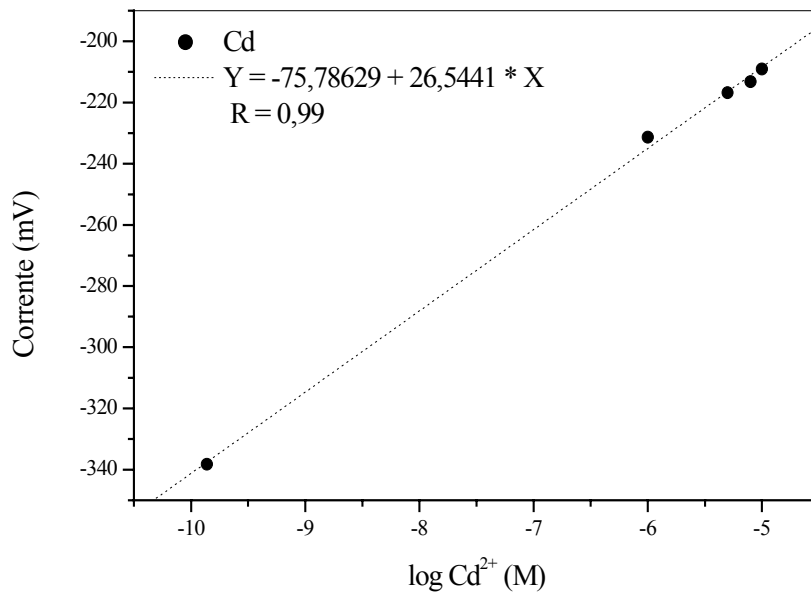


Figura 4. Curva de calibração para o eletrodo íon seletivo de Cd. Eletrodo de referência: Ag/AgCl.

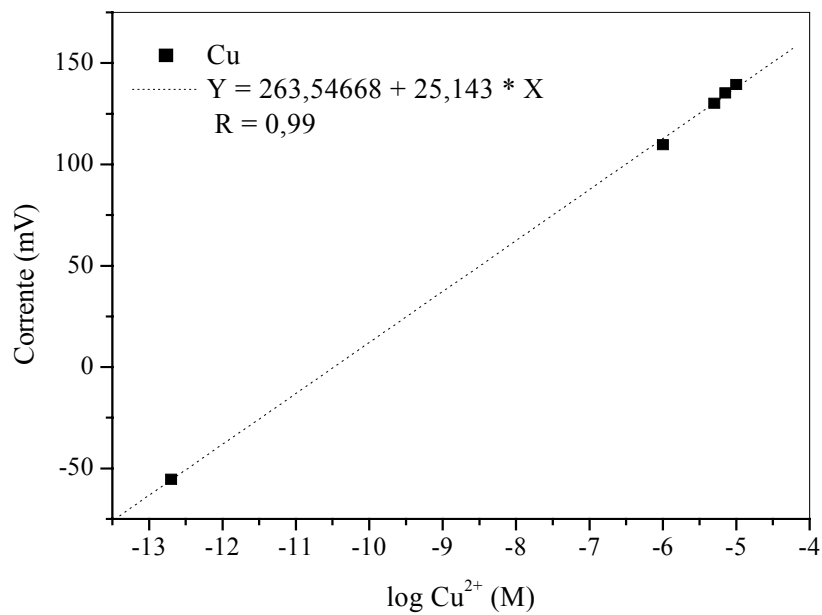


Figura 5. Curva de calibração para o eletrodo íon-seletivo de Cu. Eletrodo de referência: Ag/AgCl.

Tabela 5. Parâmetros para a determinação dos metais cobre e cádmio por DPASV.

Tempo de deposição	200 s
Tempo de equilíbrio	30 s
Potencial inicial (ou de deposição)	-0,9 V
Potencial final	0 V
Pulso (altura)	25 mV
Varredura	6,67 mV s ⁻¹
Eletrodo de referência	AgCl
Eletrodo de trabalho	HMDE
Tamanho da gota	Médio
Gás de purga	Nitrogênio P. A.
Tempo de purga (entre leituras)	30 s
Tempo de purga inicial (para a amostra)	16 min

O metal lábil ($M_{\text{láb}}$), que compreende as espécies iônicas e os complexos fracos, foi analisado segundo a metodologia de adição de padrão interno de Ostapczuk *et al.* (1987), com uso de tampão PIPES ($7,5 \times 10^{-3}$ M) para manter o pH ajustado em 6,8-6,9.

A quantificação do metal total (M_{tot}) foi feita em $\text{pH} \cong 2,0$, sem tampão, e também por adição de padrão interno, após acidificação da amostra com HNO_3 2 M ultrapuro (TraceSelect, Fluka Biochemika) e fervura por 5 minutos (Batley & Florence, 1976).

O metal associado à matéria orgânica (M_{MO}) foi quantificado após a fotodegradação desta em um reator (Campos *et al.* 2001) através de luz ultravioleta (UV). Testes de tempo de exposição da água de Barra Bonita (filtrada) à luz UV no reator (Tabela 6), com quantificação prévia e posterior das concentrações de carbono orgânico (descrição no item 3.4.2), confirmaram a destruição da matéria orgânica em 6 h, ou então em 4 h adicionando-se H_2O_2 (grau analítico, Merck) em concentração final de 10 mM, como catalisador da fotodegradação. Para assegurar a fotodegradação em amostras com concentrações distintas de COD, foi padronizada a exposição das amostras ao reator por 8 h. A eficiência da exposição ao UV por 8 h foi confirmada por análises de fluorescência (Campos *et al.* 2001). Leituras da intensidade de fluorescência

de emissão das amostras foram feitas usando-se um espectrofluorímetro (FP 6500, Jasco Corporation, Tokyo, Japão). As leituras foram feitas em cubetas com caminho óptico de 1 cm, em comprimento de onda excitação de 313 nm e varredura de emissão de 330 a 600 nm, e larguras da fenda de excitação e de emissão de 10 e 2,5 mm, respectivamente. O pico de 416 nm (Tabela 7), de amostras antes da exposição ao UV, não foi detectado após a exposição, comprovando a quebra do COD representada por este pico.

Tabela 6. Teste de destruição da matéria orgânica presente na amostra filtrada do reservatório usando-se o reator de fotodegradação. Temperatura interna do reator \cong 50 °C.

Tempo de exposição (h)	Água sem H ₂ O ₂ , COD (mg L ⁻¹)	Água com 10 µM H ₂ O ₂ , COD (mg L ⁻¹)	Perda de vol. por evaporação (mL)
Inicial	9,2	9,2	-
2	5,7	3,8	0,4
4	4,9	0	0,3
6	0	0	0,2

Tabela 7. Teste de fotodegradação da matéria orgânica em 8 h de exposição ao reator de fotodegradação. Leituras de fluorescência em λ excitação = 313 nm e λ emissão = 330 - 600 nm.

Testes	Pico, nm	Intensidade de fluorescência
Água, B. Bonita, filtrada	416,1 (\pm 0,1)	527,4 (\pm 3,5)
Água B. Bonita após reator	416,1 (\pm 0,1)	-

-: não detectado

A concentração de metais associados a materiais inorgânicos (M_I) constou de estimativa indireta pelo cálculo da equação (2).

$$M_I = M_{tot} - M_{MO} \quad (2)$$

Como exercício inter-laboratorial, determinações de Cu_{tot} dissolvido foram também realizadas no laboratório de Química Ambiental (UFPR – Curitiba, PR). Assim, em uma coleta realizada em março de 2003, foram determinadas as concentrações de Cu_{tot} dissolvido, além de $Cu_{láb}$ e Cu_{tot} recuperável, duas espécies não

analisadas anteriormente para as coletas sazonais. O Cu_{lab} , que é a soma das concentrações iônicas e de complexos de fraca associação, foi determinado em amostras filtradas e com pH natural, por DPASV e com a adição de ligante competitivo (Xue & Sigg, 1998). Aliquotas não filtradas e filtradas destinadas às análises respectivas de Cu_{tot} recuperável e Cu_{tot} dissolvido foram acidificadas até $pH \cong 2,0$ com HNO_3 ultrapuro. A quebra da matéria orgânica das amostras foi feita em um reator de quartzo, constituído de um tubo interno de quartzo envolto por uma câmara de vapor de mercúrio, que é ativada em microondas para emissão de UV. Após a exposição de amostras filtradas e acidificadas ao reator, foi adicionado o ligante etilenodiamina. Depois de 12 h de equilíbrio, foi feita a determinação da corrente ip máx. (pico referente ao complexo etilenodiamina-Cu), e da concentração de Cu_{tot} a que ela equivale através de adição de padrão. Em seguida, medidas de Cu_{lab} de amostras filtradas foram feitas com a adição de etilenodiamina segundos antes do término da fase de deposição, em DPASV. Através da corrente resultante (ip 0) o Cu_{lab} foi calculado, após a divisão do ip máx. (da leitura do Cu_{tot}) e a multiplicação pelo valor de Cu (ip máx. correspondente). O Cu_{tot} recuperável é o conjunto de íons liberados após a redução do pH da amostra para $\cong 2,0$ e exposição ao reator de UV, e portanto representou a fração recuperada após este procedimento de digestão, ou seja, a soma do Cu_{tot} dissolvido e do Cu particulado recuperável. Esta determinação foi feita por DPASV, com adição de padrão interno e força iônica ajustada para 0,1 M com $NaNO_3$. O Cu recuperável proveniente da fase particulada foi calculado indiretamente pela equação (3):

$$Cu \text{ recuperável particulado} = Cu_{tot} \text{ recuperável} - Cu_{tot} \text{ dissolvido} \quad (3)$$

3.4.4.2) Capacidade de complexação da água do reservatório com Cu e Cd

Neste trabalho, os parâmetros de complexação de metais, constante de estabilidade condicional (K') e concentração de ligantes (CL), foram determinados por ISE. Esta técnica tem a vantagem de medir diretamente o metal iônico, que é considerado uma das espécies mais tóxicas ao plâncton. Titulações com o emprego de ISE são indicadas para águas naturais que apresentam altas concentrações de agentes complexantes, devido à relativamente baixa sensibilidade na medição de metais (Neubecker & Allen, 1983). Os limites de detecção de Cu e Cd por ISE foram estendidos com o uso de tampão metálico (descrição em 3.4.4.1). Titulações de amostras de água do reservatório com Cu e Cd foram feitas em trélicas. O pH foi

mantido entre 6,8-6,9 com $7,5 \times 10^{-3}$ M de PIPES. Tempos de equilíbrio para as leituras foram determinados de acordo com a resposta dos eletrodos. Para a primeira adição de metal, um tempo de 4 h foi requerido. No entanto, os tempos de equilíbrio decresceram com o aumento das concentrações totais durante a titulação. Foram feitas 15 adições de metal, com concentrações entre $5,0 \times 10^{-7}$ M e $1,0 \times 10^{-5}$ M. Curvas de calibração diárias foram feitas como descrito na seção 3.4.4.1. Os parâmetros de complexação foram calculados com a utilização de análises gráficas descritas por Scatchard *et al.* (1957). Titulações de branco dos eletrólitos, com as mesmas concentrações dos metais, do tampão e do ajustor de força iônica, resultaram na não complexação dos metais estudados. Comparações entre os parâmetros de complexação obtidos para amostras de água do reservatório foram feitas por ANOVA paramétrica e teste t de Student (Graphpad InStat v 2.01, San Diego, CA, EUA).

Em adição à obtenção de CL por ISE, a capacidade de complexação aparente (ccap) foi determinada por DPASV. Esta técnica consiste da determinação do metal lábil após um número de adições internas de metal iônico ter se equilibrado com os ligantes presentes na amostra. O intervalo de adições de metal para esta análise foi de $5,0 \times 10^{-7}$ M a $9,0 \times 10^{-7}$ M. A capacidade de complexação é igual ao intercepto na abscissa em um gráfico no qual o eixo Y apresenta a corrente do pico (μ A) e o eixo X a concentração do metal iônico adicionado. O intercepto na abscissa é calculado a partir da linha de regressão pelo método dos mínimos quadrados de Y em X, onde $Y = 0$ (Chau *et al.* 1974). A verificação da ocorrência de complexação é feita com comparação da inclinação da reta de regressão, em análises de brancos dos eletrólitos. A complexação em uma amostra ocorre se a inclinação obtida tiver valor inferior à do branco. A capacidade de complexação, medida por DPASV, é considerada aparente pois ocorre subestimação da complexação devido à detecção do metal iônico mais as espécies lábeis e complexos que se dissociam com a aplicação da corrente (Morrison & Florence, 1989).

3.4.4.3) Modelagem dos dados de especiação

As concentrações de Cu^{2+} e Cd^{2+} dissolvidos foram estimadas pelo modelo de equilíbrio químico MINEQL+ (Versão 4.5, Environmental Research Software, Hallowell, ME, EUA). O intuito desta estimativa foi o de comparar as concentrações iônicas obtidas por ISE com aquelas estimadas pela modelagem. Para tanto, foram utilizados os parâmetros de complexação K' e CL dos metais com ligantes da água do

reservatório, obtidos neste trabalho. Na modelagem, a composição da água do reservatório teve os valores médios das 8 coletas sazonais tanto para os parâmetros de complexação log K' e CL da classe de ligantes 1 para Cu, quanto para as concentrações totais de Cu e Cd, obtidas neste trabalho por DPASV. Também foram adicionadas à modelagem as concentrações totais dissolvidas dos seguintes íons, considerados como principais em águas doces (Wetzel, 1975; Mylon *et al.* 2003): Ca²⁺, Mg²⁺, Na⁺, K⁺, Cl⁻, SO₄²⁻ (Oliveira, 1993), NH₄⁺ (Barbosa *et al.* 1999), NO₃⁻ e PO₄³⁻ (CETESB, 2003).

3.5) Estudo de laboratório

3.5.1) Curvas de crescimento das microalgas

A curva de crescimento de cada espécie foi obtida com a montagem de culturas do tipo 'batch' em garrações com capacidade de 8 L com 7 L de meio de cultura e inóculo na fase exponencial de crescimento. Estas culturas também foram usadas para a obtenção dos MAMM excretados, ao final da fase exponencial. As condições de cultivo foram as mesmas da Tabela 3, com aeração dos garrações por borbulhamento de ar filtrado e umedecido em água acidificada (pH \cong 3,0) e autoclavada. Amostras periódicas para análises de clorofila-a e número de células foram retiradas em condições axênicas em fluxo laminar, após exposição dos frascos de cultura à luz UV por 30 minutos.

As contagens de células foram feitas em hemocitômetro Fuchs-Rosenthal, e microscópio óptico (400 x), exceto para *A. spiroides*, feitas em câmara de sedimentação de altura de 6 mm e microscópio invertido (Ros, 1979). A contagem nesta câmara foi mais apropriada para *A. spiroides* pois houve a possibilidade de divisão da câmara em campos, já que os filamentos desta espécie são longos o bastante para ultrapassarem um campo de contagem. Portanto, foi padronizada a contagem de até 30 tricomas, para estabilização do número de campos. O número de células por mL foi obtido através da equação (4).

$$N = n \times 1000 \times 10^6 / Ac \times h \times Nc \quad (4)$$

onde: N = densidade fitoplanctônica (indivíduos mL⁻¹); Ac = área do campo de contagem; h = altura da câmara de sedimentação; Nc = nº de campos contados

A concentração de clorofila-a (mg L⁻¹) foi analisada em células retidas em filtros de acetato de celulose (diâmetro do poro 0,45 μ m), a partir de volumes amostrados entre 5 - 20 mL (Talling & Driver, 1963).

A taxa específica de crescimento (μ) foi estimada como a inclinação da reta de regressão linear do \ln das concentrações de clorofila-a (mg L^{-1}) na fase exponencial de crescimento em função do tempo (dias de cultivo).

3.5.2) Obtenção dos materiais de alta massa molecular das culturas e da água do reservatório

Os materiais de alta massa molecular (MAMM) excretados pelas microalgas, nas culturas tipo 'batch', foram isolados entre o final da fase exponencial e início da fase estacionária de crescimento. Filtrados foram obtidos por filtração à vácuo (24 cm Hg) com unidades de filtração de polisulfona (PSF) e filtros de acetato de celulose (0,45 μm diâmetro de poro, Schleicher & Schuell, Dassel, Alemanha), pré-lavados em 1 M HNO_3 por 24 h e com 100 mL de água destilada em vidro no momento do uso. Os filtrados foram concentrados sob vácuo (Cole-Parmer Instrument, Chicago, Illinois, EUA), em rotaevaporador (Büchi, Switzerland) a 40 °C. Em seguida, as amostras foram colocadas em tubos de diálise (Spectrapor, Spectrum Medical Industries, Los Angeles, California, EUA) com poros de exclusão de 12.000-14.000 Da, e dialisadas contra água destilada em vidro (48 h). Para prevenir o crescimento de bactérias, tolueno (0,1 % v/v) foi adicionado nos tubos de diálise. Os MAMM dissolvidos foram então liofilizados (Freeze Dryer 4.5, Labconco, Kansas City, Missouri, USA) a - 50 °C e preservados em freezer até as análises.

O mesmo procedimento de separação do MAMM das culturas foi aplicado à água de Barra Bonita, amostrada de acordo com a seção 3.4.1. O pH desta água foi medido em campo, antes da coleta, com o sistema de monitoramento de qualidade de água (Horiba U-23 Kyoto, Japão).

3.5.3) Análises dos materiais de alta massa molecular das culturas e da água do reservatório

Os materiais liofilizados (MAMM) foram usados secos para as análises dos monossacarídeos e dos elementos C, H, N e S, e para o restante das análises foram diluídos (50 $\mu\text{g mL}^{-1}$) em água destilada em vidro. Para determinação dos parâmetros de complexação de metais com os excretados das 3 microalgas em conjunto, soluções da mistura destes MAMM foram utilizadas, e cada material adicionado proporcionalmente (16,6 μg de cada MAMM por mL). O conteúdo de carbono orgânico das soluções de MAMM foi analisado como descrito na seção 3.4.2.

3.5.3.1) Capacidade de complexação com Cu e Cd

As titulações para obtenção dos parâmetros de complexação de Cu e Cd com os MAMM das microalgas, da água do reservatório e da mistura dos MAMM das microalgas foram feitas como descrito na seção 3.4.4.2. Estas titulações foram feitas em pH constante ($6,8 \pm 0,1$) e similar ao pH das culturas de microalgas em laboratório, e da água do reservatório no dia da coleta. Os parâmetros de complexação foram comparados por ANOVA paramétrica e teste t de Student como descrito em 3.4.4.2. Os MAMM assim como as amostras sazonais do trabalho de campo não foram purificados para a retirada de metais possivelmente presentes nestes materiais. Deste modo, os parâmetros de complexação obtidos representam o potencial de complexação considerando-se os sítios de ligação para metais com exceção daqueles supostamente já ocupados pelos metais presentes. Em adição, titulações com os metais Cu e Cd foram feitas separadamente, e portanto, na obtenção dos parâmetros de complexação a competição entre estes metais pelos sítios de ligação não foi abordada no presente estudo.

A ccap de Cu e Cd com os MAMM também foi determinada por DPASV, assim como na seção 3.4.4.2.

3.5.3.2) Composição monossacarídica

Cromatografia a gás dos monossacarídeos que compõem os MAMM foi feita após metanólise de alíquotas de 1 mg do material liofilizado, com o uso de 1 M HCl em metanol a 80 °C por 24 h, e posterior derivatização do material hidrolisado para O-metil-silil derivados de metil glicosídeos. A metodologia empregada é descrita em Reinhold (1972) e modificada por Paulsen & Vieira (1994). As amostras foram injetadas com microseringa previamente lavada com piridina, em um cromatógrafo HP5890 Series II (Hewlett-Packard Company, Analytical Products Group, Palo Alto, CA, EUA) equipado com uma coluna de sílica J&W DB-5 30-m. Manitol foi usado como padrão interno e a identificação e quantificação dos monossacarídeos foram feitas seguindo-se o tempo de retenção e curva de calibração dos padrões de fucose, galactose, glicose, manose, ramnose, xilose, ácido glicurônico, ácido galacturônico, N-acetil glicosamina e N-acetil galactosamina.

3.5.3.3) Proporção dos elementos C, H, N e S

As proporções dos elementos C, H, N e S foram obtidas com um analisador elementar EA 1110 CHNS (CE Instruments, ThermoQuest, Rodano, Milan, Italy). Amostras de 2 a 3 mg dos materiais liofilizados (MAMM) foram pesadas em cadinhos de estanho (ThermoQuest, Rodano, Milão, Itália), em balança de precisão (AT21 Comparator balance, Mettler Toledo, Laboratory & Weighing Technologies, Greifensee, Suíça). Os cadinhos foram colocados no tambor de amostragem do aparelho, que os injetou em um forno onde a análise foi feita após o processo de combustão do tipo “dynamic flash” (Friis *et al.* 1998). A determinação das proporções foi obtida através de calibração com os padrões cistina, sulfanilamida, metionina e BBOT (ThermoQuest, Rodano, Milão, Itália).

