

I-356 - MÉTODO ALTERNATIVO PARA CONTAGEM DE ALGAS UTILIZADAS COMO ALIMENTO EM ENSAIOS DE ECOTOXICIDADE

Cristina Filomena Pereira Rosa Paschoalato⁽¹⁾

Engenheira Química, Mestre e Doutora em Hidráulica e Saneamento pela Escola de Engenharia de São Carlos (EESC-USP). Docente e pesquisadora da Universidade da Associação de Ensino de Ribeirão Preto (UNAERP) Ribeirão Preto-SP.

Bruno Moreira da Silva⁽²⁾

Aluno de Iniciação Científica do Curso de Engenharia Química da UNAERP

Maira Batista de Souza⁽³⁾

Mestranda, Tecnologia Ambiental Universidade da Associação de Ensino de Ribeirão Preto (UNAERP) Ribeirão Preto-SP.

Talita Rafaella da Silva Boldrin⁽⁴⁾

Aluna de Iniciação Científica do Curso de Engenharia Química da UNAERP

Renan Henrique Rocha⁽⁵⁾

Aluno de Iniciação Científica do Curso de Engenharia Química da UNAERP

Endereço⁽¹⁾: Rua do Professor, 536 apto. 123 Jd. São Luis Ribeirão Preto-SP CEP: 14020-280 - Tel.: (16) 3603 6718 - E-mail: cpaschoa@unaerp ou lrh@unaerp.br

RESUMO

Na busca pela produtividade agrícola faz-se necessário a aplicação de produtos e insumos, tais como fertilizantes e pesticidas. A Resolução nº 357 do CONAMA (BRASIL, 2005), que estabelece padrões de qualidade para corpos d'água, não menciona alguns compostos que são amplamente utilizados na agricultura, porém recomenda que possíveis substâncias causadoras de danos aos seres vivos devem ser investigadas e os critérios de toxicidade devem ser baseados em resultados de testes ecotoxicológicos com organismos aquáticos sensíveis. Neste sentido, destaca-se a importância da realização de ensaios de toxicidade em organismos do meio aquático de alta sensibilidade e a necessidade da utilização de algas como alimento para o cultivo dos organismos testes, sendo o cultivo das algas é etapa de fundamental importância para o sucesso dos ensaios. Este trabalho teve como objetivo apresentar a validação de uma metodologia alternativa à câmara de Neubauer para contagem de algas. A técnica empregada foi por espectrofotometria no comprimento de onda de 685 nm, uma curva de calibração foi elaborada para diferentes concentrações de algas e os resultados obtidos foram satisfatórios.

PALAVRAS-CHAVE: Água, algas, ecotoxicidade, validação, espectrofotometria.

OBJETIVO

Validar uma metodologia alternativa para contagem de algas a ser empregada como alimento no cultivo de organismos testes *Ceriodaphnias dubias* na realização de ensaios de ecotoxicidade aguda.

MATERIAIS E MÉTODOS

O procedimento de cultivo das *Ceriodaphnias dubias* para utilização em ensaios de ecotoxicidade foi baseado nas recomendações da NBR 12713 ABNT (2004) e NBR 13.373 ABNT (2005). Na preparação da água de cultivo e da água de diluição foram controlados os valores de pH variando de 7,0 à 7,6 e dureza variando de 40 à 48 mg CaCO₃/L sendo conferidos semanalmente, mantida na temperatura entre 23 à 27° C.

No preparo do cultivo das algas verdes *Pseudokirchneriella subcapitata*, Figura 1, foi utilizado um meio de cultura algácea (Chu, 1942) e água destilada. Na tabela 1 estão apresentados os compostos utilizados no preparo do meio CHU que foram dissolvidos e diluídos a 1000 mL com água processada.



Figura 1 - Cultura de algas *Pseudokirchneriella subcapitata* mantidas em meio de cultura algácea, meio CHU e água destilada, em temperatura de 23°C.

TABELA 1 – Reagentes, fórmula química e quantidades necessárias para o preparo do meio de cultura CHU

Reagentes	Fórmula	Quantidades (mg)
Nitrato de cálcio tetra hidratado	$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	4.300
Bifostato de potássio	K_2HPO_4	500
Sulfato de magnésio hepta-hidratado	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	7.500
Cloreto de potássio	KCl	500
Carbonato de Sódio	Na_2CO_3	2.000
Cloreto férrico hexa hidratado	$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	50

Fonte: CHU (1942).

