

CAPÍTULO 27

KIT CLOROFILA – UMA PROPOSTA DE MÉTODO DE BAIXO CUSTO NA ESTIMATIVA DO ÍNDICE DE ESTADO TRÓFICO COM BASE NOS TEORES DE CLOROFILA

Marcelo Pompêo¹, Paula Yuri Nishimura¹, Sheila Cardoso-Silva² & Viviane Moschini-Carlos²

1 - Departamento de Ecologia, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil. 2 - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Campus de Sorocaba, Sorocaba, Brasil.
E-mail: mpompeo@ib.usp.br

RESUMO

Neste capítulo são apresentados procedimentos que mostram a viabilidade na construção de uma escala de cores, visando estimar o Índice do Estado Trófico (IET). A escala de cores está baseada nos pigmentos clorofilianos do fitoplâncton de águas interiores, em particular a concentração de clorofila *a*, e permitirá acompanhar a evolução histórica do IET. Os procedimentos e materiais sugeridos para compor o “kit clorofila”, conferem baixíssimo custo para a construção e facilidade na aplicação do kit, sem a tradicional filtração (em filtros de fibra de vidro de 0,4 a 0,7 µm de porosidade) e a respectiva determinação dos teores do extrato de clorofila mediante a leitura de absorbâncias em espectrofotômetro. Ao mesmo tempo, também são apresentadas sugestões de materiais e procedimentos para viabilizar o “kit clorofila” e conferir qualidade à estimativa do IET.

1 INTRODUÇÃO

A eutrofização pode ser considerada um dos mais graves problemas associado à redução da qualidade das águas superficiais brasileiras. A falta de ações e medidas concretas no curto prazo para conter e reduzir o processo de eutrofização, normalmente decorrente do lançamento de esgoto não tratado, contribuirá para o agravamento da deterioração da qualidade das águas, em particular na região metropolitana das grandes cidades brasileiras (POMPÊO et al., 2005; POMPÊO; MOSCHINI-CARLOS, 2012).

O fitoplâncton é importante constituinte dos ecossistemas aquáticos. Estes organismos convertem material inorgânico em matéria orgânica através da fotossíntese; oxigenam a água, também através da fotossíntese; constituem a base essencial da cadeia alimentar; e interferem na quantidade da luz que penetra na coluna de água. Como todos os organismos fotossintetizantes, o fitoplâncton necessita de luz e uma fonte de nutrientes inorgânicos para crescer e se reproduzir. Destes fatores, normalmente é o fornecimento de nutrientes (especialmente o fósforo) que vai ditar o crescimento da população algal (EPA, sem data).

A clorofila *a* é o pigmento fotossintético presente em todos os organismos fitoplanctônicos sejam eucarióticos (algas) ou procarióticos (cianobactérias) e é utilizado como parâmetro de biomassa algal, tanto experimentalmente quanto nas caracterizações de ambientes aquáticos e monitoramento da qualidade de água (KURODA et al., 2005). Desta forma, é premissa básica a determinação dos teores dos pigmentos clorofilianos, principalmente da clorofila *a*, quando o objetivo é avaliar a qualidade da água (WETZEL; LIKENS, 1991), em particular decorrente do processo de eutrofização (CARLSON, 1977; TOLEDO et al., 1983; SALAS; MARTINO, 1990; LAMPARELLI, 2004).

Há inúmeros métodos utilizados para quantificar os teores de clorofila *a*. Entre os métodos mais comumente empregados podemos citar a medida da intensidade da fluorescência, que é correlacionada com a concentração de clorofila *a*, determinada de modo direto, sem maceração (MATORIN et al., 2004) ou após extração em solvente (CAMACHO; SOUZA-CONCEIÇÃO, 2007). Há também o emprego de HPLC – High-Performance Liquid Chromatography (EIJCKELHOFF; DEKKER, 1997; FUNDEL et al., 1998; PROENÇA, 2002). Ambos são equipamentos relativamente sofisticados, caros e requerem pessoal especializado para o seu manuseio, quando comparado com os procedimentos espectrofotométricos tradicionais.