3.5.3.4) Análise de fluorescência do material de alta massa molecular da água do reservatório

O MAMM do reservatório foi avaliado quanto à sua fluorescência. Soluções com concentrações variadas deste material foram lidas em fluorímetro, como descrito na seção 3.4.4.1. Determinações de carbono orgânico total foram feitas para cada solução (procedimento na seção 2.1.2). A partir da construção dos gráficos i) concentração das soluções versus intensidade do pico obtido, ii) concentração das soluções versus carbono orgânico dissolvido e iii) carbono orgânico dissolvido versus intensidade de emissão de fluorescência, foi feita a regressão linear dos pontos para avaliar a relação entre estes parâmetros.

4) RESULTADOS

4.1) Estudo de campo

4.1.1) Parâmetros físico-químicos

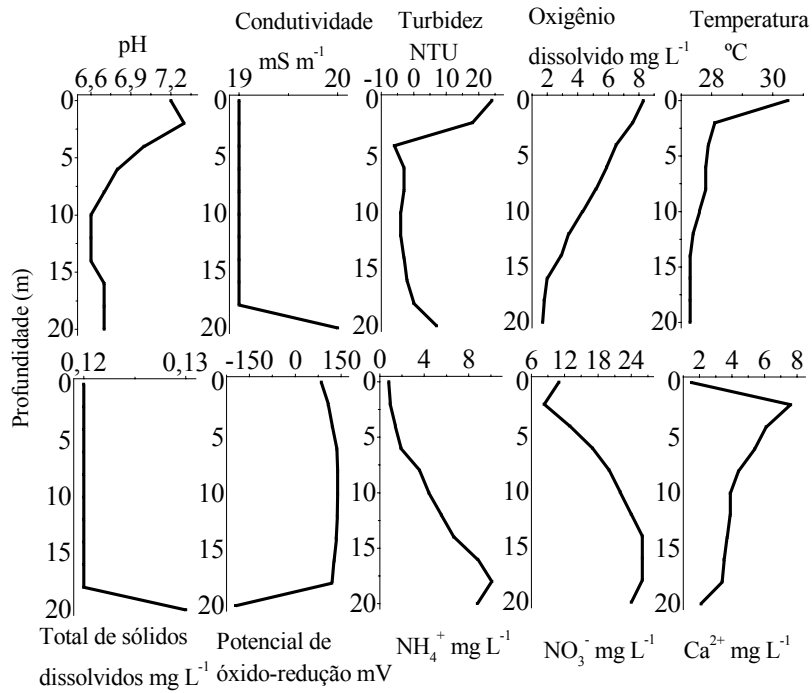
Os perfis dos parâmetros físico-químicos das 8 coletas sazonais entre março de 2001 e abril de 2003 estão apresentados nas Figuras 6 a 9. Os dados de profundidade do disco de Secchi, coeficiente de extinção vertical da luz, zona eufótica, zona máxima, conteúdo de clorofila-a e carbono orgânico dissolvido foram resumidos na Tabela 8 e um perfil de irradiação solar foi exemplificado na Figura 10. As coletas foram realizadas em geral entre às 11:00 pm e 12:00 pm.

Condições ácidas de pH predominaram nas estações de verão e inverno, com valores mínimos de 5,4 a 5,5. Condições básicas com máximo de 7,5 a 8,9 predominaram nas coletas de outono e primavera. Uma tendência de aumento ou constância do pH foi observada em função da profundidade, sendo a principal variação entre 1 a 4 m de profundidade em até 1,6 unidades, e com a proximidade do sedimento (fundo) houve em geral um decréscimo dos valores, o que pode ser indício da ocorrência de respiração anaeróbia.

A temperatura diminuiu na coluna d'água, na região próxima à superfície ou gradualmente com a profundidade. Os perfis de inverno e verão apresentaram menores variações de temperatura com a profundidade (até 2 °C) e os perfis de outono e primavera apresentaram as maiores variações (até 5 °C). Os valores oscilaram em torno de 20 a 22 °C no inverno, 22 a 27 °C na primavera, 25 a 27 °C no verão e 24 a 30 °C no outono.

As concentrações de oxigênio dissolvido decresceram com a profundidade. A superfície da coluna d'água apresentou condições entre não-saturação a supersaturação, de 3 a 16 mg L⁻¹, enquanto próximo ao sedimento as concentrações variaram entre 5 mg L⁻¹ até valores muito próximos de zero nas coletas da primavera de 2002 e verão de 2003.

A



B

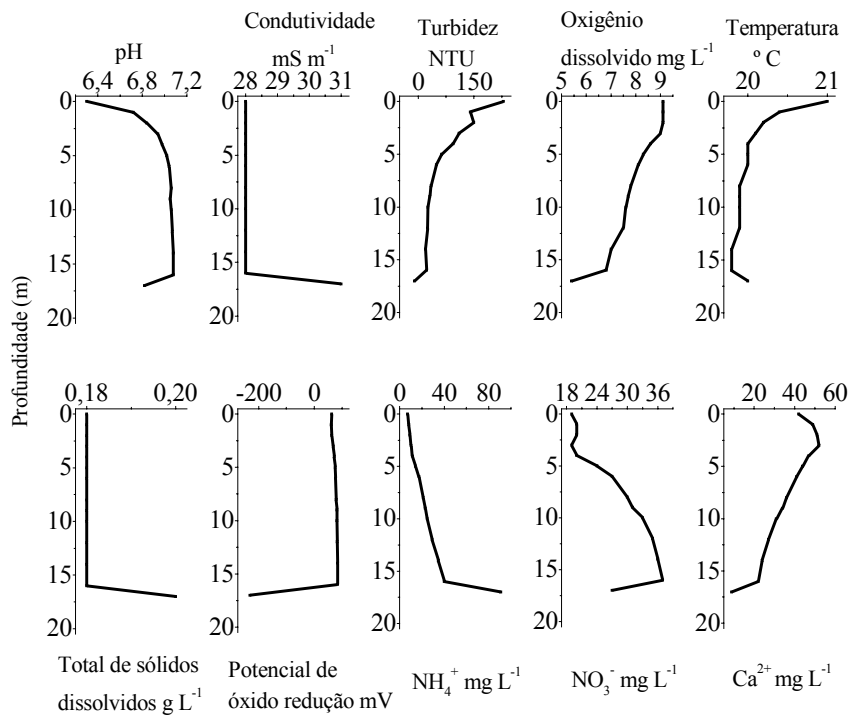
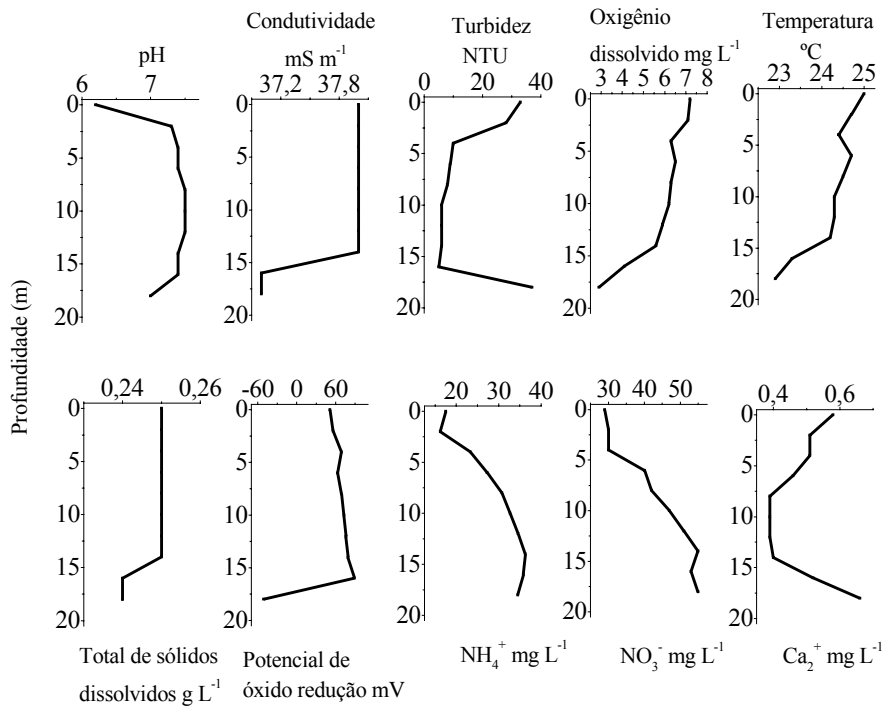


Figura 6. Perfis de variáveis físico-químicas das coletas realizadas em 20/03/2001 – outono (A) e 09/07/2001 – inverno (B).

A



B

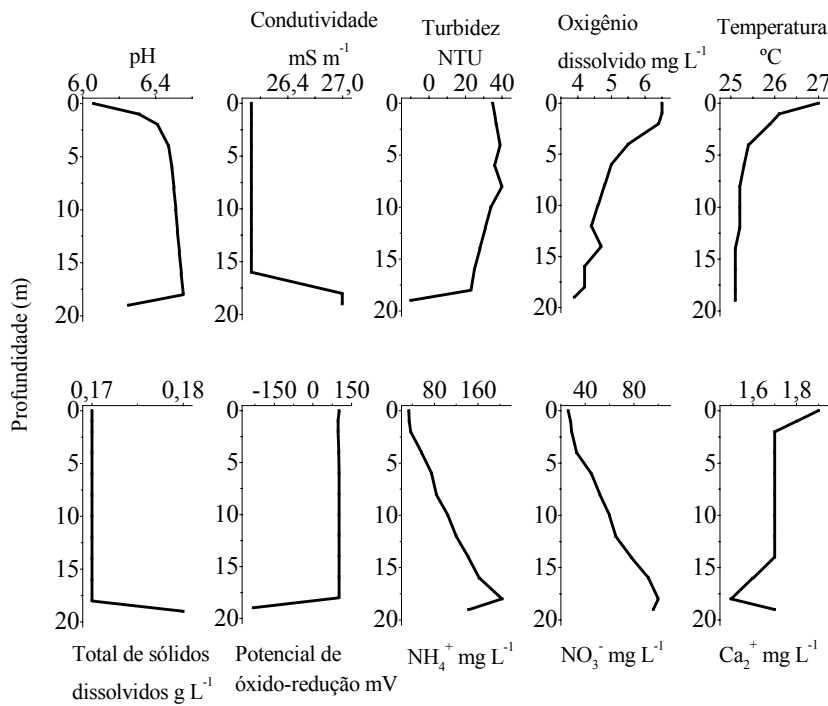
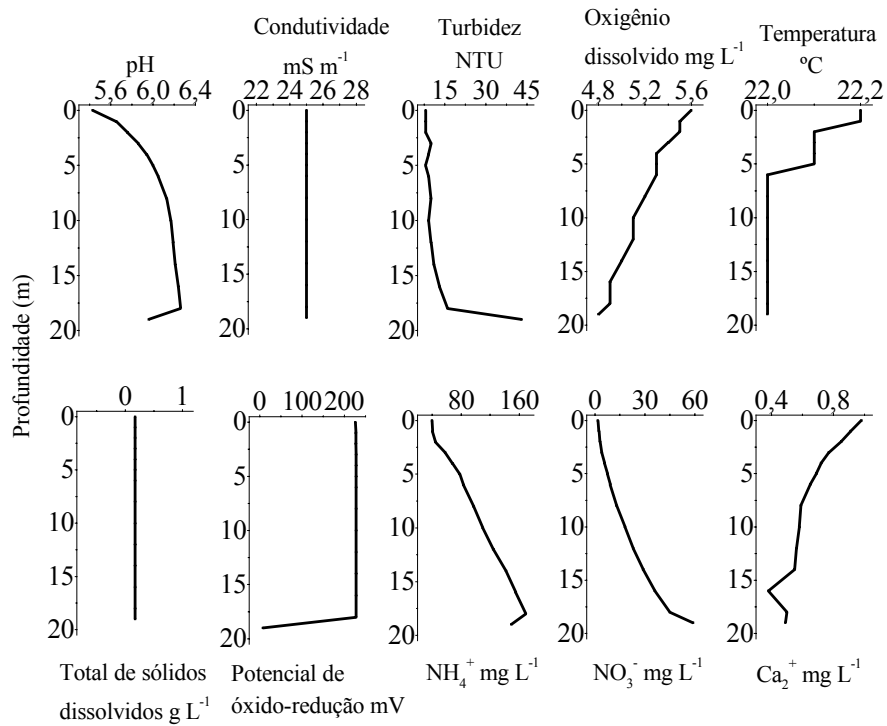


Figura 7. Perfis de variáveis físico-químicas das coletas realizadas em 17/10/2001 – primavera (A) e 21/01/2002 – verão (B).

A



B

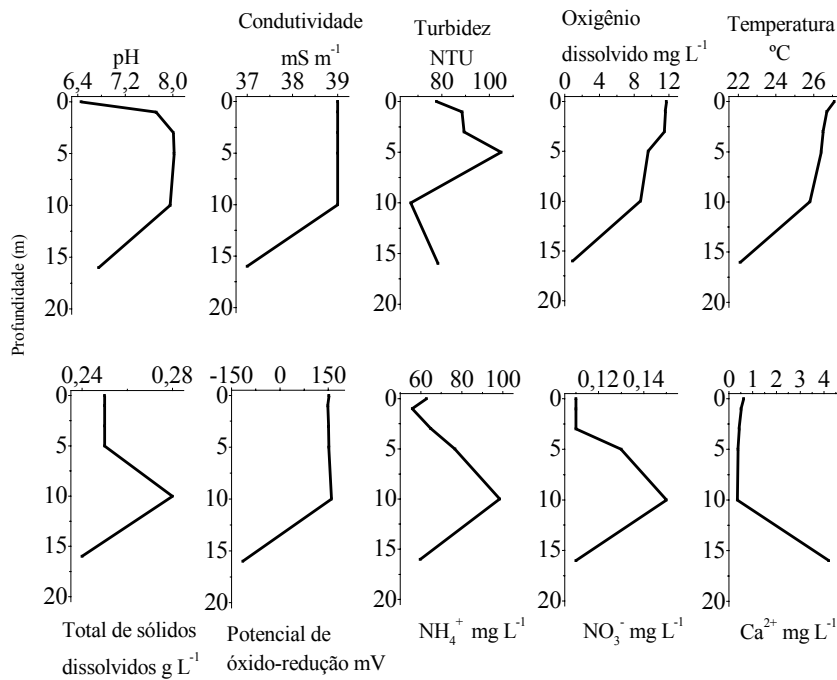
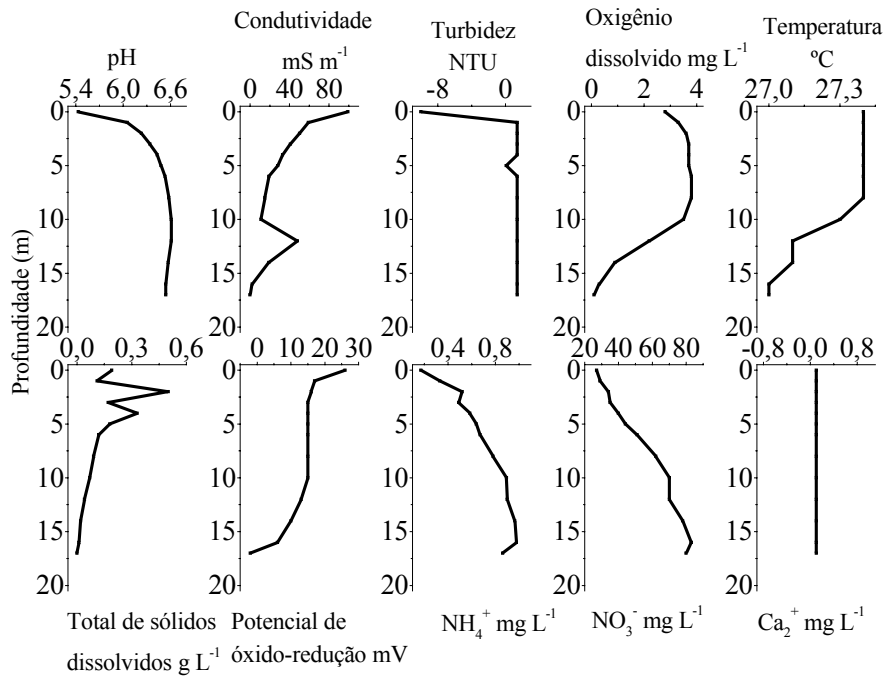


Figura 8. Perfis de variáveis físico-químicas das coletas de 25/06/2002 – inverno (A) e 14/10/2002 – primavera (B).

A



B

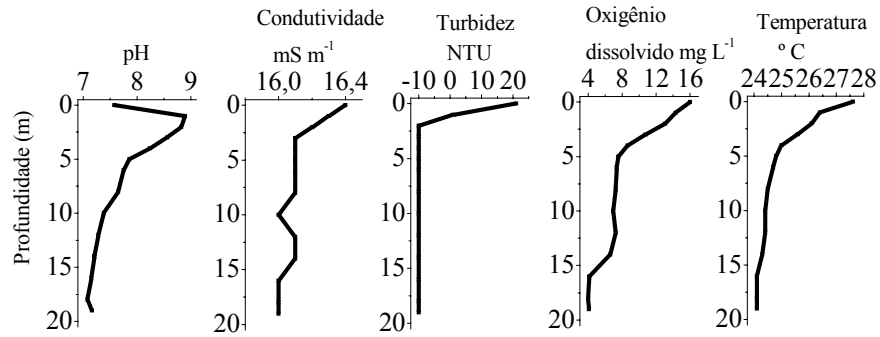


Figura 9. Perfis de variáveis físico-químicas das coletas de 13/01/2003 – verão (A) e 28/04/2003 – outono (B).

Tabela 8. Dados de transparência da água pelo disco de Secchi (Z_{DS}), coeficiente de extinção vertical da luz (k_d), zona eufótica (Z_{eu}), profundidade máxima (Z_{max}), concentrações de clorofila-a e carbono orgânico dissolvido (COD) das coletas sazonais. Média \pm erro da média.

Coleta	Z_{DS} (m)	k_d (m^{-1})	Z_{eu} (m)	Z_{max} (m)	Clorofila ($\mu g L^{-1}$)	COD ($mg L^{-1}$)
20/03/01	1,03	1,35	3,41	20	12 ($\pm 0,4$)	7,1 ($\pm 2,1$)
09/07/01	0,70	1,57	2,94	17	22 ($\pm 0,6$)	5,8($\pm 0,1$)
17/10/01	0,93	1,91	2,41	17	46 ($\pm 2,0$)	6,7($\pm 0,1$)
21/01/02	1,26	*	*	19	13 ($\pm 1,0$)	2,7($\pm 0,1$)
25/06/02	2,50	0,93	4,95	19	8,0 ($\pm 0,1$)	2,8 ($\pm 0,3$)
14/10/02	1,20	1,90	2,43	16	38 ($\pm 2,0$)	5,5 ($\pm 0,3$)
13/01/03	2,08	0,93	4,96	17	9,0 ($\pm 0,3$)	5,1 ($\pm 0,1$)
28/04/03	1,50	1,02	4,53	19	27 ($\pm 1,0$)	4,5 ($\pm 0,4$)

* não determinado

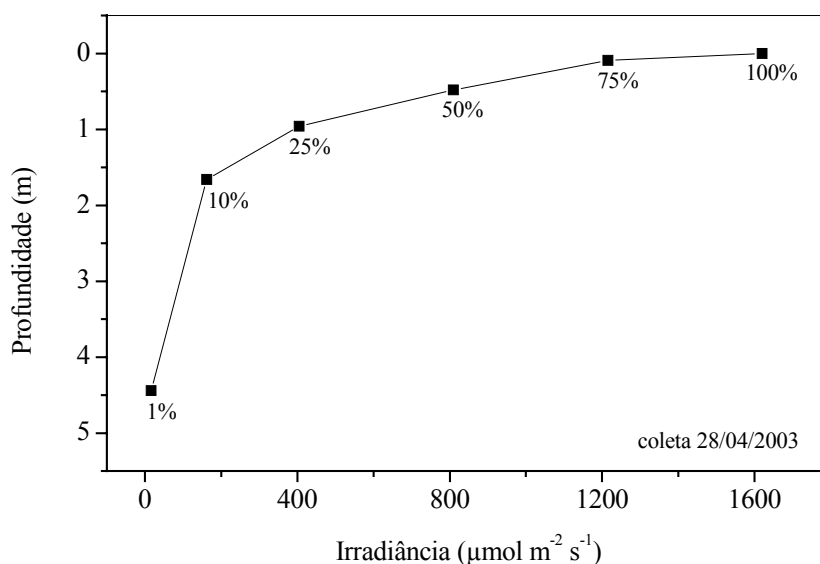


Figura 10. Exemplo de perfil da irradiação solar. Porcentagens de incidência em relação à superfície são indicadas abaixo dos pontos de leitura.