Na manipulação para o preparo do meio de cultivo das algas foi adicionado 30 mL de meio CHU para 1,5 L de água destilada, em seguida a mistura foi esterilizada em autoclave em temperatura de 120° C em 1 atm por 20 minutos, após resfriamento foram adicionadas iscas de culturas de algas cedidas por uma Universidade.

No fornecimento do alimento à base de algas verdes utilizou-se diariamente aproximadamente de 1 a 5 x 10⁵ células por organismo (ABNT NBR 13.373, 2005). Para a obtenção de células viáveis, o frasco contendo a cultura de algas foi mantido entre 20 e 25°C, com iluminação e aeração constantes. Após atingirem o crescimento adequado, em aproximadamente 7 dias, foram centrifugadas e descartado o excesso do meio de cultura algácea e aproveitado apenas as algas ressuspendidas.

A cultura de algas *Pseudokirchneriella subcapitata* foi centrifugada, a fim de obter maior concentração de algas e posteriormente a contagem foi realizada em câmara de Neubauer, Figura 2.

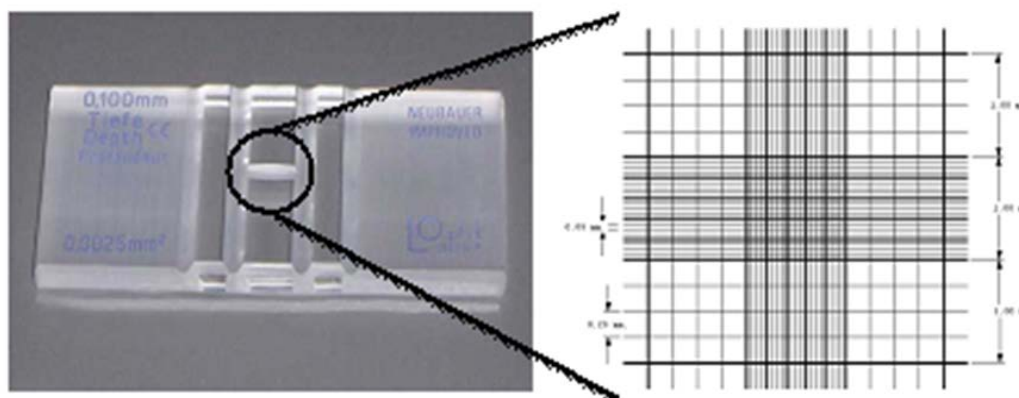


Figura 2 - Câmara de Neubauer utilizada para contagem de algas.

Um método alternativo por espectrofotometria foi empregado com o objetivo de otimizar o processo de contagem de algas em Câmara de Neubauer. Um espectro de varredura na região de UV-visível, em cubeta de quartzo de 1 cm de caminho óptico, foi realizado para identificação do comprimento de onda com máxima absorção possibilitando a correlação ideal entre absorvância e o número de células. Esse comprimento de onda foi utilizado posteriormente na construção de uma curva de calibração com diferentes concentrações de algas em função da absorvância.

A validação do método alternativo de espectrofotometria foi baseada nas recomendações do INMETRO (2007), ANVISA (2003) e Lanças (2004), foram avaliados a repetibilidade, linearidade, precisão e exatidão.

A repetibilidade expressa a fidelidade obtida nas mesmas condições operacionais. Segundo Lança (2004), uma repetibilidade tem sido considerada aceitável com variação de até 1% e foi determinada com a análise de uma mesma solução e calculada através da equação 1.

$$r = t \times \sqrt{2} \times s_r \quad (1)$$

Onde: r é a repetibilidade, t é o valor obtido da tabela de *Student*, sr é o desvio padrão da repetibilidade.

A linearidade foi determinada através de uma curva analítica de concentrações crescentes de algas diluídas em água. Os resultados foram plotados considerando a concentração de algas (células/mL) em relação à absorvância seguido de um tratamento estatístico de regressão linear para a obtenção do coeficiente de correlação R². A recomendação satisfatória de linearidade é a obtenção de R² maior que 0,99 (ANVISA, 2003).

A precisão, representada pelo desvio padrão relativo, é a expressão da concordância entre vários resultados analíticos, obtidos para uma mesma amostra e foi empregada a mesma condição de repetibilidade considerando: mesmo método; mesma amostra; mesmo laboratório; mesmo operador; mesmo equipamento e em um curto intervalo de tempo. A precisão foi calculada seguindo a equação 2 (ANVISA, 2003).

$$DPR = \frac{DP}{CMD} \times 100 \quad (2)$$

Onde: desvio padrão relativo (DPR); desvio padrão (DP) e concentração média determinada (CMD).

A exatidão expressa a concordância entre o valor encontrado e o valor aceito como verdadeiro ou aceito como referência. Aparece sempre associado a valores de precisão e foi determinada através da equação 3 (ANVISA, 2003).

$$EXATIDÃO = \frac{CMD}{CONCENTRAÇÃO TEÓRICA} \times 100 \quad (3)$$

RESULTADOS PRELIMINARES E DISCUSSÕES

Através da realização de um espectro (varredura) entre os comprimentos de onda de 200 a 800 nm, determinou-se o valor do comprimento de onda de máxima absorção de 685 nm, considerando a coloração esverdeada da solução, conforme mostra a Figura 3.

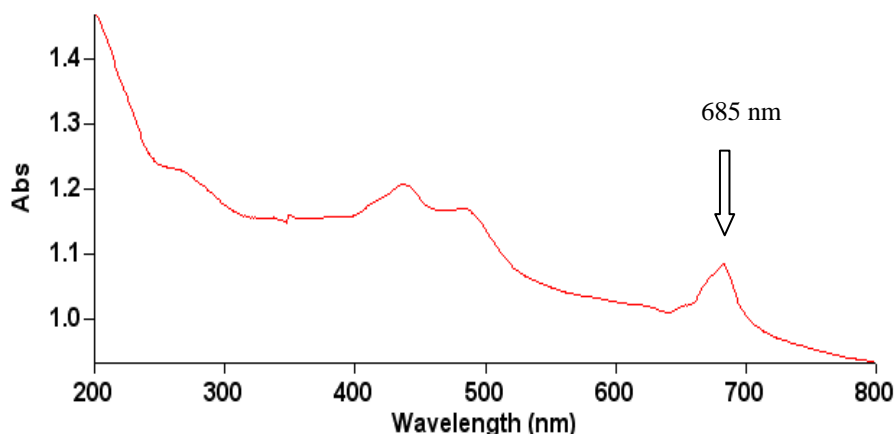


Figura 3 - Espectro de varredura como método alternativo para a contagem de algas.

Este comprimento de onda foi utilizado na construção da curva de calibração do método espectrofotométrico. Partindo-se de uma concentração de algas de $2,05 \times 10^7$ células/mL, previamente determinada na câmara de Neubauer, foram feitas diluições de concentrações decrescentes para a construção da curva de calibração de absorbância em função do número de células por mL. A Tabela 2 demonstra a curva de calibração feita no espectrofotômetro.

TABELA 2 - Concentrações e absorbância para curva de calibração.

Ponto	Concentração (Cel/mL)	Absorbância (nm)
1	5,80E+03	0,0033
2	2,90E+04	0,0033
3	5,80E+04	0,0056
4	2,90E+05	0,0208
5	5,80E+05	0,0410
6	2,90E+06	0,1937
7	5,80E+06	0,3865
8	8,70E+06	0,5630
9	1,16E+07	0,7378
10	1,45E+07	0,9088

O coeficiente de correlação obtido foi de 0,9995, indicando que o método apresentou uma linearidade satisfatória, conforme a Figura 4, permitindo a quantificação do número de células por mililitro de maneira rápida e confiável. De acordo com ANVISA, (2003) o critério mínimo aceitável do coeficiente de correlação (r) deve ser de superior a 0,99.