Potenciais de óxido-redução diminuíram abruptamente em profundidades próximas ao sedimento, com exceção das coletas da primavera de 2002 e verão de 2003, que tiveram diminuição do potencial redox mais gradual e por toda a coluna d'água. No período das coletas valores máximos e mínimos foram próximos de 250 mV (inverno de 2002) e - 220 mV (verão de 2002), respectivamente, e entre máximos e mínimos de uma mesma coleta a diferença foi de 30 (verão de 2003) até 300 mV (outono de 2001).

A condutividade teve padrões distintos, com aumento (e.g. outono de 2001), diminuição (e.g. perfis de primavera), pouca variação (primavera de 2001, verão de 2002) ou perfis com valores estáveis (e.g. inverno de 2002) em função da profundidade. As variações ocorreram em maior grau perto do sedimento, com exceção dos perfis de verão e outono de 2003, com decréscimo da condutividade desde a superfície. Valores mínimos e máximos no período foram de 0 a 90 mS/m, e ocorreram na coleta de verão de 2003.

A turbidez oscilou entre - 10 e 300 NTU e os perfis foram em geral heterogêneos em relação a variações dos valores na coluna d'água, que aumentaram ou diminuíram, em segmentos perto do sedimento (e.g. inverno de 2002), da superfície (e.g. outono de 2001) ou mesmo oscilações entre aumento e decréscimo com a profundidade (e.g. primavera de 2002).

Totais de sólidos dissolvidos (TDS) variaram entre 0,06 e 0,28 g L⁻¹. Os valores deste parâmetro tiveram nenhuma ou pouca variação na coluna d'água, em geral perto do sedimento ou em oscilações mais próximas à superfície (verão de 2003) e na região central da coluna d'água (primavera de 2002).

Concentrações do íon NH₄⁺ aumentaram com a profundidade, e principalmente perto do sedimento, com exceção das oscilações dos valores na coluna d'água na primavera de 2002. As concentrações de NO₃⁻ aumentaram com aumento da profundidade e por toda a coluna d'água, com exceção da queda de concentrações próxima ao sedimento no inverno de 2001 e das variações na coluna d'água na primavera de 2002. Os perfis de Ca²⁺ apresentaram vários padrões, com valores mais elevados próximos à superfície seguidos de decréscimo com a profundidade (outono de 2001), decréscimo na coluna d'água (coletas de inverno) às vezes seguido de aumento com a proximidade do sedimento (primavera de 2001 e verão de 2002), como também valores estáveis com a profundidade (verão de 2003) e aumento perto do sedimento (primavera de 2002).

A profundidade total do reservatório (Z_{\max}) no ponto de coleta variou entre 16 (outubro de 2002, época de seca) e 20 m (março de 2001, época de chuvas). Dados de transparência da água pelo disco de Secchi estiveram correlacionados às extensões da zona eufótica ($r = 0,86$) e aos coeficientes de extinção vertical da luz ($r = - 0,77$). Profundidades mínimas da Z_{eu} ocorreram na primavera (2,41 e 2,43 m) e máximas no inverno de 2002 e verão de 2003 (4,95 e 4,96 m). A Z_{DS} teve uma correlação de - 0,62 com a turbidez, e a menor transparência da água (0,70 m) ocorreu quando a turbidez atingiu valores mais elevados, por volta de 300 NTU na coluna fótica (inverno de 2001). O coeficiente de extinção vertical da luz (k_d) teve maior correlação com as concentrações de clorofila-a ($r = 0,93$) do que com total de sólidos dissolvidos ($r = 0,87$) e turbidez ($r = 0,56$). Os valores mais elevados de clorofila-a foram observados nas coletas de primavera e os menores valores no inverno de 2002 e verão de 2003. O carbono orgânico dissolvido variou de 2,7 a 7,1 mg L⁻¹, sem uma tendência de variação das concentrações com as estações do ano. O perfil de irradiação da luz solar (Figura 10), exemplificado para a coleta de outono de 2003, teve aproximadamente 90 % da irradiação atenuada nos primeiros 2 m, e os 10 % restantes atenuados em menor intensidade até o limite da zona eufótica (4,53 m).

4.1.2) Composição monossacarídica de amostras da água do reservatório

Monossacarídeos livres não foram detectados em todas as coletas realizadas. Os monossacarídeos glicose, galactose, manose e xilose estiveram presentes em todas as coletas, enquanto fucose, arabinose, ramnose, frutose e ribose não foram detectados com a mesma frequência (Tabela 9). Todos os picos presentes nos cromatogramas foram identificados com padrões, exceto contaminações devido ao tratamento de dessalinização em resinas catiônicas e aniônicas (presentes também em branco com água destilada). A concentração total dos monossacarídeos variou de 0,21 mg L⁻¹ (janeiro de 2002) a 0,9 mg L⁻¹ (janeiro de 2003). A composição relativa entre os mesmos monossacarídeos em coletas distintas variou. Proporções mais elevadas foram de ramnose no outono e primavera de 2001, de frutose no inverno de 2001, de ramnose, manose e xilose no verão de 2002 e de glicose no restante das coletas.

Tabela 9. Composição e quantificação dos monossacarídeos totais dissolvidos da água do reservatório, nas coletas sazonais. Concentração em mg L⁻¹ e porcentagem em relação à concentração total quantificada.

Monossacarídeos	20/03/2001	09/07/2001	17/10/2001	21/01/2002
Fucose	-	-	0,05 (8,5 %)	0,01 (4,8 %)
Ramnose	0,06 (27,3 %)	0,03 (6,3 %)	0,15 (25,4 %)	0,05 (23,8 %)
Arabinose	0,05 (22,7 %)	0,05 (10,4 %)	0,07 (11,9 %)	0,04 (19,0 %)
Galactose	0,03 (13,6 %)	0,04 (8,3 %)	0,12 (20,3 %)	0,03 (14,3 %)
Glicose	0,03 (13,6 %)	0,12 (25,0 %)	0,13 (22,0 %)	0,03 (14,3 %)
Manose/Xilose	0,05 (22,7 %)	0,06 (12,5 %)	0,07 (11,9 %)	0,05 (23,8 %)
Frutose	-	0,17 (35,4 %)	-	-
Ribose	-	0,01 (2,1 %)	-	-
Total, mg L ⁻¹	0,22	0,48	0,59	0,21
Monossacarídeos	25/06/2002	14/10/2002	13/01/2003	28/04/2003
Fucose	0,02 (6,5 %)	0,03 (7,5 %)	0,06 (6,7 %)	0,01 (2,9 %)
Ramnose	-	0,05 (12,5 %)	0,15 (16,7 %)	0,05 (14,3 %)
Arabinose	-	0,04 (10,0 %)	0,05 (5,6 %)	0,04 (11,4 %)
Galactose	0,09 (29,0 %)	0,08 (20,0 %)	0,21 (23,3 %)	0,05 (14,3 %)
Glicose	0,15 (48,4 %)	0,12 (30,0 %)	0,26 (28,9 %)	0,11 (31,4 %)
Manose/Xilose	0,05 (16,1 %)	0,08 (20,0 %)	0,17 (18,9 %)	0,09 (25,7 %)
Frutose	-	-	-	-
Ribose	-	-	-	-
Total, mg L ⁻¹	0,31	0,40	0,90	0,35

- não detectado

4.1.3) Metais na água do reservatório: especiação e complexação de Cu e Cd

As concentrações dos íons Cu^{2+} e Cd^{2+} , associados à matéria orgânica e totais das coletas sazonais são sumarizadas na Tabela 10. Exemplos de polarogramas obtidos em análises por DPASV são apresentados na Figura 11.

No período das coletas sazonais, as determinações de Cu tiveram mínimos e máximos de $4,3 \times 10^{-8}$ M e $1,4 \times 10^{-7}$ M para Cu_{tot} , $3,9 \times 10^{-8}$ M e $2,1 \times 10^{-7}$ M para Cu_{MO} e $3,0 \times 10^{-10}$ M e $1,1 \times 10^{-9}$ M para Cu^{2+} . Nas coletas, as concentrações iônicas variaram de 0,3 a 1,2 % do total de Cu e as concentrações de Cu_{MO} foram semelhantes às de Cu_{tot} em comparações por teste t de Student, exceto em junho de 2002. Portanto, esta é a indicação de que a maioria do Cu estava associado à MOD. Nas coletas em que o Cu_{tot} foi inferior ao Cu_{MO} e principalmente em junho de 2002 que teve esta comparação estatisticamente distinta, é presumido que pelo fato da maioria do Cu estar associado à MOD, o procedimento de fervura com HNO_3 para determinação do Cu_{tot} tenha sido menos eficiente, quer seja na perda ou na extração de Cu, em relação ao procedimento de digestão da MOD por UV e determinação do Cu_{MO} . A menor porcentagem de associação do Cu à MOD foi de 78 % em março de 2001, enquanto nas outras coletas observou-se associação de quase todo o Cu dissolvido com a MOD.

Ao contrário do Cu, não houve associação de Cd com a MOD, com base nas determinações de Cd^{2+} que foram estatisticamente semelhantes (teste t de Student) aos valores obtidos após tratamento em reator de fotodegradação da MOD. Nas coletas de junho e outubro de 2002 o Cd_{MO} foi inferior ao Cd^{2+} . Este resultado pode ser decorrente de falhas na digestão da MOD das amostras. As determinações de Cd_{tot} apresentaram erros da média altos nas três primeiras coletas, e não houve detecção do pico de Cd em DPASV nas coletas restantes. A não-deteção ou variação nas concentrações de Cd_{tot} das amostras após o tratamento ácido e com fervura pode ter sido consequência da volatilização do Cd em altas temperaturas, junto com outras substâncias presentes na água, como por exemplo cloretos (Prichard, 1996). Portanto, este procedimento de digestão foi considerado inadequado para determinações de Cd_{tot} nos casos apresentados. Contudo, nas coletas em que o Cd_{tot} foi quantificado, suas concentrações foram estatisticamente semelhantes (teste t de Student) às de Cd^{2+} , sugerindo que a maioria do Cd estava livre na água do reservatório. As concentrações de Cd^{2+} variaram entre $4,8 \times 10^{-8}$ M e $2,1 \times 10^{-6}$ M, evidenciando uma tendência de aumento progressivo desta espécie ao longo do tempo (Tabela 10).

Tabela 10. Concentrações totais de Cu e Cd e das espécies iônicas e associadas à matéria orgânica. Média e \pm erro da média (n = 3).

Coleta	Cu _{tot} (M)	Cu _{MO} (M)	Cu ²⁺ (M)
20/03/2001	1,1 (\pm 0,2) x 10 ⁻⁷	8,6 (\pm 0,6) x 10 ⁻⁸	3,0 (\pm 0,5) x 10 ⁻¹⁰
09/07/2001	4,3 (\pm 0,7) x 10 ⁻⁸	3,9 (\pm 0,7) x 10 ⁻⁸	3,7 (\pm 0,1) x 10 ⁻¹⁰
17/10/2001	1,1 (\pm 0,2) x 10 ⁻⁷	1,5 (\pm 0,3) x 10 ⁻⁷	1,1 (\pm 0,2) x 10 ⁻⁹
21/01/2002	1,0 (\pm 0,3) x 10 ⁻⁷	1,2 (\pm 0,3) x 10 ⁻⁷	1,1 (\pm 0,1) x 10 ⁻⁹
25/06/2002	1,4 (\pm 0,1) x 10 ^{-7*}	2,1 (\pm 0,1) x 10 ⁻⁷	6,0 (\pm 1,3) x 10 ⁻¹⁰
14/10/2002	8,2 (\pm 0,3) x 10 ⁻⁸	1,9 (\pm 0,4) x 10 ⁻⁷	4,0 (\pm 0,5) x 10 ⁻¹⁰
13/01/2003	1,0 (\pm 0,1) x 10 ⁻⁷	1,4 (\pm 0,4) x 10 ⁻⁷	5,5 (\pm 1,1) x 10 ⁻¹⁰
28/04/2003	7,3 (\pm 1,4) x 10 ⁻⁸	8,9 (\pm 1) x 10 ⁻⁸	8,7 (\pm 1,1) x 10 ⁻¹⁰
Coleta	Cd _{tot} (M)	Cd _{MO} (M)	Cd ²⁺ (M)
20/03/2001	3,9 (\pm 2,1) x 10 ⁻⁸	-	4,8 (\pm 0,8) x 10 ⁻⁸
09/07/2001	7,5 (\pm 5,1) x 10 ^{-8*}	1,4 (\pm 0,4) x 10 ⁻⁷	1,3 (\pm 0,1) x 10 ⁻⁷
17/10/2001	1,3 (\pm 1) x 10 ⁻⁷	1,3 (\pm 0,2) x 10 ⁻⁷	1,1 (\pm 0,1) x 10 ⁻⁷
21/01/2002	—*	1,2 (\pm 0,2) x 10 ⁻⁷	1,6 (\pm 0,1) x 10 ⁻⁷
25/06/2002	—*	1,3 (\pm 0,1) x 10 ⁻⁷	2,1 (\pm 0,1) x 10 ⁻⁷
14/10/2002	—*	1,5 (\pm 0,2) x 10 ⁻⁷	4,3 (\pm 0,3) x 10 ⁻⁷
13/01/2003	—*	1,5 (\pm 0,2) x 10 ⁻⁷	1,4 (\pm 0,1) x 10 ⁻⁶
28/04/2003	—*	3,3 (\pm 0,9) x 10 ⁻⁸	2,1 (\pm 0,1) x 10 ⁻⁶

* Problemas na metodologia

- não detectado

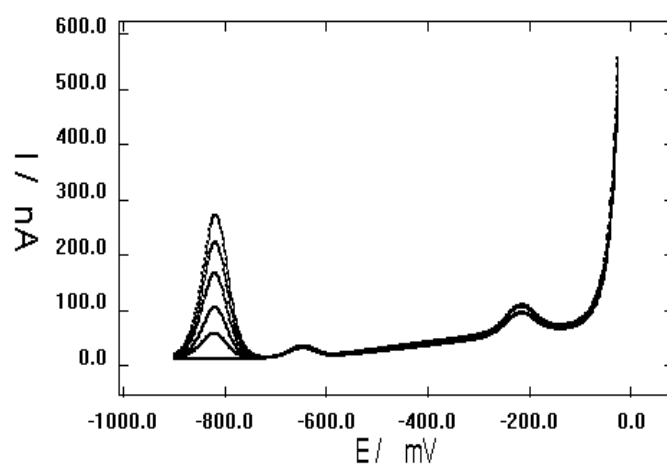
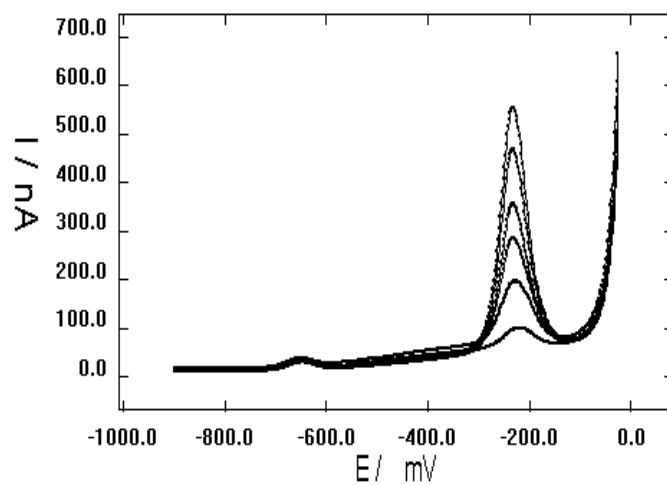


Figura 11. Exemplos de polarogramas obtidos nas determinações de Cu e Cd, através de DPASV.

O esquema de especiação proposto para as coletas sazonais foi simplificado, excluindo-se as espécies $M_{láb}$ e M_I , pelos motivos apresentados a seguir. Os complexos lábeis não foram quantificados diretamente através de DPASV. É suposto que, além da presença de baixas concentrações lábeis, a matéria orgânica inerente de ambientes eutróficos, como o reservatório de Barra Bonita, impossibilitou a detecção devido à interferência no eletrodo de mercúrio (Neubecker & Allen, 1983). A estimativa indireta de M_I não foi feita, devido às concentrações de M_{tot} terem sido semelhantes ou inferiores às concentrações de M_{MO} no caso do Cu, e Cd_{tot} não ter sido analisado na maioria das coletas pelos problemas de metodologia descritos acima.

Na Tabela 11 são mostrados os resultados das determinações de $Cu_{láb}$, Cu_{tot} dissolvido, Cu_{tot} recuperável, Cu particulado recuperável e Cu particulado recuperável por g de TDS realizadas no laboratório de Química Ambiental da UFPR. A concentração de Cu_{tot} dissolvido ($1,6 \times 10^{-7}$ M) foi próxima à maioria dos valores de Cu_{tot} e Cu_{MO} das coletas sazonais, assim como da média das 8 análises de Cu_{tot} e Cu_{MO} , $1,1 \times 10^{-7}$ M e $1,3 \times 10^{-7}$ M, respectivamente. O $Cu_{láb}$ foi equivalente a 24,4 % do Cu_{tot} dissolvido. A concentração de Cu_{tot} recuperável foi representada por 69,6 % de Cu_{tot} dissolvido e 30,4 % de Cu particulado recuperável. Com a medida de TDS desta coleta ($0,11 \text{ g L}^{-1}$), foi obtida a concentração de $6,4 \times 10^{-7}$ M de Cu recuperável por g de material particulado.

As curvas de titulação (ISE) dos metais com a água do reservatório resultaram, em todas as coletas analisadas, na complexação de Cu e não-complexação de Cd, como exemplificado para a coleta de janeiro de 2003 (Figura 12). Análises gráficas com base no método de Scatchard para os dados da titulação de Cu foram ajustadas com duas retas de regressão linear, representando as classes 1 e 2 de ligantes, como exemplificado na Figura 13. Para cada classe de ligantes de Cu, a constante de estabilidade condicional (K') e a concentração de ligantes (CL) foi calculada através dos coeficientes das regressões lineares dos pontos. Os parâmetros de complexação de Cu nas 8 coletas sazonais são resumidos na Tabela 12. Comparações do tipo teste t de Student entre os mesmos parâmetros das duas classes de ligantes ($\log K'_1 \times \log K'_2$, $CL_1 \times CL_2$) resultaram em diferenças significativas, demonstrando a distinção dos parâmetros entre estas duas classes com a metodologia utilizada. A classe 1, representada pela reta de regressão linear com maior inclinação (Figura 13), teve os ligantes com maior afinidade para o Cu, com K'_1 entre 7,9 e 8,4 e CL_1 entre $1,1 \times 10^{-6}$ M e $1,4 \times 10^{-6}$ M. A classe 2 teve ligantes mais fracos, com valores de K'_2 entre 5,7 e

6,2 e CL_2 entre $5,3 \times 10^{-6}$ M e $7,7 \times 10^{-6}$ M. Por outro lado, todas as comparações por ANOVA paramétrica entre os parâmetros correspondentes a uma mesma classe de ligantes para Cu mas em coletas distintas resultaram em semelhanças, indicando a complexação similar de Cu em todo o período estudado. Nestas 8 coletas, a média dos valores de K'_1 foi mais elevada do que a média de K'_2 por volta de 3 ordens de grandeza, enquanto a média de CL_1 foi aproximadamente 5,5 vezes inferior à média de CL_2 .

Tabela 11. Concentrações de cobre lábil, total dissolvido, total recuperável, da fração do total recuperável proveniente da fase particulada, e a concentração recuperável por g de total de sólidos dissolvidos.

Espécies	Concentração (M)
Cu_{tot} recuperável	$2,3 \times 10^{-7}$
Cu_{tot} dissolvido	$1,6 \times 10^{-7}$
$Cu_{láb}$	$3,9 \times 10^{-8}$
Cu particulado recuperável	$7,0 \times 10^{-8}$
Cu particulado recuperável por g de TDS *	$6,4 \times 10^{-7}$

* TDS: total de sólidos dissolvidos; $0,11 \text{ g L}^{-1}$ em março de 2003.

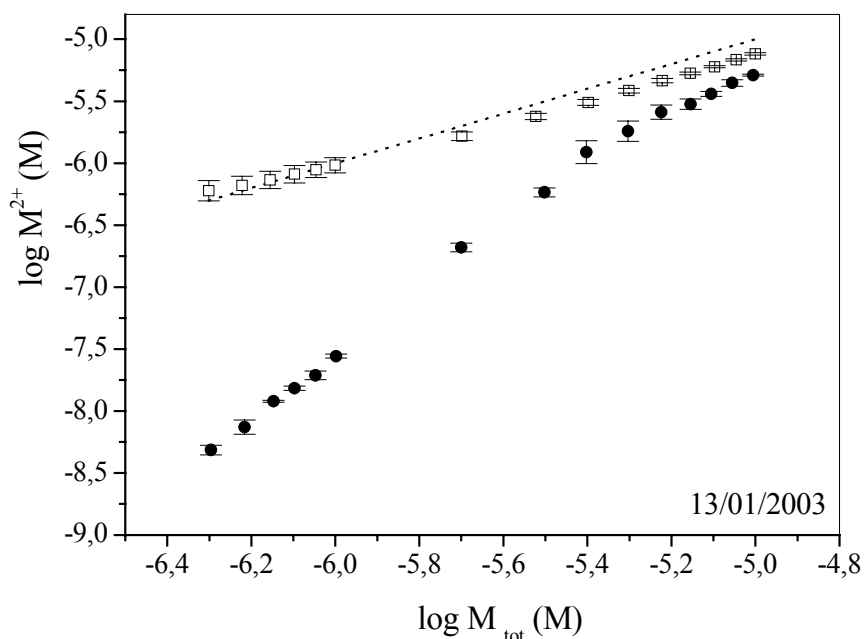


Figura 12. Exemplos de curvas de titulação da água do reservatório com Cu (●) e Cd (□). Não complexação (---) : $[metal\ total] = [M^{2+}]$. Barras: erro da média (n = 3).

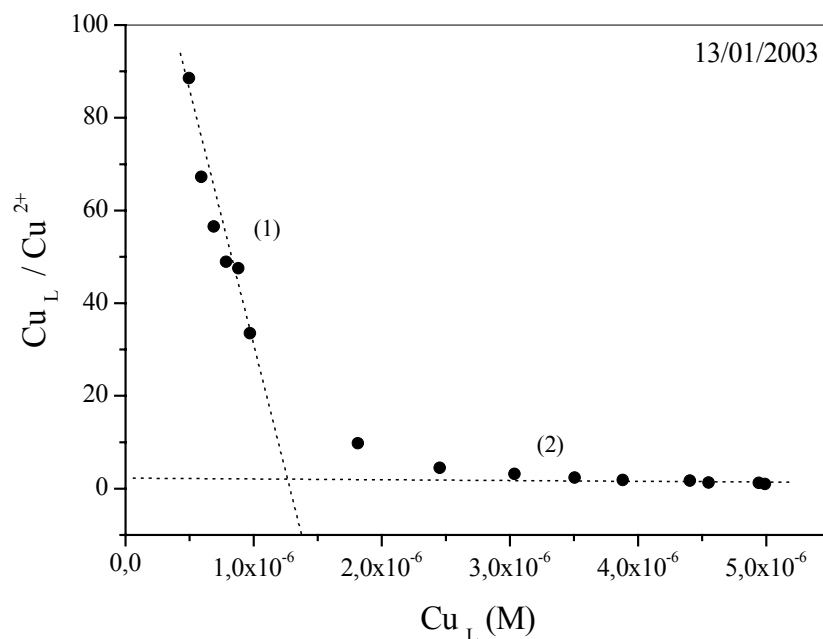


Figura 13. Exemplo de análise gráfica pelo método de Scatchard para titulação da água do reservatório com Cu. (---) Regressão linear para cálculo dos parâmetros de complexação das classes (1) e (2) de ligantes.

Tabela 12. Complexação de Cu pela água filtrada de Barra Bonita. Parâmetros constante de estabilidade condicional (K') e concentração de ligantes (CL), obtidos por ISE e capacidade de complexação aparente (ccap), obtida por DPASV. Média e \pm erro da média ($n = 3$).

Coleta	Log K'_1	CL ₁ (M)	Log K'_2	CL ₂ (M)	ccap (M)
20/03/01	8,1 ($\pm 0,14$)	$1,1 (\pm 0,1) \times 10^{-6}$	6,2 ($\pm 0,02$)	$6,9 (\pm 0,2) \times 10^{-6}$	$1,4 (\pm 0,2) \times 10^{-7}$
09/07/01	8,1 ($\pm 0,1$)	$1,4 (\pm 0,1) \times 10^{-6}$	5,7 ($\pm 0,03$)	$6,7 (\pm 0,1) \times 10^{-6}$	$2,4 (\pm 0,2) \times 10^{-7}$
17/10/01	8,0 ($\pm 0,2$)	$1,3 (\pm 0,1) \times 10^{-6}$	5,9 ($\pm 0,1$)	$7,7 (\pm 0,1) \times 10^{-6}$	$1,7 (\pm 0,1) \times 10^{-7}$
21/01/02	8,2 ($\pm 0,01$)	$1,3 (\pm 0,1) \times 10^{-6}$	5,8 ($\pm 0,1$)	$7,3 (\pm 0,1) \times 10^{-6}$	$2,0 (\pm 0,2) \times 10^{-7}$
25/06/02	7,9 ($\pm 0,1$)	$1,2 (\pm 0,2) \times 10^{-6}$	5,8 ($\pm 0,1$)	$6,3 (\pm 1,2) \times 10^{-6}$	$2,0 (\pm 0,1) \times 10^{-7}$
14/10/02	8,4 ($\pm 0,1$)	$1,2 (\pm 0,2) \times 10^{-6}$	5,9 ($\pm 0,1$)	$5,8 (\pm 0,3) \times 10^{-6}$	$1,9 (\pm 0,2) \times 10^{-7}$
13/01/03	8,1 ($\pm 0,1$)	$1,2 (\pm 0,1) \times 10^{-6}$	5,9 ($\pm 0,1$)	$5,3 (\pm 0,6) \times 10^{-6}$	$2,2 (\pm 0,2) \times 10^{-7}$
28/04/03	8,1 ($\pm 0,1$)	$1,2 (\pm 0,1) \times 10^{-6}$	5,8 ($\pm 0,3$)	$6,8 (\pm 1,0) \times 10^{-6}$	$2,2 (\pm 0,1) \times 10^{-7}$

Análises da capacidade de complexação aparente (ccap) de Cu e Cd por DPASV também resultaram na complexação de Cu e não-complexação de Cd. A complexação de Cu foi confirmada pelos valores mais baixos de inclinação da reta de regressão linear das determinações das amostras em relação aos valores obtidos com brancos. Para Cd estes valores foram iguais, como exemplificado na Figura 14. A ccap de Cu nas coletas (Tabela 12) foi inferior em 1 ordem de grandeza aos valores de CL obtidos por ISE. Comparações por ANOVA paramétrica das ccap de Cu entre as coletas sazonais resultaram em diferenças não-significativas, (exceto entre março de 2001 e junho de 2001), assim como as comparações entre CL (ISE).

As médias de M_{tot} , M_{MO} , e dos parâmetros de complexação K' e CL usadas na modelagem da especiação de Cu e Cd com o programa MINEQL+, assim como os resultados estimados pelo modelo para as concentrações de M^+ estão resumidas na Tabela 13. A média dos valores observados para Cu^{2+} de $6,6 \times 10^{-10}$ M nas 8 coletas sazonais foi muito próxima à concentração obtida pela modelagem, de $6,4 \times 10^{-10}$ M. A espécie denominada CuBB, que recebeu os valores médios de K'_1 e CL_1 dos ligantes de Cu da água do reservatório, teve predomínio na especiação do Cu, com 99,1 % do total de Cu associado, seguido pelo Cu na forma iônica (0,4 %) e então pelo restante das espécies químicas apresentadas na Tabela 14. Já para o Cd^{2+} a modelagem resultou em uma concentração 5 vezes inferior ($1,2 \times 10^{-7}$ M) à média das concentrações de Cd^{2+} no período das coletas ($5,7 \times 10^{-7}$ M), enquanto foi igual à média usada para entrada do valor de Cd_{tot} no programa ($1,2 \times 10^{-7}$ M). As espécies em maior concentração na especiação do Cd foram Cd^{2+} (94,5 %), $CdCl^+$ (3,2 %) e $CdSO_4 aq$ (2,2 %). Os maiores valores de $\log K'$ foram para as espécies CuBB (8,11), $CuHCO_3^+$ (12,1), $CdHCO_3^+$ (10,7) e $Cd(CO_3)_2^{2-}$ (7,23). Na Figura 15 foram plotados os valores de Cu_{tot} para as 8 coletas do período estudado, em função tanto das concentrações de Cu^{2+} medidas por ISE quanto das respectivas concentrações de Cu^{2+} esperadas com a modelagem individual de cada coleta e de seus respectivos valores de Cu_{tot} , K'_1 e CL_1 . O índice de correlação de Pearson obtido em função do Cu_{tot} foi mais alto para a reta de regressão de Cu^{2+} do modelo ($r = 0,88$) em comparação com a reta das concentrações de Cu^{2+} obtidas por ISE ($r = 0,21$).

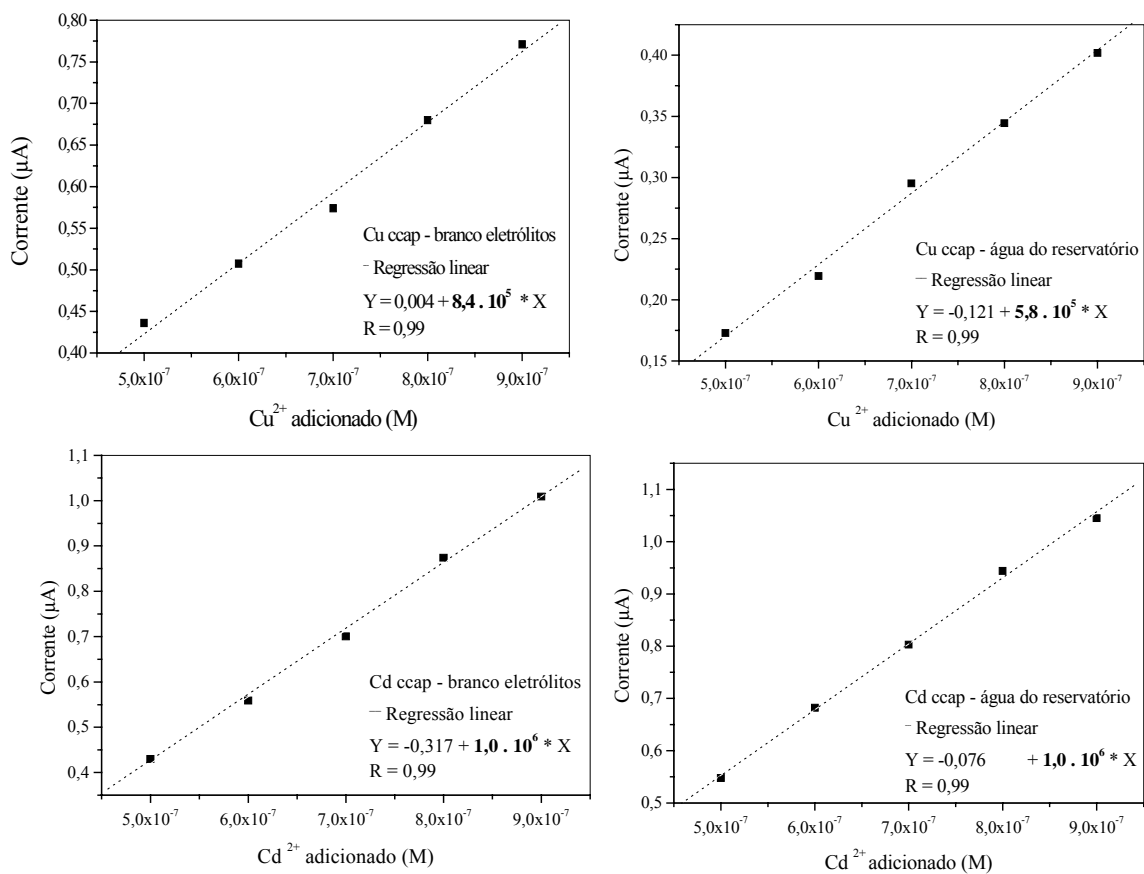


Figura 14. Exemplos de adição de padrão interno e regressão linear das leituras em DPASV para obtenção das inclinações de reta de brancos e da água do reservatório, em análises da capacidade de complexação aparente de Cu e Cd.

Tabela 13. Valores médios das coletas sazonais dos parâmetros de complexação K' e CL , metal total e metal iônico medidos nas coletas, e metal iônico estimado pelo modelo de especiação.

	Log K'_1	Log CL_1	M_{tot} (M)	M^{2+} ISE (M)	M^{2+} modelo (M)
Cu	8,1	$1,2 \times 10^{-6}$	$9,9 \times 10^{-8}$	$6,6 \times 10^{-10}$	$6,4 \times 10^{-10}$
Cd*	-	-	$1,2 \times 10^{-7}$	$5,7 \times 10^{-7}$	$1,2 \times 10^{-7}$

* $Cd_{tot} = Cd_{MO}$; coleta de março de 2001 não incluída.

Tabela 14. Espécies de Cu e Cd, concentrações e constantes de estabilidade condicional para a modelagem da fração dissolvida da água do reservatório. CuBB: Cu associado à classe 1 de ligantes de alta massa molecular da água do reservatório.

Espécies de Cu	Conc. (M)	Log K'	Espécies de Cd	Conc. (M)	Log K'
Cu^{2+}	$6,36 \times 10^{-10}$	0	Cd^{2+}	$1,15 \times 10^{-7}$	0
$Cu_2(OH)_2^{2+}$	$6,50 \times 10^{-16}$	-10,6	$Cd(OH)_3^-$	$1,81 \times 10^{-19}$	-32,5
$Cu(OH)_3^-$	$4,21 \times 10^{-16}$	-26,9	$Cd(OH)_4^{2-}$	$2,36 \times 10^{-27}$	-47,3
$Cu(OH)_4^{2-}$	$2,65 \times 10^{-22}$	-40	$CdOH^+$	$7,32 \times 10^{-11}$	-10,1
$Cu(OH)^+$	$1,61 \times 10^{-10}$	-7,5	$Cd(OH)_2(aq)$	$3,70 \times 10^{-14}$	-20,3
$Cu(OH)_2(aq)$	$2,57 \times 10^{-12}$	-16,2	Cd_2OH^{3+}	$4,23 \times 10^{-17}$	-9,4
$CuHCO_3^+$	$1,53 \times 10^{-12}$	12,1	$CdOHCl(aq)$	$1,26 \times 10^{-11}$	-7,4
$CuNH_3^{2-}$	$1,29 \times 10^{-12}$	-5,23	$CdHCO_3^+$	$1,00 \times 10^{-11}$	10,7
$CuCl_3^-$	$1,40 \times 10^{-22}$	-2,29	$CdCl^+$	$3,85 \times 10^{-9}$	1,98
$CuCl_2(aq)$	$4,28 \times 10^{-17}$	-0,26	$CdCl_3^-$	$1,24 \times 10^{-15}$	2,4
$CuCl_4^{2-}$	$2,45 \times 10^{-28}$	-4,59	$CdCl_2(aq)$	$5,62 \times 10^{-12}$	2,6
$CuCl^+$	$3,53 \times 10^{-13}$	0,20	$CdCO_3(aq)$	$3,74 \times 10^{-11}$	4,36
$CuCO_3(aq)$	$5,33 \times 10^{-11}$	6,77	$Cd(CO_3)_2^{2-}$	$3,94 \times 10^{-16}$	7,23
$Cu(CO_3)_2^{2-}$	$2,04 \times 10^{-15}$	10,2	$Cd(NO_3)_2(aq)$	$2,11 \times 10^{-16}$	0,2
$Cu(NO_3)_2(aq)$	$2,92 \times 10^{-19}$	-0,40	$CdNO_3^+$	$1,24 \times 10^{-11}$	0,5
$CuNO_3^+$	$6,83 \times 10^{-14}$	0,50	$Cd(SO_4)_2^{2-}$	$3,76 \times 10^{-12}$	3,5
$CuSO_4(aq)$	$1,48 \times 10^{-11}$	2,36	$CdSO_4(aq)$	$2,74 \times 10^{-9}$	2,37
CuBB	$9,39 \times 10^{-8}$	8,11	-	-	-

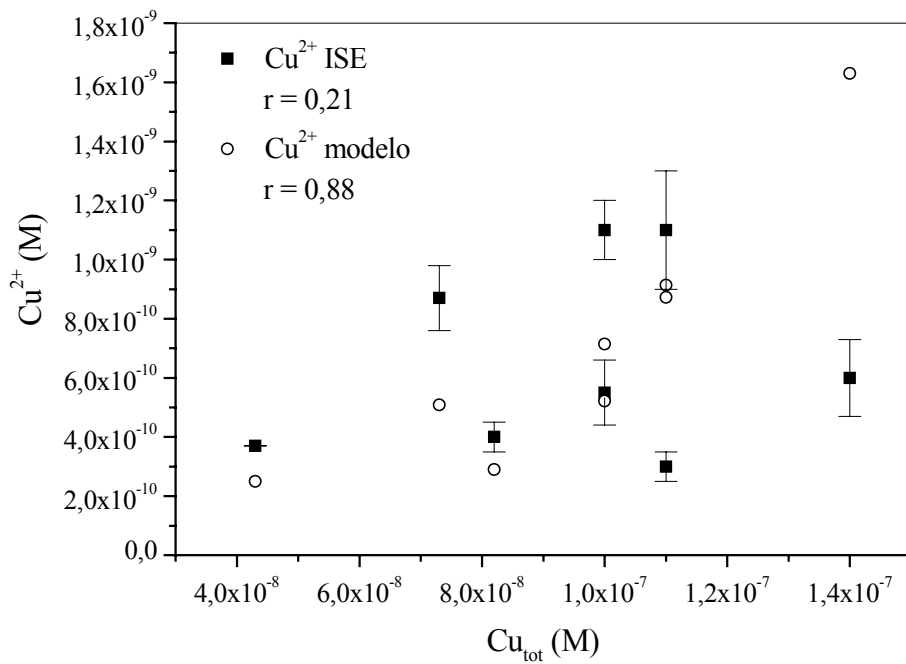


Figura 15. Concentrações de Cu^{2+} obtidas por ISE e pela modelagem dos dados, em função das concentrações totais obtidas em cada coleta sazonal. Barras: erro da média ($n = 3$).

4.2) Estudo de laboratório

4.2.1) Cultivo das microalgas e rendimento dos materiais de alta massa molecular

As curvas de crescimento das microalgas em culturas do tipo 'batch' (Figura 16) foram plotadas tanto com o número de células como também com as concentrações de clorofila-a. A curva de crescimento por número de células da microalga *A. spiroides* apresentou uma maior dispersão dos pontos, devido ao formato extenso e helicoidal dos filamentos, que contribuíram no aumento do erro nas contagens dos campos em câmara de sedimentação. Uma fase lag ou de adaptação de curta duração foi observada em todas as curvas, seguida da fase exponencial, muito mais extensa para as algas cianofíceas do que para a diatomácea. A fase estacionária foi atingida após o 11 ° dia de cultivo de *A. granulata*, e após o 40 ° dia de cultivo das cianofíceas. As cianofíceas tiveram curvas de número de células e clorofila-a com correspondência entre as fases exponencial e estacionária, no entanto as curvas da diatomácea apresentaram as concentrações de clorofila-a em declínio na fase estacionária, enquanto o número de células foi mantido estável.

Os parâmetros experimentais dos cultivos das microalgas e da coleta de água do reservatório para a obtenção dos MAMM são resumidos na Tabela 15. As curvas de crescimento foram usadas para comprovação da transição entre as fases exponencial e estacionária. Os MAMM foram isolados no dias de cultivo 18 °, 45 ° e 49 ° de *A. granulata*, *M. aeruginosa* e *A. spiroides*, respectivamente. Para a determinação das taxas de crescimento (μ) das culturas, foi decidido usar as curvas de concentração de clorofila-a, devido à fase exponencial não ter sido bem evidenciada na curva por número de células de *A. spiroides* (Figura 16). Os valores de μ foram semelhantes entre as espécies, ao contrário das concentrações de clorofila-a, muito mais altas no final do cultivo das cianofíceas que para a cultura da diatomácea e a coleta de campo. A produção de MAMM por L foi maior (por volta de 30 %) nas culturas das cianofíceas em relação à diatomácea e o material isolado da água do reservatório. No entanto, as concentrações de COT de soluções com 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ dos MAMM (material liofilizado) foram semelhantes quando comparadas por teste de ANOVA paramétrica. Apesar das condições unialgais, é estimado que a biomassa bacteriana tenha sido insignificante nos cultivos das cianofíceas devido ao aspecto translúcido do meio de cultivo no final do crescimento.