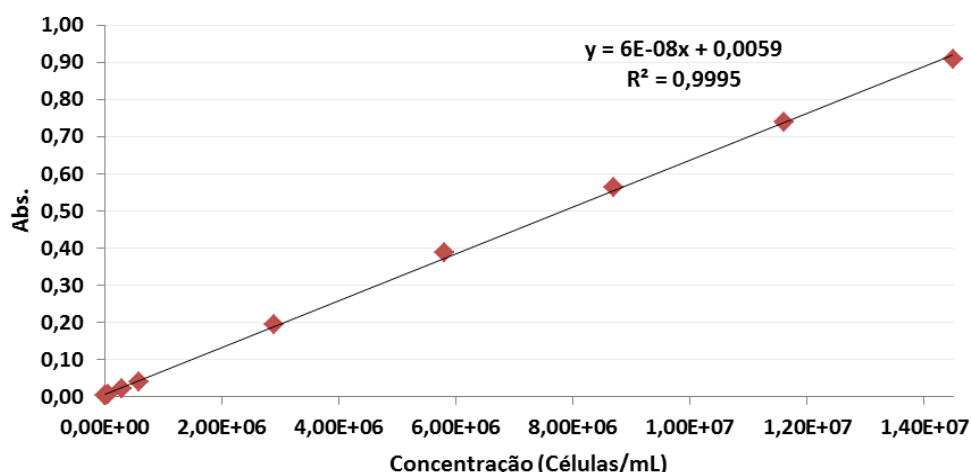


Figura 4 - Curva de Calibração do método alternativo de contagem de algas para a alimentação dos organismos-testes.

Os valores obtidos de repetibilidade (r) variaram entre 0,0023 e 0,0073%, estando de acordo com o valor aceitável citado na literatura que é menor que 1%. Os valores de precisão, expressos pelo desvio padrão relativo (DPR) ficaram entre 1,10 e 4,49%. Já para a exatidão, os resultados ficaram entre 83,61 e 112,23%. O método apresentou boa precisão e exatidão, visto que a literatura recomenda o valor do DPR menor que 15%, o valor da exatidão foi de 80 a 120%, mostrando a confiabilidade do método. Os resultados de precisão, exatidão e repetibilidade estão representados na Tabela 2 e Tabela 3.

TABELA 3 - Resultados da Precisão e Exatidão para validação da metodologia de contagem de algas.

Concentração Teórica (Cel/mL)	Concentração Determinada (Cel/mL)							Média	DP	Precisão	Exatidão
										DPR	(%)
3,53E+05	3,03E+05	2,99E+05	3,15E+05	2,89E+05	2,84E+05	2,79E+05	2,95E+05	1,32E+04	4,49		83,61
7,05E+05	7,70E+05	8,04E+05	8,00E+05	8,02E+05	7,95E+05	7,80E+05	7,92E+05	1,38E+04	1,74		112,23
3,53E+06	3,75E+06	3,66E+06	3,65E+06	3,64E+06	3,66E+06	3,68E+06	3,67E+06	4,06E+04	1,10		104,15

TABELA 4 - Resultados da repetibilidade para a validação da metodologia de contagem de algas.

Concentração		Absorbância					Média	DP	Repetibilidade
(Cel/mL)							(n=6)		r (%)
3,53E+05	0,0250	0,0248	0,0257	0,0241	0,0238	0,0235	0,0245	0,0008	0,0023
7,05E+05	0,0544	0,0566	0,0564	0,0564	0,0560	0,0551	0,0558	0,0009	0,0025
3,53E+06	0,2426	0,2370	0,2360	0,2355	0,2367	0,2380	0,2376	0,0026	0,0073

CONCLUSÃO

A metodologia alternativa para quantificação da concentração de algas em água atendeu aos requisitos de validação.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION (APHA); AMERICAN WATER WORKS ASSOCIATION (AWWA); WATER ENVIRONMENT FEDERATION (WPCF). *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*. 21th Washington, D.C, 2005.
2. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução nº 899, de 29/05/2003: Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos, Ministério da Saúde: Brasil 2003.
3. ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS (ABNT) NBR 12713. Ecotoxicologia aquática –Toxicidade aguda - Método de ensaio com *Daphniaspp* (Cladocera, Crustacea). Norma ABNT- NBR 12713, 21p. 2004.
4. ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS (ABNT) Normas Brasileiras Reguladoras NBR 13373. Ecotoxicologia Aquática - Toxicidade crônica - Método de Ensaio com *Ceriodaphnia spp.* (Cladocera, Crustacea). 15 p. 2005.
5. CHU, S. P. 1942. *The influence of the miceral composition of the medium on the growth of planktonic algae L- methods and culture media*. Journal of Ecology, n 30, p.284-325.
6. Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO); 2007. Orientação Sobre Validação de Métodos de Ensaios Químicos, DOQ-CGCRE-008. Revisão 02.
7. LANÇAS, F.M.; 2004. Validação de Métodos Cromatográficos de Análise, Editora RiMa. São Carlos SP.