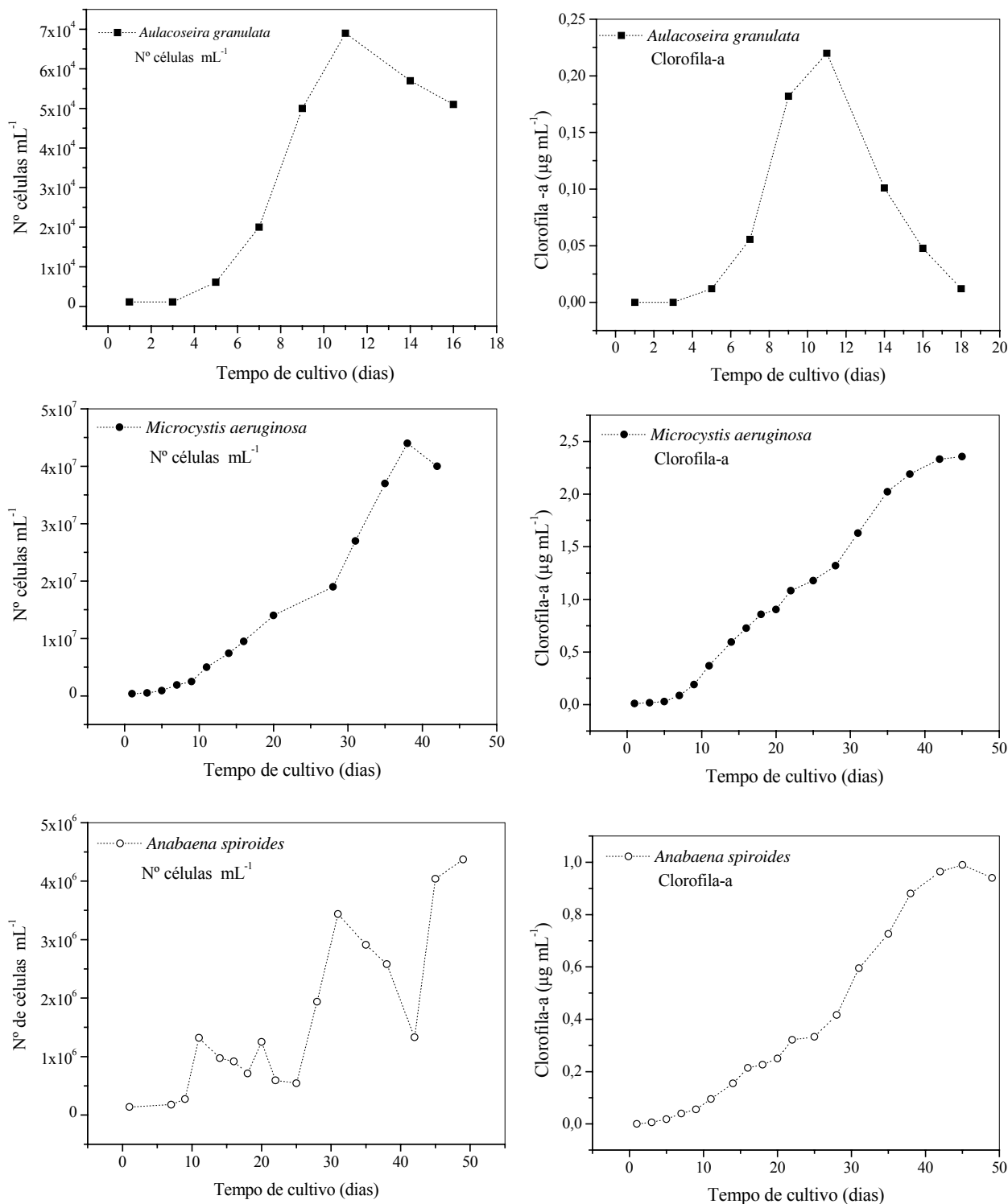


Figura 16. Curvas de crescimento de *Aulacoseira granulata*, *Microcystis aeruginosa* e *Anabaena spiroides* por número de células por ml e concentração de clorofila-a por mL.

Tabela 15. Dados dos cultivos das microalgas e da coleta de água do reservatório para obtenção dos materiais de alta massa molecular (MAMM). Dia de isolamento do MAMM nos cultivos e de coleta de campo, concentrações de clorofila-a, taxas de crescimento específicas (μ), rendimento do MAMM e concentrações de carbono orgânico total (COT) das soluções de $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ de MAMM. Média \pm erro da média, $n=3$.

MAMM	Dia	Clorofila - a ($\mu\text{g L}^{-1}$)	μ (d^{-1})	MAMM (mg L^{-1})	COT (mg L^{-1})
B. Bonita	21/01/2002	$13,0 \pm 0,9$	–	7,3	$7,1 \pm 1,0$
<i>A. granulata</i>	18 °	$11,9 \pm 0,1$	0,03	6,2	$10,2 \pm 2,1$
<i>M. aeruginosa</i>	45 °	$2.344,3 \pm 0,1$	0,02	10,2	$11,4 \pm 2,0$
<i>A. spiroides</i>	49 °	$975,8 \pm 1,4$	0,03	9,7	$11,6 \pm 0,9$

4.2.2) Complexação de Cu e Cd pelos materiais de alta massa molecular

Titulações com os vários MAMM (Figura 17) resultaram na complexação de Cu por todos os materiais, enquanto o Cd foi complexado somente pelos MAMM das cianofíceas e da mistura dos MAMM das microalgas, e em menor concentração do que o Cu (Tabela 16) para estes materiais. Análises gráficas através do método de Scatchard foram exemplificadas com as titulações dos MAMM de *A. spiroides* na Figura 18. Duas classes de ligantes foram interpretadas, com o ajuste de duas retas de regressão linear aos pontos das análises gráficas. Os parâmetros das classes 1 e 2 de ligantes foram calculados a partir dos coeficientes da reta de regressão linear com maior e menor inclinação no gráfico do modelo de Scatchard, respectivamente. Análises do tipo teste t de Student foram feitas para contrastar os parâmetros de complexação das duas classes de ligantes de cada solução titulada ($\log K'_1 \times \log K'_2$, $CL_1 \times CL_2$). As comparações foram estatisticamente distintas, demonstrando a adequação da interpretação de duas classes distintas de ligantes para os metais. A classe 1 incluiu os ligantes com maior afinidade pelo metal titulado ao passo que a classe 2 foi representada por sítios de complexação mais fracos.

Em geral, diferenças nos parâmetros de complexação de Cu entre os MAMM foram mais relacionadas à classe 1 de maior afinidade, como é mostrado em comparações por ANOVA paramétrica (Tabela 17).

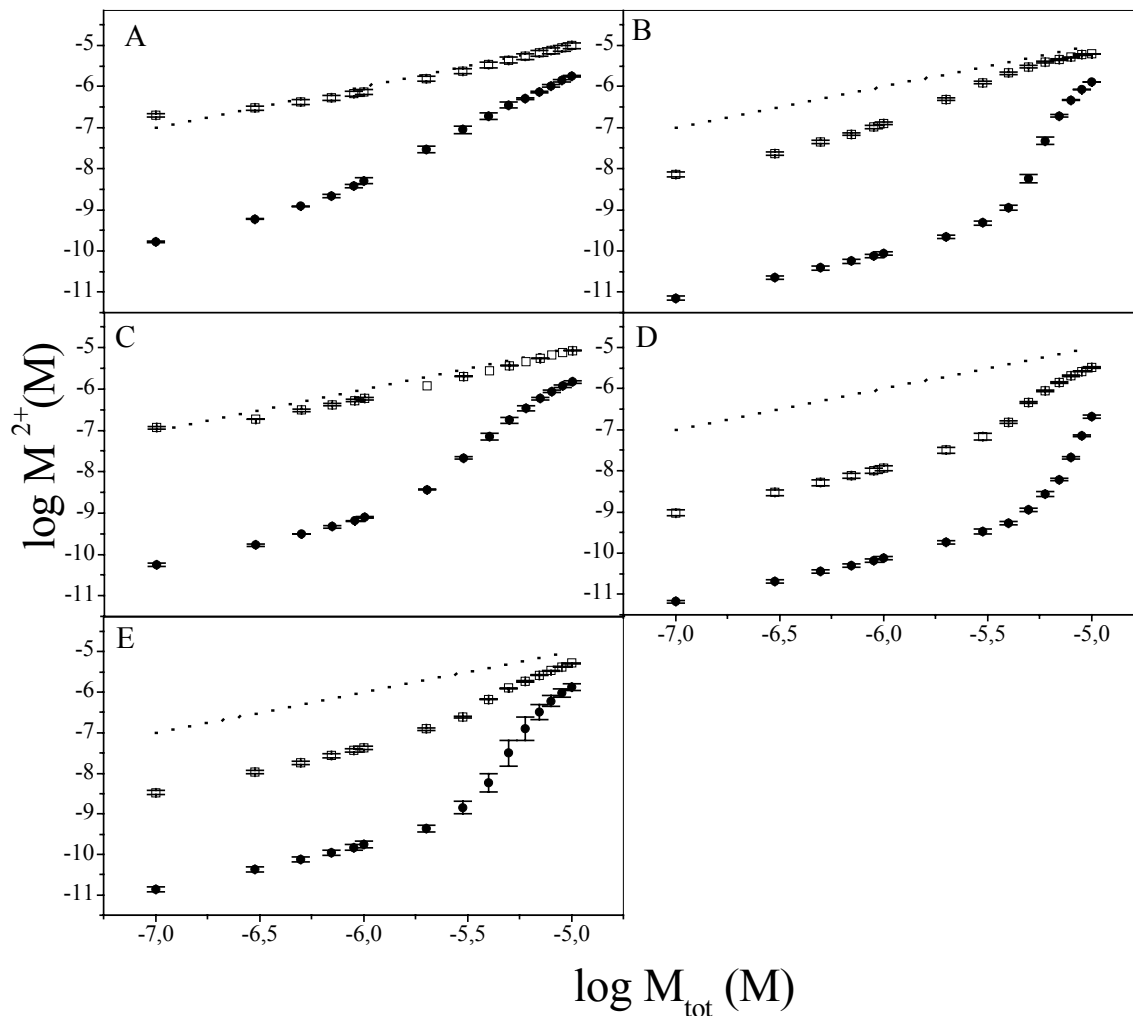


Figura 17. Curvas de titulação dos materiais de alta massa molecular (MAMM) com Cu (●) e Cd (□). (A) Barra Bonita, (B) mistura dos MAMM das três microalgas, (C) *A. granulata*, (D) *A. spiroides*, (E) *M. aeruginosa*. $I = 1,0 \times 10^{-1} M$ ($NaNO_3$), pH = 6,8 – 7,0 (PIPES $7,5 \times 10^{-3} M$). Valores em log da concentração de metal livre em função do log de metal total. (---): Não complexação (---) : $[metal\ total] = [M^{2+}]$. Barras: erro da média (n = 3).

Tabela 16. Parâmetros de complexação de Cu e Cd obtidos pelo método de Scatchard e os dados de titulações com os materiais de alta massa molecular excretados pelas 3 microalgas estudadas, da mistura destes, e da água do reservatório, e total de metal complexado por mg dos materiais. Constante de estabilidade condicional (K') reportada em log e concentração de ligantes (CL) reportada em M. Erros-padrão de tréplicas das titulações: log K'₁ até ± 0,1, CL₁ até ± 0,5, log K'₂ e CL₂ até ± 0,3.

MAMM	<i>A. granulata</i>	<i>M. aeruginosa</i>	<i>A. spiroides</i>	Mistura	B. Bonita
Cu					
log K' ₁	8,8	9,2	9,3	9,5	8,6
CL ₁	2,9 x 10 ⁻⁶	4,6 x 10 ⁻⁶	7,3 x 10 ⁻⁶	5,4 x 10 ⁻⁶	1,5 x 10 ⁻⁶
log K' ₂	6,6	6,7	8,3	6,9	6,4
CL ₂	1,0 x 10 ⁻⁵	9,7 x 10 ⁻⁶	9,9 x 10 ⁻⁶	9,6 x 10 ⁻⁶	9,8 x 10 ⁻⁶
µg Cu/ mg MAMM *	16,4	18,2	21,8	19,1	14,4
Cd					
log K' ₁	–	6,8	7,5	6,8	–
CL ₁	–	4,2 x 10 ⁻⁶	5,5 x 10 ⁻⁶	2,0 x 10 ⁻⁶	–
log K' ₂	–	6,2	6,2	4,5	–
CL ₂	–	5,5 x 10 ⁻⁶	8,5 x 10 ⁻⁶	2,2 x 10 ⁻⁵	–
µg Cd/ mg MAMM *		21,7	31,4	53,8	

* µg de metal total complexado pelas duas classes de ligantes (CL₁ + CL₂)

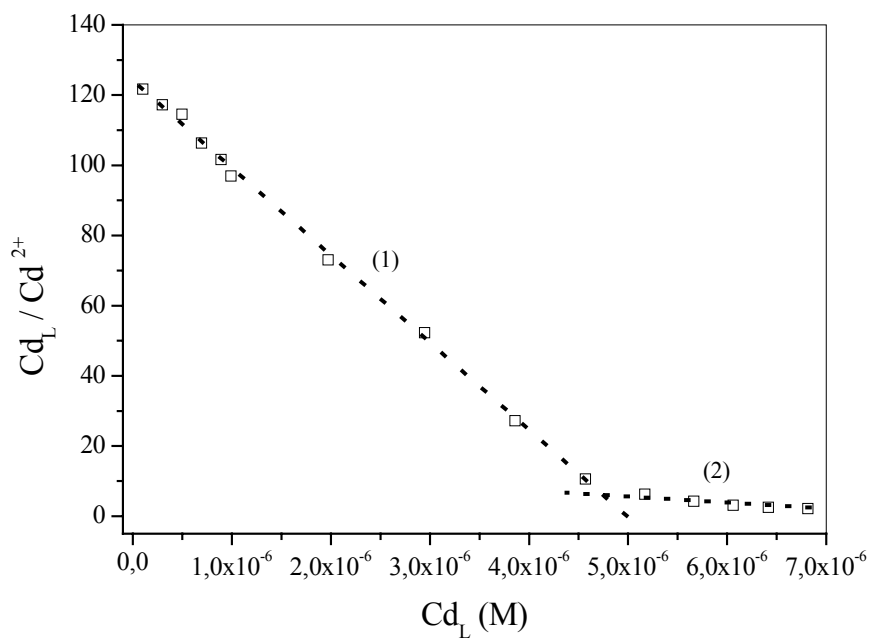
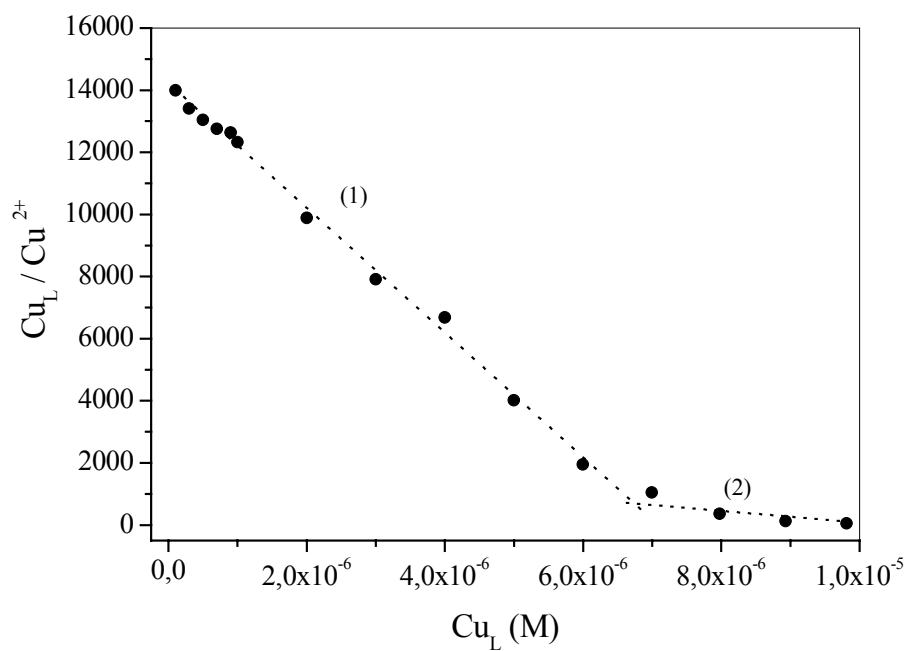


Figura 18. Exemplos de análises gráficas pelo método de Scatchard das titulações dos materiais de alta massa molecular de *A. spiroides* com Cu e Cd. Metal associado aos ligantes por metal livre (M_L/M^{2+}) versus metal associado aos ligantes (M_L). (---) Regressões lineares para cálculo dos parâmetros das classes de ligantes 1 e 2.

Tabela 17. Teste ANOVA paramétrico das comparações entre as constantes de estabilidade condicional ($\log K'$) e concentração de ligantes correspondentes entre os MAMM. ns = diferenças não significativas. * = diferenças significativas.

Comparações	$\log K'_1$	$\log K'_2$	CL ₁	CL ₂
<i>Cu</i>				
<i>A. granulata</i> vs <i>M. aeruginosa</i>	*	ns	*	ns
<i>A. granulata</i> vs <i>A. spiroides</i>	*	*	*	ns
<i>A. granulata</i> vs mistura	*	ns	*	ns
<i>A. granulata</i> vs B. Bonita	ns	ns	ns	ns
<i>M. aeruginosa</i> vs <i>A. spiroides</i>	ns	*	*	ns
<i>M. aeruginosa</i> vs mistura	ns	ns	ns	ns
<i>M. aeruginosa</i> vs B. Bonita	*	ns	*	ns
<i>A. spiroides</i> vs mistura	ns	*	*	ns
<i>A. spiroides</i> vs B. Bonita	*	*	*	ns
Mistura vs B. Bonita	*	ns	*	ns
<i>Cd</i>				
<i>M. aeruginosa</i> vs <i>A. spiroides</i>	*	ns	ns	ns
<i>M. aeruginosa</i> vs mistura	ns	*	*	*
<i>A. spiroides</i> vs mistura	*	*	*	*

Entre os materiais das microalgas, o MAMM de *A. spiroides* teve o maior K'_1 tanto para Cu ($\log K'_1 = 9,3$) quanto para Cd ($\log K'_1 = 7,5$), como também as maiores concentrações de CL. Contudo o K'_1 para Cu de *A. spiroides* foi estatisticamente similar aos K'_1 da mistura e do MAMM de *M. aeruginosa* (Tabela 17). A mistura dos MAMM algais apresentou a maior afinidade para Cu ($\log K'_1 = 9,5$) entre todas as titulações com este metal, e a complexação de Cd por esta mistura é supostamente devido à presença dos MAMM das cianofíceas, embora o K'_1 obtido ter sido inferior ao do material de *A. spiroides* e igual ao do material de *M. aeruginosa* ($\log K'_1 = 6,8$). Para os materiais das cianofíceas, os valores de CL₁ e CL₂ reportados em mol foram em geral maiores na complexação de Cu do que Cd. Porém, a massa de Cd total complexada (soma de CL₁ e CL₂ reportada em µg de metal) por mg de MAMM foi maior que a massa de Cu total complexada (Tabela 16), o se deve ao valor mais alto de massa atômica do Cd (112) em relação ao Cu (63,5).

Na Figura 19, os valores de K'_1 para Cu foram plotados em função das respectivas CL_1 divididas pelo COT dos MAMM. O ajuste dos pontos à reta de regressão linear teve $r = 0,92$, mostrando maior afinidade do MAMM de *A. spiroides* pelo Cu, seguido por *M. aeruginosa*, *A. granulata* e o material do reservatório.

Os valores de ccap de Cu e Cd dos MAMM das microalgas e do reservatório foram resumidos na Tabela 18. As soluções de $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ dos materiais liofilizados tiveram concentrações de COT mais elevadas do que as soluções tituladas em ISE (Tabela 15), provavelmente devido à heterogeneidade dos materiais liofilizados. A complexação de Cu ocorreu em todos os MAMM, e assim como para as análises por ISE, somente as cianofíceas complexaram Cd. Todos os valores de ccap de Cu e Cd foram menores que CL_1 (Tabela 16) em uma ordem de grandeza. Em oposição aos resultados de capacidade de complexação por ISE, todos os MAMM apresentaram ccap de Cu semelhantes em comparações estatísticas (ANOVA paramétrica). O MAMM de *M. aeruginosa* teve ccap de Cd e Cu similares, e o MAMM de *A. spiroides* teve ccap de Cd distinta e maior que a ccap de Cu (teste t de Student).

4.2.3) Composição monossacarídica e elementar

Os MAMM tiveram em comum a presença dos açúcares galactose, glicose, manose, ramnose e xilose, embora em proporções distintas (Tabela 19). A fucose também esteve presente nos materiais, exceto no MAMM do reservatório, que também não apresentou os açúcares ácidos glicurônico e galacturônico e os aminados N-acetil glicosamina e N-acetil galactosamina. *A. spiroides* teve o MAMM com maior proporção de açúcares ácidos e aminados. O ácido glicurônico estava presente nos materiais da *A. granulata* e *A. spiroides*, o ácido galacturônico em *M. aeruginosa*, a N-acetil galactosamina em *A. spiroides* e a N-acetil glicosamina nos materiais das 3 microalgas.

A magnitude das distinções em proporções dos elementos C, H, N e S (Tabela 19) foi menor entre os MAMM em relação às diferenças nas proporções dos monossacarídeos. Contudo, diferenças estatísticas foram obtidas em comparações por ANOVA paramétrica, com a exceção do N entre *A. granulata* e *A. spiroides* e do S entre *A. spiroides* e *M. aeruginosa*. Em geral, o C variou entre 27 e 29 %, o N entre 2 e 3 %, o H entre 4 e 6 % e o S entre 2 e 4 %.

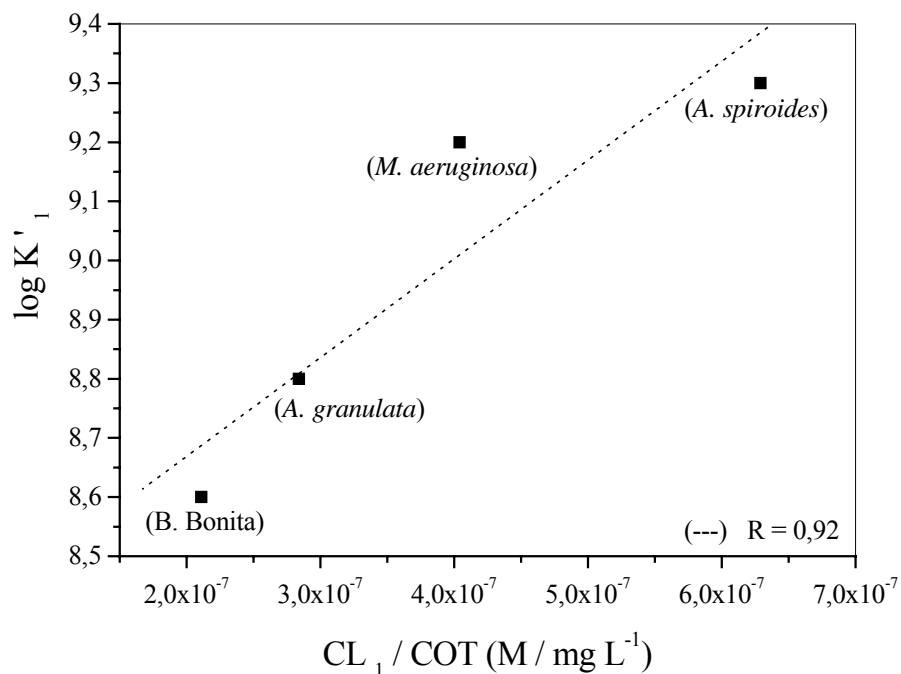


Figura 19. Constantes de estabilidade condicional da classe 1 de ligantes (K'_1) em função das respectivas concentrações de ligantes (CL_1) divididas pelo conteúdo de carbono orgânico total (COT). (---): Regressão linear.

Tabela 18. Capacidade de complexação aparente (ccap) de soluções dos materiais de alta massa molecular (MAMM) com Cu e Cd por DPASV e as concentrações de carbono orgânico total (COT) das soluções tituladas. Média \pm erro da média (n = 3).

MAMM	ccap Cu (M)	ccap Cd (M)	COT (mg L ⁻¹)
<i>A. granulata</i>	$2,0 (\pm 0,1) \times 10^{-7}$	-	Cu: $14,4 \pm 0,3$; Cd: $11,9 \pm 0,1$
<i>M. aeruginosa</i>	$1,7 (\pm 0,6) \times 10^{-7}$	$1,5 (\pm 0,2) \times 10^{-7}$	Cu e Cd: $11,9 \pm 0,1$
<i>A. spiroides</i>	$1,3 (\pm 0,2) \times 10^{-7}$	$4,4 (\pm 0,7) \times 10^{-7}$	Cu: $19,6 \pm 0,2$; Cd: $13,8 \pm 0,1$
Barra Bonita	$1,2 (\pm 0,4) \times 10^{-7}$	-	Cu: $12,9 \pm 0,1$; Cd: $12,8 \pm 0,1$

- complexação não detectada

Tabela 19. Composição dos monossacarídeos e análise elementar dos materiais de alta massa molecular (MAMM). Monossacarídeos reportados em porcentagens referentes ao material total. C, H, N e S reportados em proporções e sem correção da massa atômica. Média \pm erro da média (n=3).

	<i>A. granulata</i>	<i>M. aeruginosa</i>	<i>A. spiroides</i>	B. Bonita
Monossacarídeos				
Fucose	15,5 \pm 1,7	9,9 \pm 0,7	9,7 \pm 0,5	–
Galactose	10,1 \pm 0,7	16,3 \pm 0,3	4,2 \pm 0,1	16,1 \pm 0,1
Glicose	15,4 \pm 1,2	13,4 \pm 2,3	14,4 \pm 0,4	20,3 \pm 3,3
Manose	12,4 \pm 1,1	7,4 \pm 0,6	14,2 \pm 0,1	18,3 \pm 0,1
Ramnose	18,4 \pm 0,7	18,4 \pm 0,3	16,0 \pm 0,1	18,3 \pm 0,2
Xilose	17,2 \pm 1,2	19,7 \pm 0,5	10,9 \pm 1,3	23,7 \pm 0,1
Ácido glicurônico	9,0 \pm 0,6	–	16,3 \pm 0,4	–
Ácido galacturônico	–	8,9 \pm 0,4	–	–
N-acetil glicosamina	7,4 \pm 0,7	10,5 \pm 0,9	7,5 \pm 0,6	–
N-acetil galactosamina	–	–	10,0 \pm 0,8	–
Elementos				
N	3,39 \pm 0,01	2,42 \pm 0,02	3,39 \pm 0,11	2,13 \pm 0,04
C	27,66 \pm 0,03	29,60 \pm 0,02	29,93 \pm 0,03	26,88 \pm 0,03
H	5,73 \pm 0,09	6,65 \pm 0,01	6,33 \pm 0,01	4,70 \pm 0,04
S	3,86 \pm 0,04	2,37 \pm 0,09	2,51 \pm 0,07	4,42 \pm 0,11

– não detectado.

4.2.4) Fluorescência do material de alta massa molecular da água do reservatório

Soluções de concentrações distintas do MAMM liofilizado do reservatório foram analisadas quanto à intensidade de emissão de fluorescência e à concentração de COT. Por comparação, a concentração de COT também foi plotada versus a intensidade de emissão de fluorescência (Figura 20). O pico resultante das leituras destas soluções de MAMM foi detectado próximo de 400 nm, assim como aquele obtido na leitura de amostras totais filtradas (Tabela 7), indicando a presença de um material que fluoresce no mesmo comprimento de onda em ambas as análises. Os índices de correlação de Pearson (r) entre os parâmetros concentração da solução (mg L^{-1}), concentração de COT (mg L^{-1}) e intensidade de emissão de fluorescência, obtidos por regressão linear dos pontos dos 3 gráficos, apresentaram valores mais elevados que 0,99 (Figura 20). Portanto foi observada uma alta correspondência entre a fluorescência, COT e concentrações das soluções de MAMM. Foi demonstrado que o material liofilizado de Barra Bonita emite fluorescência quando em solução e nas condições de leitura citadas previamente, e que esta fluorescência é proporcional à concentração da solução e também proporcional ao conteúdo de COT das soluções. Portanto, medidas de fluorescência foram consideradas apropriadas para estudos da matéria orgânica coletada no reservatório, tanto para a fração total do filtrado quanto para a fração de alta massa molecular (MAMM).

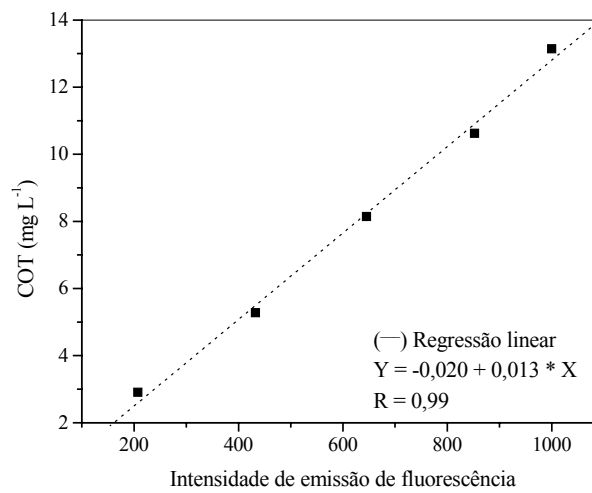
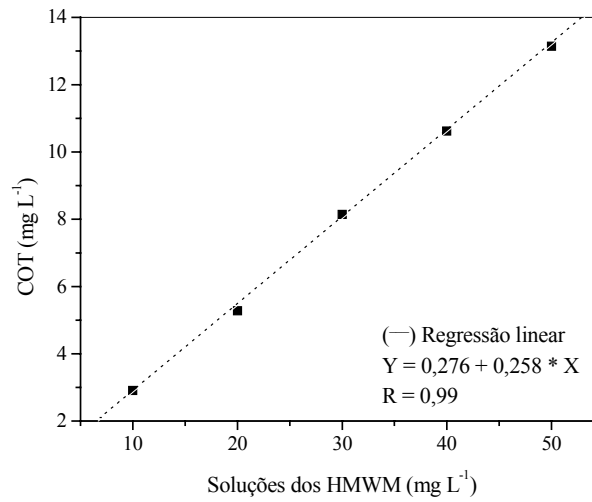
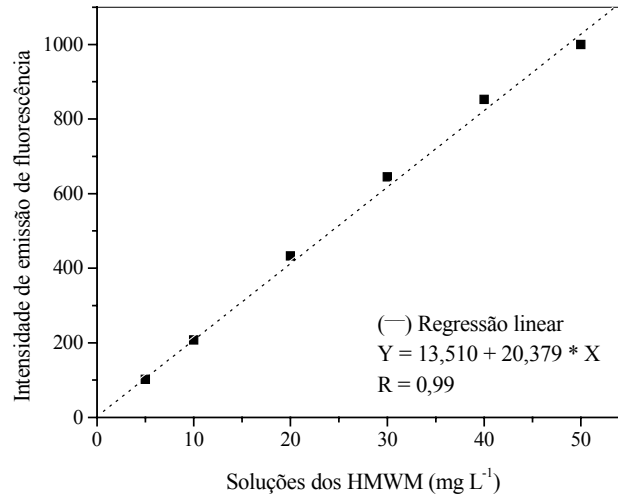


Figura 20. Gráficos das concentrações de soluções do MAMM de Barra Bonita versus intensidade (pico de fluorimetria), soluções versus carbono orgânico total (COT) e COT x intensidade.

5) DISCUSSÃO

Os tópicos principais do estudo de campo e de laboratório foram discutidos em separado. Em seguida, é apresentada uma discussão geral reunindo aspectos do trabalho de campo e de laboratório com a hipótese da tese.

Variáveis físico-químicas

Para a discussão das variáveis físico-químicas é importante considerar as características mistas entre os regimes lóticos e lênticos apresentadas por um reservatório, que tem heterogeneidade espacial entre características fluviais, de transição e lacustres, dependendo principalmente da distância da barragem e regime de vazão (Straškraba & Tundisi, 2000).

A coluna d'água teve a maioria dos perfis físico-químicos com variações nos valores em função da profundidade, geralmente atribuídas na literatura a diferenças de temperatura ou devido a características de vazão. É importante ressaltar que a influência desta variação é provavelmente em razão da localização do ponto de coleta. Este ponto se situa em um local aberto, afastado de margens e com correnteza considerável. Estratificação química de algumas variáveis foi sugerida, como exemplificado pelos perfis de pH. Contudo, não foi constatada a estratificação térmica típica de lagos temperados, com epilímnio de águas mais quentes e hipolímnio de águas mais frias delimitados pelo metalímnio, região com um decréscimo abrupto de temperatura, maior que 1 °C por metro (Wetzel, 1975). Em adição é considerado que reservatórios com tempo de retenção inferior a 300 dias, como Barra Bonita, sofrem influência maior da vazão na estrutura da coluna d'água, tornando os perfis de temperatura muito mais irregulares que em lagos (Straškraba & Tundisi, 2000). Alguns perfis em que a temperatura diminuiu com a profundidade, em até 5 °C de diferença, sugerem que houve divisão da coluna d'água em camadas com densidades distintas. A heterogeneidade da disposição de alguns perfis, com valores em decréscimo ou incremento com a profundidade dependendo da coleta analisada (e.g. perfis de turbidez) ou mesmo perfis considerados como invertidos (e.g. maior condutividade na superfície, na primavera de 2001) indicam a prevalência de instabilidade na coluna d'água. O efeito combinado da ação dos ventos, chuvas, rotinas de operação da barragem e entrada de material alóctone no reservatório têm sido descrito como possível causa da mistura da coluna d'água de reservatórios. Contudo, há a possibilidade de

estratificação, mesmo que para curtos períodos de tempo (Barbosa *et al.* 1999; Straškraba & Tundisi, 2000).

Os resultados obtidos nas coletas sazonais deste trabalho mostraram uma redução do pH com a proximidade do sedimento em quase todos os perfis das coletas. Esta característica é um indício de aumento das condições anóxicas na região próxima ao sedimento e está em concordância com a queda de concentração de oxigênio dissolvido. Em adição, houve uma maior variação nos valores de pH entre 1 e 4 m, correspondendo à profundidade da coluna fótica, onde espera-se o predomínio do processo fotossintético. Decréscimo do potencial de óxido-redução e das concentrações de oxigênio dissolvido são indícios de aumento dos processos de decomposição com a profundidade. As concentrações de Ca^{2+} diminuíram com aumento da profundidade e posteriormente aumentaram na região próxima ao fundo, provavelmente devido à precipitação de CaCO_3 seguida de dissolução deste composto, respectivamente, nestas duas regiões. O íon NH_4^+ seguiu um padrão de aumento na região próxima ao sedimento, sugerindo também a decomposição de matéria orgânica nesta região. O íon NO_3^- é a forma oxidada do nitrogênio, e segundo Brönmark & Hansson (1998), é esperado que seu perfil siga o das concentrações de oxigênio dissolvido. No presente estudo, foi observada uma redução nas concentrações de NO_3^- na superfície, seguida de aumento e nova redução na região mais profunda da coluna d'água, tornando estes perfis distintos dos perfis de oxigênio. A diminuição inicial de NO_3^- na superfície deve-se provavelmente ao crescimento e consumo fitoplanctônico. A redução das concentrações de NO_3^- nas camadas mais profundas seguiu a redução das concentrações de oxigênio, assim como citado em literatura (Buffle & DeVitre, 1993). Segundo Buffle & DeVitre (1993), a atividade fotossintética do fitoplâncton na camada superficial da coluna d'água é fonte de compostos oxidantes (e.g. O_2) e básicos (e.g. OH^-), causando a depleção de Ca^{2+} e HCO_3^- , com a precipitação de CaCO_3 em pH mais básico. Nas camadas mais profundas, a oxidação da matéria orgânica leva a condições mais ácidas e menos oxidantes (depleção dos agentes oxidantes na sequência O_2 , MnO_2 , NO_3^- , Fe_2O_3 , FeOOH , SO_4^{2-} ; liberação de CO_2) e à produção de compostos reduzidos (H_2O , Mn^{2+} , NH_4^+ , Fe^{2+} , H_2S , CH_4), além de haver um aumento de Ca^{2+} e HCO_3^- devido à dissolução de CaCO_3 nestas condições relativamente ácidas. Tanto a difusão mais lenta de agentes oxidantes em maiores profundidades, quanto a depleção destes agentes com o processo de decomposição causam um gradiente redox vertical com uma zona

reduzida nas partes mais profundas e outra oxidante próxima à superfície devido à proximidade com a atmosfera e ocorrência de fotossíntese.

A região da coluna d'água que faz interface com o sedimento teve valores dos perfis muitas vezes distintos do restante da coluna d'água, como exemplificado pelas concentrações de totais de sólidos dissolvidos, que em quase todas as coletas aumentaram de súbito nesta região. Este comportamento da interface com o sedimento sugere que os processos de sedimentação ou mesmo de ressurgência de materiais do fundo ocorrem com grande intensidade, indicando a importância e dinâmica desta região para a troca de materiais entre sedimento e coluna d'água. A importância da sedimentação de materiais no reservatório de Barra Bonita é confirmada por estudos sobre a carga de sólidos em suspensão, da qual somente 7% foi exportado e houve a retenção de 93% destes materiais (Oishi, 1997).

A profundidade da zona eufótica é influenciada principalmente pelas concentrações de substâncias dissolvidas e suspensas na coluna d'água (Brönmark & Hansson, 1998). Tanto a zona eufótica quanto o coeficiente de extinção da luz nas coletas foram grandemente influenciados pelo fitoplâncton, que teve biomassa quantificada por clorofila-a. As correlações entre Z_{eu} e k_d com a turbidez e totais de sólidos dissolvidos foram menores que entre Z_{eu} e k_d e as concentrações de clorofila-a, ou seja, os produtores primários foram os principais responsáveis pela atenuação da luz no período das coletas.

Composição monossacarídica na água do reservatório

Monossacarídeos foram detectados somente em amostras previamente hidrolisadas. Isto indica que os monossacarídeos presentes na água não estavam livres, mas faziam parte de moléculas, provavelmente constituindo polissacarídeos. A excreção de polissacarídeos por microalgas é supostamente uma das fontes destes monossacarídeos. É citado que a fração da MOD de baixa massa molecular liberada pelo fitoplâncton é utilizada por bactérias dentro de 24 h enquanto moléculas maiores precisam ser hidrolisadas antes da utilização, o que pode demorar dias, ao passo que somente uma pequena porção da excreção fitoplanctônica é considerada refratária (Lee & Henrichs, 1993). Portanto, a composição monossacarídica na coluna d'água é derivada de monossacarídeos em cadeia, provavelmente em compostos de alta massa molecular, quer sejam resultantes de decomposição prévia, quer sejam de materiais recentemente liberados pela biota.

Metais na água do reservatório: especiação e complexação

As concentrações totais dos metais Cu e Cd tiveram ordens de grandeza muito próximas no período de dois anos das coletas sazonais, por volta de 10^{-7} M, com algumas exceções. Contudo, foi possível observar o caráter distinto das espécies destes metais na fração dissolvida da água do reservatório. A maior porcentagem de Cu correspondeu a espécies associadas à MOD, enquanto a maioria do Cd foi detectada em espécie iônica. A especiação destes metais, obtida por modelagem das concentrações de íons no reservatório de Barra Bonita, deste e de outros trabalhos, corroborou os resultados experimentais.

Na modelagem da especiação, a grande maioria do Cu foi complexada pelos ligantes de alta massa molecular, denominados CuBB e caracterizados com os valores médios dos parâmetros de complexação de Cu da classe de maior afinidade de ligantes entre as 8 coletas. A similaridade entre concentrações de Cu^{2+} medidas nas coletas e obtidas pelo programa de especiação certificou a adequação do modelo quanto à minoria de Cu iônico e à associação dominante do Cu aos ligantes CuBB em relação ao restante dos compostos supostamente presentes na água. Os dados fornecidos ao programa basearam-se em compostos considerados principais na composição de águas doces (Wetzel, 1975; Mylon *et al.* 2003), e suas respectivas concentrações previamente citadas na literatura para o reservatório (Oliveira, 1993; Barbosa *et al.* 1999; CETESB, 2003).

Os valores de CL obtidos por ISE indicaram que os ligantes para Cu estavam presentes sempre em excesso às concentrações de Cu_{tot} , assim como Achterberg *et al.* (1997) relataram a concentração de ligantes naturais de Cu um pouco maiores que o Cu total dissolvido presente no lago Esthwaite, na Inglaterra. Contudo o Cu^{2+} foi detectado em todas as coletas da presente investigação, e sempre com duas a três ordens de grandeza inferior à concentração total. Mesmo com ligantes em excesso, é sugerido que as concentrações totais influenciaram as concentrações iônicas de Cu, como demonstrado pelo coeficiente de correlação relativamente alto ($r = 0,88$) entre Cu_{tot} e Cu^{2+} da modelagem. Mas é preciso considerar que os parâmetros de complexação de Cu foram muito similares entre as coletas, aumentando assim a correlação entre Cu_{tot} e Cu^{2+} .

A porcentagem de $\text{Cu}_{\text{láb}}$ (24,4 %) em relação ao Cu_{tot} na amostra coletada em março de 2003 (complementar às sazonais) mostrou que houve complexação de Cu por compostos lábeis presentes na água do reservatório, mas que ainda assim houve o

predomínio de compostos não-lábeis. Foi demonstrado também que o Cu_{tot} dissolvido foi maior em porcentagem em relação ao Cu particulado recuperável, em determinações que tiveram a mesma técnica de digestão. Com isto, é indicado o compartimento dissolvido como aquele que contém maior quantidade de metais disponíveis após esta digestão, em relação ao material particulado presente na água do reservatório. A similaridade entre os parâmetros de complexação de Cu durante os dois anos de coleta foi marcante se comparada à variação de parâmetros físico-químicos como pH, temperatura, COD, entre outros, sugerindo um mecanismo de regulação dos íons Cu semelhante a sistemas tampão.

Com as metodologias empregadas (ISE e DPASV) no presente estudo, não foram detectados ligantes para Cd na fração dissolvida da água do reservatório. A predominância das concentrações iônicas deste metal foi indicada tanto pela semelhança dos valores de Cd^{2+} e Cd_{MO} , quanto pelos resultados do modelo de especiação, no qual o Cd^{2+} representou a maior porcentagem entre as espécies, seguido pelas associações inorgânicas de CdCl^+ e CdSO_4 (aq) em duas ordens de grandeza inferiores às concentrações iônicas. Testes de ANOVA paramétrico mostraram que há maiores variações das concentrações de Cd^{2+} entre as coletas sazonais do que as concentrações de Cu^{2+} , sugerindo a ausência de regulação de Cd^{2+} , ao contrário da sugerida regulação dos íons Cu^{2+} . Estima-se que este tenha sido o motivo pelo qual a concentração de Cd^{2+} obtido pela modelagem teve maior identificação com as concentrações totais de Cd ($\cong \text{Cd}_{\text{MO}}$), do que com a média das determinações de Cd^{2+} , já que em algumas coletas o Cd^{2+} (ISE) superou o Cd_{MO} .

No período estudado, as concentrações de Cu_{tot} dissolvido não ultrapassaram os limites máximos estabelecidos para as classes 1 a 3 de águas interiores segundo os padrões de qualidade estabelecidos pela Resolução nº 20 do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA 20/86). O Cu^{2+} variou de $3,0 \times 10^{-10}$ M a $1,1 \times 10^{-9}$ M, concentrações relativamente próximas às citadas como limitantes do crescimento das espécies fitoplanctônicas *Gonyaulax tamarensis* ($4,0 \times 10^{-11}$ M, Anderson & Morel, 1978), *Monochrysis lutheri* ($1,0 \times 10^{-9}$ M, Sunda & Lewis, 1978), *Ceratium hirundella* ($1,0 \times 10^{-10}$ M, McKnight, 1981) e *Kirchneriella aperta* ($6,0 \times 10^{-10}$ M, Lombardi *et al.* 2002). Contudo, estima-se que o fitoplâncton presente no reservatório de Barra Bonita esteja adaptado a estas concentrações de Cu^{2+} , já que crescimentos excessivos do fitoplâncton ocorrem com frequência neste reservatório (Calijuri & Dos Santos, 1996). O Cd^{2+} , considerado uma das espécies mais biodisponíveis, apresentou concentrações

superiores aos limites de Cd total máximos das classes 1 a 3 em todas as coletas, exceto em março de 2001, inferior ao limite máximo da classe 3. Em adição, nos dois anos de coleta de dados de campo foi observada uma tendência de aumento do Cd²⁺. Logo, o Cd é sugerido como potencial agente tóxico da água do reservatório. Concentrações totais de Cd e Cu na água de Barra Bonita foram reportadas previamente, como no trabalho de Costa (2001), que obteve, por espectrometria de absorção atômica, resultados de Cu abaixo dos limites máximos das classes 1 a 3, mas Cd acima dos máximos para as classes 1 e 2 em três de seis coletas realizadas. Segundo apresentado em Costa (2001), o limite para a classe 3 não foi superado pelas concentrações de Cd, como reportado no presente trabalho.

Os resultados da especiação e da complexação de Cu e Cd deste trabalho estão de acordo com estudos prévios destes metais em ambientes naturais. No reservatório de Woronora (Austrália), Florence (1977) obteve a maioria do Cd em espécies livres e lábeis, e muito pouca associação com o COD, enquanto a grande maioria do Cu estava associado ao COD, que variou de 2,7 a 4,5 mg L⁻¹. Gächter *et al.* (1978) obtiveram 65 a 70 % do Cu da água do lago eutrófico Alpnach (Suíça) associado a macromoléculas orgânicas e dissolvidas, com duas classes de ligantes, log de K'₁ entre 10,1 e 10,7, CL₁ de 3,0 a 7,0 x 10⁻⁸ M, log K'₂ máximo de 7,4 e CL₂ de 1,8 a 2,6 x 10⁻⁶ M; estes ligantes foram considerados controladores da biodisponibilidade de Cu ao fitoplâncton. Sunda & Lewis (1978) encontraram mais de 99 % do Cu complexado em amostras filtradas (< 0,45 µm) de água de rios, nas quais somente 1 % do Cu estava em espécies inorgânicas. Mais do que 94 % do Cu dissolvido foi complexado por ligantes naturais em um lago estudado por Achterberg *et al.* (1997).

Materiais de alta massa molecular excretados em cultivos das microalgas, e isolados da água do reservatório: capacidade de complexação e análises monossacarídica e elementar

A complexação de Cu foi verificada tanto para os MAMM da água do reservatório como também para os materiais excretados pelas microalgas. O Cd foi complexado, mas somente pelos materiais das cianofíceas, que também apresentaram os mais altos valores dos parâmetros K' e CL da complexação de Cu. Estes resultados podem explicar a menor tolerância de metais pelas cianofíceas citada na literatura, que teriam então desenvolvido a produção de ligantes extracelulares como sequestradores de metais no ambiente externo para prevenção da entrada nas células (Stokes, 1983;

Bruland *et al.* 1991), e com maior força de associação a metais em comparação aos ligantes excretados por espécies fitoplanctônicas eucarióticas. Em adição, é estimado que as condições unialgais na obtenção dos MAMM das algas cianofíceas não tenha interferido na capacidade de complexação destes com os metais estudados, já que foi estimada uma biomassa bacteriana insignificante nestes cultivos. Uma maior complexação de Cu e Cd pelos MAMM das cianofíceas foi também relatada por McKnight & Morel (1979), que obtiveram ligantes com maior afinidade para Cu nos materiais excretados por cianofíceas ($\log K' = 8 - 12$; $CL \cong 5,0 \times 10^{-7}$ M) em comparação a algas eucarióticas ($\log K' = 0,5$; $CL > 1,0 \times 10^{-6}$ M). Os valores mais elevados dos parâmetros K' e CL na complexação de Cu em relação aos parâmetros de Cd, obtidos pelos MAMM das cianofíceas no presente trabalho, confirmaram a maior afinidade do Cu por estes ligantes orgânicos de alta massa molecular.

A presença de duas classes de ligantes obtidas neste trabalho também foi verificada nos MAMM produzidos por microalgas e reportados em Kaplan *et al.* (1988), para polissacarídeos excretados por *Chlorella stigmatophora*, que complexou $6,3 \times 10^{-6}$ M de Cu e $1,3 \times 10^{-6}$ M de Cd. Da mesma forma, os MAMM de culturas de *Synura* sp. apresentaram duas classes de ligantes para Cu, com $\log K'_1$ 8,4, $\log K'_2$ 5,9, CL_1 $2,0 \times 10^{-6}$ M e CL_2 $1,6 \times 10^{-5}$ M (Lombardi & Vieira, 1998).

A complexação de metais por polissacarídeos de microalgas é considerada ocorrer através de interações com as cargas negativas presentes nestas macromoléculas (Manzini *et al.* 1984). Os grupos carboxílicos de monossacarídeos ácidos, como exemplo, ácidos urônicos, são sugeridos como sítios de complexação de metais nos polissacarídeos (Leppard, 1995). Kaplan (1988) reportou a complexação de Cu e Cd somente pelos polissacarídeos excretados de *Chlorella stigmatophora*, que apresentaram 5 vezes mais ácidos urônicos que os polissacarídeos de *Chlorella salina*. O maior conteúdo de monossacarídeos ácidos do MAMM de *A. spiroides* do presente estudo pode ser o motivo da maior complexação de Cu e Cd por este material. No entanto, o MAMM da água do reservatório complexou Cu apesar de não conter monossacarídeos ácidos, indicando que a complexação ocorre também em outros sítios além dos monossacarídeos ácidos, mas resultando em parâmetros de complexação mais baixos. Portanto, foi observada uma tendência de quanto maior o conteúdo dos monossacarídeos ácido glicurônico e galacturônico nos MAMM, maior os parâmetros de complexação obtidos para Cu e Cd, em contraste aos parâmetros mais baixos no MAMM sem estes monossacarídeos. Em adição, diferenças nos parâmetros de

complexação de Cu e Cd não foram relacionados às variações nas proporções de C, H, N e S, sugerindo que a complexação dos metais foi influenciada mais pela configuração química destes elementos do que suas proporções.

Os MAMM da água do reservatório e das microalgas deste estudo tiveram forças de associação a Cu e Cd consideradas intermediárias a fracas, em comparação com outros ligantes citados na literatura (Town & Filella, 2000). A variação em uma ordem de grandeza das forças de associação para a classe 1 de ligantes de Cu dos MAMM ($\log K'_1 = 8,6 - 9,5$) teve semelhança com resultados de Van den Berg *et al.* (1979), onde os K' dos ligantes para Cu na água da Baía de Quinte e do Lago Ontário foram comparáveis àqueles produzidos por algas oriundas destes ambientes ($\log K'$ entre 7,6 e 8,7), sugerindo que ligantes presentes na água do lago podem ter sido derivados de excreção biológica. Moffett & Brand (1996) apresentaram uma discussão similar ao comparar a força de associação de ligantes presentes em águas oceânicas ($\log K'$ entre 12,6 e 13,2) aos ligantes de Cu com alta força de associação excretados pela cianofícea marinha *Synechococcus* sp. ($\log K'$ entre 12,3 e 13,8). Xue & Sigg (1993) citaram que os ligantes de Cu no lago eutrófico Greifen foram produzidos por algas, com a observação de que as concentrações de Cu^{2+} foram baixas durante 'blooms' de algas na primavera e altas no inverno, indicando um padrão sazonal similar ao da produtividade algal.

Aspectos do trabalho de campo e de laboratório e corroboração com a tese

Foi demonstrado neste trabalho que os MAMM excretados por microalgas dominantes e locais do reservatório complexaram Cu, assim como o MAMM da água de Barra Bonita, enquanto Cd foi complexado por ligantes mais fracos que os de Cu e somente pelo material das cianofíceas. Logo, as microalgas dominantes no reservatório de Barra Bonita produzem e excretam MAMM contendo ligantes para Cu com força de associação intermediária a fraca assim como o material isolado do reservatório.

O estudo inédito da especiação no reservatório de Barra Bonita, nas coletas sazonais deste trabalho, mostrou a predominância e grande variação das concentrações de Cd em forma iônica, como a ausência de ligantes para este metal na água do reservatório. A especiação do Cu foi caracterizada por predomínio de espécies associadas à matéria orgânica, baixa concentração e menor variação de Cu^{2+} em relação ao Cd^{2+} , além da presença de ligantes de Cu com parâmetros de complexação similares durante o período estudado. Este também é o primeiro trabalho feito em Barra Bonita

quanto à caracterização dos parâmetros de complexação dos ligantes de Cu. Os MAMM das microalgas e da água do reservatório contêm ligantes de Cu com força de associação intermediária a fraca, assim como os ligantes dissolvidos totais das coletas sazonais. Portanto, os materiais excretados por microalgas dominantes no reservatório apresentaram características semelhantes na complexação de Cu aos ligantes da fração dissolvida da água do reservatório, tanto totais quanto de alta massa molecular. Enquanto não é possível concluir a dimensão da contribuição direta dos excretados algais em relação a outras origens para os ligantes presentes no reservatório, ficou clara a demonstração da hipótese deste trabalho. Esta demonstração refere-se à verificação do potencial dos excretados das espécies estudadas na associação a Cu, que apresentaram ligantes de Cu com força de associação semelhante às forças de associação de ligantes dissolvidos na água do reservatório. Tanto nas análises diretas quanto na modelagem da especiação de dados de campo, tais ligantes foram os principais responsáveis pela associação do Cu e provavelmente os controladores das baixas concentrações de Cu^{2+} . Ainda, com o potencial de associação a Cu demonstrado pelos MAMM das microalgas, é sugerido que estes compostos, na maioria polissacarídeos, tenham um papel também importante no destino dos metais, quer seja a degradação e consumo por heterótrofos, formação de agregados e o carreamento do excesso de metais para o sedimento. Os perfis das variáveis físico-químicas e a suposta instabilidade e mistura frequentes da coluna d'água no reservatório apontaram um contato também frequente com os materiais presentes no compartimento do sedimento, importante por representar tanto um sumidouro como fonte de metais para a coluna d'água.

Foi demonstrada, portanto, a produção e excreção de ligantes por populações dominantes de microalgas, com um grande potencial de influência na biodisponibilidade, especiação e mobilidade de metais, principalmente o Cu e outros de comportamento químico semelhante, e presentes na coluna d'água do reservatório de Barra Bonita.

6) CONCLUSÕES

Na especiação química do Cd dissolvido, houve predominância das concentrações iônicas na água do reservatório, enquanto a maioria do Cu dissolvido estava associado à matéria orgânica.

A água do reservatório de Barra Bonita teve ligantes com força de associação intermediária a fraca para Cu, e com parâmetros de complexação semelhantes durante todo o período estudado. Foi também verificada a ausência de ligantes para Cd.

O modelo de especiação aplicado às concentrações totais e parâmetros de complexação dos ligantes de Cu reproduziu as concentrações de Cu^{2+} no reservatório de Barra Bonita, evidenciando a importância destes ligantes, que representaram a maior porcentagem da associação de Cu entre os compostos resultantes da modelagem.

Todos os MAMM estudados complexaram Cu. O Cd foi complexado somente pelos MAMM procedentes da excreção das algas cianofíceas.

A extensão da complexação de Cu e Cd pelos MAMM foi relacionada ao conteúdo de monossacarídeos ácidos, enquanto não foi observada uma relação aparente entre a composição dos elementos C, H, N e S e os parâmetros de complexação dos metais.

Os MAMM excretados por microalgas dominantes no reservatório de Barra Bonita complexaram Cu com forças de associação intermediárias a fracas, assim como os ligantes totais dissolvidos e os presentes nos MAMM do reservatório, sugerindo que as espécies estudadas têm um grande potencial de influência na dinâmica de Cu e outros metais de comportamento semelhante, nos processos de especiação e complexação de metais na água do reservatório de Barra Bonita.

7) REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AARONSON, S. Excretion of organic matter by phytoplankton in vitro. **Limnol. Oceanogr.**, v. 23, p. 838, 1978.
- ACHTERBERG, E. P.; VAN DEN BERG, C. M. G.; BOUSSEMART, M.; DAVIDSON, W. Speciation and cycling of trace metals in Esthwaite water: a productive english lake with seasonal deep-water anoxia. **Geochim. Cosmoch. Acta**, v. 61, n. 24, p. 5233-5253, 1997.
- ACHTERBERG, E. P.; VAN ELTEREN, J. T.; KOLAR, Z. I. Species kinetics and heterogeneous reactivity of dissolved Cu in natural freshwaters. **Environ. Sci. Technol.**, v. 36, p. 914-920, 2002.
- AHNER, B. A.; MOREL, F. M. M. Phytochelatin production in marine algae. 2. Induction by various metals. **Limnol. Oceanogr.**, v. 40, n. 4, p. 658-665, 1995.
- ALLEN, H. E.; HANSEN, D. J. The importance of trace metal speciation to water quality criteria. **Water Environ. Res.**, v. 68, p. 42-54, 1996.
- ANDERSON D. M.; MOREL M. M. Copper sensitivity of *Gonyaulax tamarensis*. **Limnol. Oceanogr.**, v. 23, n. 2, p. 283-295, 1978.
- BARBOSA, F. A. R.; PADISÁK, J.; ESPÍNDOLA, E. L. G.; BORICS, G.; & ROCHA, O. The cascading reservoir continuum concept (CRCC) and its application to the river Tietê-basin, São Paulo state, Brazil. In: TUNDISI, J. G.; STRAŠKRABA, M. (Ed.). **Theoretical reservoir ecology and its applications**. São Carlos: International Institute of Ecology, 1999. p. 425-437.
- BATLEY, G. E.; FLORENCE, T. M. Determination of the chemical forms of dissolved cadmium, lead and copper in seawater. **Mar. Chem.**, v. 4, p. 347-363, 1976.
- BEVILACQUA, J. E. Caracterização da labilidade de espécies químicas de chumbo em água do mar, via modelos químicos – comparação com amostras da região estuarino-lagunar de Cananéia, por voltametria de redissolução anódica. 1992. 153p. Dissertação de mestrado (Programa de pós-graduação em química). Universidade de São Paulo, São Paulo, 1992.
- BOURRELLY, P. **Les algues d'eau douce**: Tome II: Algues jaunes et brunes. Paris, N. Boubée & Cie., 1968. 438 p.

BRÖNMARK, C.; HANSSON, L. A. **The biology of lakes and ponds**. Oxford, Oxford University Press, 1998. 216 p.

BROOK, A. J. The biology of desmids. In: **Botanical Monographs**. Oxford: Blackwell, 1981. v. 16, 276 p.

BRULAND, K. W.; DONAT, J. R.; HUTCHINS, D. A. Interactive influences of bioactive trace metals on biological production in oceanic waters. **Limnol. Oceanogr.**, v. 36, n. 8, p. 1555-1577, 1991.

BUFFLE, J. **Complexation reactions in aquatic systems: an analytical approach**. West Sussex: Ellis Horwood, 1988. 692 p.

BUFFLE, J.; DEVITRE, R. R. **Chemical and biological regulation of aquatic systems**. Boca Raton: Lewis Publishers, 1993. 385 p.

CÁCERES, O.; VIEIRA, A. A. H. Produção de carboidratos intra e extracelular durante o crescimento de quatro espécies de algas de água doce. **An. Sem. Reg. Ecol. VI**, p. 183-195, 1988.

CALIJURI, M. C. A comunidade fitoplanctônica em um reservatório tropical (Barra Bonita, SP). 1999. 211p. Tese (Livre Docência, Escola de Engenharia de São Carlos). Universidade de São Paulo, São Carlos, 1999.

CALIJURI, M. C.; DOS SANTOS, A. C. A. Short-term changes in the Barra Bonita reservoir (São Paulo, Brazil): emphasis on the phytoplankton communities. **Hydrobiologia**, v. 330, p. 163-175, 1996.

CALIJURI, M. C.; DOS SANTOS, A. C. A. Temporal variations in phytoplankton primary production in a tropical reservoir (Barra Bonita, SP – Brazil). **Hydrobiologia**, v. 445, p. 11-26, 2001.

CAMPBELL, P. G. C.; TWISS, M. R.; WILKINSON, K. J. Accumulation of natural organic matter on the surfaces of living cells: implications for the interaction of toxic solutes with aquatic biota. **Can. J. Fish. Aquat. Sci.**, v. 54, p. 2543-2554, 1997.

CAMPOS, M. L. A. M.; MELLO, L. C.; ZANETTE, D. R.; SIERRA, M. S.; BENDO, A. Construção de um reator de baixo custo para a fotodegradação da matéria orgânica

em águas naturais e sua aplicação no estudo da especiação do cobre por voltametria. **Quím. nova**, v. 24, p.257-261, 2001.

CETESB. **Relatório de qualidade das águas interiores do Estado de São Paulo 2002**. São Paulo: CETESB, 2003. 273 p.

CHAU, Y. K.; GÄCHTER, R.; LUM-SHUE-CHAN, K. Determination of the apparent complexing capacity of lake waters. **J. Fish. Res. Board Can.**, v. 31, p. 1515-1519, 1974.

COSTA, J. B. **Avaliação ecotoxicológica da água e sedimento de tributários do reservatório de Barra Bonita (Médio Tietê Superior – SP)**. 2001. 281 p. Tese (Doutorado, Escola de Engenharia de São Carlos). Universidade de São Paulo, São Carlos, 2001.

COVINGTON, A. K. **Ion-selective electrode methodology**. Boca Raton: CRC Press, 1984. v. 1, 129 p.

DOS SANTOS, A. C. A; CALIJURI, M. C. Survival strategies of some species of the phytoplankton community in the Barra Bonita Reservoir (São Paulo, Brazil). **Hydrobiologia**, v. 367: 139-152, 1998.

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

ERRÉCALDE, O.; CAMPBELL, P. G. C. Cadmium and zinc bioavailability to *Selenastrum capricornutum* (Chlorophyceae): accidental metal uptake and toxicity in the presence of citrate. **J. Phycol.**, v. 36, p. 473-483, 2000.

EVANS, A. **Potentiometry and ion selective electrodes**. London: John Wiley, 1987. 304 p.

FISH, W.; MOREL, M. M. Characterization of organic copper-complexing agents released by *Daphnia magna*. **Can. J. Fish. Aquat. Sci.**, v. 40, p. 1270-1277, 1983.

FLORENCE, T. M. Trace metal species in fresh waters. **Water Res.**, v. 11, p. 681-687, 1977.

FLORENCE, T. M. Electrochemical approaches to trace element speciation in waters. A review. **Analyst**, v. 111, p. 489-505, 1986.

FOGG, G. E. Excretion of organic matter by phytoplankton. **Limnol. Oceanogr.**, v. 22, n. 3, p. 576-577, 1977.

FOGG, G. E. The ecological significance of extracellular products of phytoplankton photosynthesis. **Botanica Marina**, v. 26, p. 3-14, 1983.

GÄCHTER, R.; DAVIS, J. S.; MARÈS, A. Regulation of copper availability to phytoplankton by macromolecules in lake water. **Environ. Sci. Technol.**, v. 12, n. 13, p. 1416-1421, 1978.

GARNIER, J. M.; GUIEU, C. Release of cadmium in the Danube estuary: contribution of physical and chemical processes as determined by an experimental approach. **Mar. Environ. Res.**, v. 55, p. 5-25, 2003.

GREMM, T. J.; KAPLAN, L. A. Dissolved carbohydrates in streamwater determined by HPLC and pulsed amperometric detection. **Limnol. Oceanogr.**, v. 42, n. 2, p. 385-393, 1997.

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

GOUVÊA, S. P.; VIEIRA, A. A. H.; LOMBARDI, A. T. No effect of N or P deficiency on capsule regeneration in *Staurodesmus convergens* (Zygnematophyceae, Chlorophyta). **Phycologia**, v. 41, p. 585-589, 2002.

GOUVÊA, S. P.; VIEIRA, A. A. H.; LOMBARDI, A. T. Copper and cadmium complexation with high molecular weight materials of microalgae strains and of water from a eutrophic reservoir. **Hydrobiologia**, 2004. Submetido.

GROSSART, H. P.; SIMON, M. Limnetic macroscopic organic aggregates (lake snow): Occurrence, characteristics, and microbial dynamics in Lake Constance. **Limnol. Oceanogr.**, v. 38, n.3, p. 532-546, 1993.

GROSSART, H. P.; SIMON, M.; LOGAN, B. E. Formation of macroscopic organic aggregates (lake snow) in a large lake: The significance of transparent exopolymer

particles, phytoplankton, and zooplankton. **Limnol. Oceanogr**, v. 42, n. 8, p. 1651-1659, 1997.

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

GUNDERSEN, P.; STEINNES, E. Influence of pH and TOC concentration on Cu, Zn, Cd, and Al speciation in rivers. **Water Res.**, v. 37, p. 307-318, 2003.

HELLEBUST, J. A. Excretion of some organic compounds by marine phytoplankton. **Limnol. Oceanogr**, v. 10, p. 192-206, 1965.

HUANG, Z.; LIU, Y.; PAULSEN, B. S.; KLAVENESS, D. Studies on polysaccharides from three edible species of *Nostoc* (Cyanobacteria) with different colony morphologies: Comparison of monosaccharide compositions and viscosities of polysaccharides from field colonies and suspension cultures. **J. Phycol.**, v. 34, p. 962-968, 1998.

HUTCHINSON, G. E. **A treatise on limnology**: Vol. II: Introduction to lake biology and limnology. New York: John Wiley, 1967. 1115 p.

JARDIM, W. F. **Some chemical and biological aspects of copper toxicity to cyanobacteria**. 1983, 100 p. Tese (Doutorado), University of Liverpool, Liverpool. 1983.

JARDIM, W. F.; GIMENEZ, S. M. N.; NERY, J. H. S. The use of cupric ion buffers on the calibration of ion selective electrodes. **An. V Simp. Brasil. Eletroq. Eletroan.**, p. 226-230, 1986.

JATI, S. **Estrutura e dinâmica da comunidade fitoplanctônica no reservatório de Barra Bonita, SP: uma análise em diferentes escalas de tempo**. 1998, 147 p. Dissertação (Mestrado, Escola de Engenharia de São Carlos). Universidade de São Paulo, São Carlos, 1998.

KAPLAN, D.; CHRISTIAEN, D.; ARAD, S. M. Binding of heavy metals by algal polysaccharides. In: STADLER, T.; MOLLION, J.; CHRISTIAEN, D. (Ed.) **Algal Biotechnology**. Elsevier Applied Sciences, 1988, p. 179-87.

KOZARAC, Z.; PLAVŠIĆ, M.; ĆOSOVIĆ, B. Interaction of cadmium and copper with surface-active organic matter and complexing ligands released by marine phytoplankton. **Mar. Chem.**, v. 26, p. 313-330, 1989.

LEE, C.; HENRICHS, S. M. How the nature of dissolved organic matter might affect the analysis of dissolved organic carbon. **Mar. Chem.**, 41: 105-120. 1993.

LEPPARD, G. G. The characterization of algal and microbial mucilages and their aggregates in aquatic ecosystems. **Sci. Total Env.**, v. 165, p. 103-131, 1995.

LOMBARDI, A. T.; JARDIM, W. F. The complexation of marine and terrestrial organic materials with copper (II) ions as determined by fluorescence quenching. **Chem. Spec. Bioavail.**, v. 9, p. 27-34, 1997.

LOMBARDI, A. T.; VIEIRA, A. A. H. Copper and lead complexation by high molecular weight compounds produced by *Synura* sp. (Chrysophyceae). **Phycologia**, v. 37, n. 1, p. 34-39, 1998.

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

LOMBARDI, A. T.; VIEIRA, A. A. H. Copper complexation by Cyanophyta and Chlorophyta exudates. **Phycologia**, v. 39, n. 2, p. 118-125, 2000.

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

LUPESCU, N.; ARAD, S. M.; GERESH, S. Structure of some sulfated sugars isolated after acid hydrolysis of the extracellular polysaccharide of *Porphyridium* sp., a unicellular red alga. **Carbohydr. Res.**, v. 210, p. 349-352, 1991.

MACFIE, S. M.; TARMOHAMED, Y.; WELBOURN, P. M. Effects of cadmium, cobalt, copper, and nickel on growth of the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*: the influences of the cell wall and pH. **Arch. Environ. Contam. Toxicol.**, v. 27, p. 454-458, 1994.

MAGUE, T. H.; FRIBERG, E.; HUGHES, D. J.; MORRIS, I. Extracellular release of carbon by marine phytoplankton; a physiological approach. **Limnol. Oceanogr.**, v. 25, n. 2, p. 262-279, 1980.

MANZINI, G.; CESARO, A.; DELBEN, F.; PAOLETTI, S.; REISENHOFER, E. Copper(II) binding by natural ionic polysaccharides Part I. Potentiometric and spectroscopic data. **Bioelectrochemistry and Bioenergetics**, v. 12, p. 443-454, 1984.

MART, L. Prevention of contamination and other accuracy risks in voltammetric trace metal analysis of natural waters. Part II: Collection of surface water samples. **Fresenius Z. Anal. Chem.**, v. 299, p. 97-102, 1979.

MCCRADY, J. K.; CHAPMAN, G. A. Determination of copper complexing capacity of natural river water, well water and artificially reconstituted water. **Water Res.**, v. 13, p. 143-150, 1979.

MCKNIGHT, D. M. Chemical and biological processes controlling the response of a freshwater ecosystem to copper stress; a field study of the CuSO₄ treatment of Mill Pond Reservoir, Burlington, Massachusetts. **Limnol. Oceanogr.**, v. 26, p. 518-531, 1981.

MCKNIGHT, D. M.; MOREL, F. M. M. Release of weak and strong copper-complexing agents by algae. **Limnol. Oceanogr.**, v. 24, n. 5, p. 823-837, 1979.

MOFFETT, J. W. Temporal and spatial variability of copper complexation by strong chelators in the Sargasso Sea. **Deep-Sea Res. I**, v. 42, p. 1273-1295, 1995.

MOFFETT, J. W.; BRAND, L. E. Production of strong, extracellular Cu chelators by marine cyanobacteria in response to Cu stress. **Limnol. Oceanogr.**, v. 41, n. 3, p. 388-395, 1996.

MOPPER, K.; SCHULTZ, A.; CHEVOLOT, L.; GERMAIN, C.; REVUELTA, R.; DAWSON, R. Determination of sugars in unconcentrated seawater and other natural waters by liquid chromatography and pulsed amperometric detection. **Environ. Sci. Technol.**, v. 26, n. 1, p. 133-138, 1992.

MOPPER, K.; ZHOU, J.; RAMANA, K. S.; PASSOW, U.; DAM, H. G.; DRAPEAU, D. T. The role of surface-active carbohydrates in the flocculation of a diatom bloom in a mesocosm. **Deep-Sea Res. II**, v. 42, n. 1, p. 47-73, 1995.

MORRISON, G. M. P.; FLORENCE, T. M. Comparison of physicochemical speciation procedures with metal toxicity to *Chlorella pyrenoidosa*. Copper complexation capacity. **Electroanalysis**, v. 1, p. 107-112, 1989.

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

MYLON, S. E.; TWINING, B. S.; FISHER, N. S.; BENOIT, G. Relating the speciation of Cd, Cu and Pb in two Connecticut rivers with their uptake in algae. **Environ. Sci. Technol.**, v. 37, p. 1261-1267, 2003.

NEUBECKER, T. A.; ALLEN, H. E. The measurement of complexation capacity and conditional stability constants for ligands in natural waters. **Water Res.**, v. 17, p. 1-14, 1983.

NICOLAUS, B.; PANICO, A.; LAMA, L.; ROMANO, I.; MANCA, M. C.; DEGIULIO, A.; GAMBACORTA, A. Chemical composition and production of exopolysaccharides from representative members of heterocystous and non-heterocystous cyanobacteria. **Phytochem.**, v. 52, p. 639-647, 1999.

OISHI, M K. **Caracterização do meio físico, das características físicas e químicas e de fluxo de nutrientes em tributários de sub-bacias hidrográficas da bacia hidrográfica do reservatório de Barra Bonita (Médio Tietê – SP)**. 1997, 199 p. Tese (Doutorado, Escola de Engenharia de São Carlos). Universidade de São Paulo, São Carlos, 1997.

OLIVEIRA, H. T. **Avaliação das condições limnológicas de um compartimento (braço do Rio Capivara) e sua interação com o Reservatório de Barra Bonita, S. P., com ênfase na comunidade fitoplânctônica**. 1993. Tese (Doutorado, Escola de Engenharia de São Carlos). Universidade de São Paulo, São Carlos, 1993.

ORR, P. T.; JONES, G. J. Relationship between microcystin production and cell division rates in nitrogen-limited *Microcystis aeruginosa* cultures. **Limnol. Oceanogr.**, v. 43, n. 7, p. 1604-1614, 1998.

OSTAPCZUK, P.; VALENTA, P.; RÜTZEL, H.; NÜRNBERG, H W. Application of differential pulse anodic stripping voltammetry to the determination of heavy metals in environmental samples. **Sci. Total Env.**, v. 60, p. 1-16, 1987.

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

PHINNEY, J. T.; BRULAND, K. W. Uptake of lipophilic organic Cu, Cd and Pb complexes in the coastal diatom *Thalassiosira weissflogii*. **Environ. Sci. Technol.**, v. 28, n. 11, p. 1781-1790, 1994.

POLDOSKI, J. E.; GLASS, G. E. Anodic stripping voltammetry at a mercury film electrode: baseline concentrations of cadmium, lead, and copper in selected natural waters. **Anal. Chim. Acta**, v. 101, p. 79-88, 1978.

PORTER, K. G. Selective grazing and differential digestion of algae by zooplankton. **Nature**, v. 244: 179-180. 1973.

PRICHARD, E. **Trace analysis**: a structured approach to obtaining reliable results. Cambridge: The Royal Society of Chemistry, 1996. 404 p.

PRINGSHEIM, E. G. **Pure culture of algae**. London: Cambridge Press., 1946. 119 p.

RACHLIN, J. W.; JENSEN, T. E.; WARKENTINE, B. The toxicological response of the alga *Anabaena flos-aquae* (Cyanophyceae) to cadmium. **Arch. Environ. Contam. Toxicol.**, v. 13, p. 143-151, 1984.

REYNOLDS, C. S. **The ecology of freshwater phytoplankton**. Cambridge: Cambridge University Press, 1984. 384 p.

RIJSTENBIL, J. W.; GERRINGA, L. J. A. Interactions of algal ligands, metal complexation and availability, and cell responses of the diatom *Ditylum brightwellii* with a gradual increase in copper. **Aquat. Toxicol.**, v. 56, p. 115-131, 2002.

ROS, J. **Practica de Ecologia**. Barcelona: Ômega, 1979. 181 p.

SAAR, R. A.; WEBER, J. H. Fulvic acid: modifier of metal-ion chemistry. **Environ. Sci. Technol.**, v. 16, n. 9, p. 510A-517A, 1982.

SCATCHARD, G.; COLEMAN, J. S.; SHEN, A. L. Physical chemistry of protein solutions. VII. The binding of some small anions to serum albumin. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 79, p. 12-20, 1957.

SHARP, J. H. Excretion of organic matter by marine phytoplankton: Do healthy cells do it?. **Limnol. Oceanogr.**, v. 22, n. 3, p. 381-397, 1977.

SIGG, L.; STURM, M.; KISTLER, D. Vertical transport of heavy metals by settling particles in Lake Zurich. **Limnol. Oceanogr.**, v. 32, n. 1, p. 112-130, 1987.

SIGG, L. Regulation of trace elements in lakes: the role of sedimentation. In: BUFFLE, J.; DEVITRE, R. R (Ed.). **Chemical and biological regulation of aquatic systems**. Boca Raton: Lewis Publishers, 1993, p. 175-196.

SILVA, S. T. **Competição entre os processos de complexação e adsorção dos íons Cu^{2+} e Cd^{2+} no Rio Atibaia**. 1996. 62 p. Dissertação (Mestrado). Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1996.

SIMKISS, K. Metal ions in cells. **Endeavour**, v. 3, n. 1, p.2-6, 1979.

SPIJKERMAN, E.; COESEL, P. F. M. Ecophysiological characteristics of two planktonic desmid species originating from trophically different lakes. **Hydrobiologia**, v. 369/370, p. 109-116, 1998.

STOKES, P. M. Responses of freshwater algae to metals. **Progress in Phycological Research**, v. 2, p. 87-112, 1983.

STRAŠKRABA, M.; TUNDISI, J. G. **Diretrizes para o gerenciamento de lagos**: v. 9: Gerenciamento da qualidade da água de represas. São Carlos: International Institute of Ecology, 2000. 280 p.

SUNDA, W. G.; LEWIS, J. A. M. Effect of complexation by natural organic ligands on the toxicity of copper to a unicellular alga, *Monochrysis lutheri*. **Limnol. Oceanogr.**, v. 23, n. 5, p. 870-876, 1978.

SUNDA, W. G.; HUNTSMAN, S. A. Processes regulating cellular metal accumulation and physiological effects: phytoplankton as model systems. **Sci. Total Env.**, v. 219, p. 165-181, 1998.

TALLING, J. F.; DRIVER, D. Some problems in the estimation of chlorophyll-a in phytoplankton. Proc. In: **Conference of Productivity Measurements, Marine and Freshwaters**, 1961, University of Hawaii. Proceedings...1961, p. 142-146.

TOWN, R. M.; FILELLA, M. Dispelling the myths: is the existence of L1 and L2 ligands necessary to explain metal ion speciation in natural waters? **Limnol. Oceanogr.**, v. 45, n. 6, p. 1341-1357, 2000.

TWISS, M. R. The importance of chemical speciation: from the bulk solution to the cell surface. **J. Phycol.**, v. 32, p. 885-886, 1996.

TWISS, M. R.; ERRÉCALDE, O.; FORTIN, C.; CAMPBELL, P. G. C.; JUMARIE, C.; DENIZEAU, F.; BERKELAAR, E.; HALE, B.; VAN REES, K. Coupling the use of computer chemical speciation models and culture techniques in laboratory investigations of trace metal toxicity. **Chem. Spec. Bioavail.**, v. 13, n. 1, p. 9-24, 2001.

TWISS, M. R.; MOFFET, J. W. Comparison of copper speciation in coastal marine waters measured using analytical voltammetry and diffusion gradient in thin-film techniques. **Environ. Sci. Technol.**, v. 36, p. 1061-1068, 2002.

VAN DEN BERG, C. M. G.; WONG, P. T. S.; CHAU, Y. K. Measurement of complexing materials excreted from algae and their ability to ameliorate copper toxicity. **J. Fish. Res. Board Can.**, v. 36, p. 901-905, 1979.

VAN DEN HOEK, C.; MANN, D. G.; JAHNS, H M. **Algae**: an introduction to phycology. Cambridge: Cambridge University Press, 1995. 627 p.

VIEIRA, A. A. H. Excretion of dissolved organic matter (DOM) in the photic column by marine phytoplanktonic population from Ubatuba region. **Rev. Microbiol.**, v. 13, n. 1, p. 83-94, 1982.

VIEIRA, A. A. H.; TEIXEIRA, C. Excreção de matéria orgânica dissolvida por populações fitoplanctônicas marinhas em bioensaios com nutrientes. **Bolm. Inst. Oceanogr.**, v. 31, n. 1, p. 33-38, 1982.

VIEIRA, A. A. H. Purification of phytoplankton cultures with dakin's solution. **Rev. Microbiol.**, v. 14, n. 3, p. 202-203, 1983.

VIEIRA, A. A. H.; MYKLESTAD, S. Production of extracellular carbohydrate in cultures of *Ankistrodesmus densus* Kors. (Chlorophyceae). **J. Plankton Res.**, v. 8, n. 5, p. 985-994, 1986.

VIEIRA, A. A. H.; PAULSEN, B. S. Studies on the composition of extracellular polysaccharide produced by *Hyaloteca dissiliens* (Desmidiaceae). **Biologia, Bratislava**, 49(4): 535-8. 1994.

VIEIRA, A. A. H.; NASCIMENTO, O. R.; SARTORI, A. L. Release of extracellular polysaccharide by *Spondylosium panduriforme* (Desmidiaceae). **Rev. Microbiol.**, v. 25, n. 1, p. 6-10, 1994.

XUE, H.; SIGG, L. Free cupric ion concentration and Cu(II) speciation in a eutrophic lake. **Limnol. Oceanogr.**, v. 38, n. 6, p. 1200-1213, 1993.

WALSBY, A. E.; REYNOLDS, C. S. Sinking and floating. In: WALSBY, A. E.; REYNOLDS, C. S. (Ed). **Studies in Ecology**. p. 371-412, 1980.

WETZEL, R. G. **Limnology**. Philadelphia: W. B. Saunders, 1975. 743 p.

WICKS, R. J.; MORAN, M. A.; PITTMAN, L. J.; HODSON, R. E. Carbohydrate signatures of aquatic macrophytes and their dissolved degradation products as determined by a sensitive high-performance ion chromatography method. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 57, n. 11, p. 3135-3143, 1991.

WOOD, A. M.; VAN VALEN, L. M. Paradox lost? On the release of energy-rich compounds by phytoplankton. **Marine Microbial Food Webs**, v. 4, n. 1, p. 103-116, 1990.

ZHANG, H.; DAVIDSON, W. In situ speciation measurements. Using diffusive gradients in thin films (DGT) to determine inorganically and organically complexed metals. **Pure Appl. Chem.**, v. 73, n. 1, p. 9-15, 2001.