Os métodos de laboratório mais tradicionais empregados na determinação do teor de clorofila requerem a extração dos pigmentos com solventes orgânicos, como metanol, etanol ou acetona, seguido da leitura das absorvâncias em espectrofotômetros (LORENZEN, 1967; NUSCH, 1980; SARTORY; GROBBELAAR, 1984; WETZEL; LIKENS, 1991; SALONEN; SARVALA, 1995, KURODA et al., 2005). Além disso, empregam filtros de fibra de vidro de alta qualidade e porosidade definida, como Whatman GF/C ou GF/F, Millipore AP40 ou mesmo Sartorius SM 13 400 (MARKER et al., 1980; SARTORY; GROBBELAAR, 1984; EPA, 1997; DOS SANTOS et al., 2003; SALDANHA-CORRÊA et al., 2004; KURODA et al., 2005).

Com o levantamento dos valores dos teores de clorofila e da concentração de fósforo total na água é possível calcular o Índice do Estado Trófico (IET), como apresentado em Carlson (1977), Toledo et al. (1983), Salas; Martino (1990) ou Lamparelli (2004), e inferir o nível de contribuição orgânica antrópica. Assim, é possível acompanhar a evolução histórica do processo de eutrofização, baseado no IET, contribuindo em propostas de monitoramento, manejo e gestão da qualidade das águas.

O custo de uma caixa com 100 filtros de fibra de vidro com 47 mm de diâmetro varia de R\$ 200,00 a R\$ 500,00, no Brasil. Relativo ao espectrofotômetro, para trabalhar nos comprimentos de onda apropriados (entre 350 a 1000 nm), o custo do aparelho é de no mínimo R\$ 3.000,00, e mesmo assim, com largura de banda de 4 nm ou superior. Já aparelhos de melhor qualidade, mesmo sem duplo feixe, não saem por menos de R\$ 10.000,00. Portanto, mesmo este consolidado e tradicional procedimento empregado na quantificação dos teores de clorofila representa substancial custo de instalação e operação, inacessível à grande parte das entidades ambientalistas que poderiam

empregá-lo como rotina na avaliação da qualidade da água. Com base nessa realidade financeira o mais conveniente para as entidades ambientalistas seria empregar métodos de baixo custo.

Em *Rede independente de monitoramento da qualidade da água de reservatórios eutrofizados: uma proposta*, apresentado no Capítulo 26 deste livro, os autores ressaltam a importância do monitoramento, particularmente independente das esferas de governo e das empresas ligadas aos setores de fiscalização e de saneamento. Discorrem algumas premissas visando à constituição de kits de baixo custo para o monitoramento da qualidade da água, associado à contribuição antrópica orgânica. Os autores apresentam diversas configurações de kits e nos kits *MoniQuali.4* e *MoniQuali.5* colocam a determinação dos teores de clorofila como importante item na avaliação da qualidade da água, no entanto, para clorofila, não apresentam instruções sobre como fazê-lo de forma eficiente pelo emprego de procedimentos de baixo custo. Assim, baseado na importância da determinação da avaliação dos teores de clorofila para se discutir a qualidade da água, neste capítulo serão apresentados os procedimentos que permitirão construir um kit de baixo custo para a avaliação do IET das águas interiores.

2 PROCEDIMENTOS PARA A CONSTRUÇÃO DO KIT

2.1 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE CLOROFILA

Como primeira etapa do trabalho de construção do kit, amostra de água da represa Guarapiranga (São Paulo, Estado de São Paulo, Brasil), coletada em fevereiro de 2007 e enriquecida com soluções de KH_3PO_4 e KNO_3 , foi mantida aerada em laboratório em temperatura e luz ambiente para crescimento do fitoplâncton. Numa segunda etapa, em março de 2007, esse meio de cultura enriquecido foi filtrado (funil de Büchner) a vácuo em kitasato sob discos de algodão (Johnson's, de 70 unidades e 35 g) (Figura 1). Após a filtração, o filtro de algodão foi mantido em baixa intensidade luminosa sob toalhas de papel para remoção da maior quantidade de água possível (Figura 2a). Em terceira etapa, o pigmento retido no filtro foi extraído com etanol 90% a quente e a frio, com choque térmico (NUSH, 1980), como complementação, o filtro foi macerado (almofariz e pistilo) para maior remoção do pigmento (Figura 3) aderido ao filtro de algodão. Dessa solução mãe (SM) assim gerada, em quarta etapa, foram tomadas dezessete alíquotas (AL) crescentes (de 0,1, 0,2, 0,3, 0,4 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1,0, 1,5, 2,0, 2,5, 3,0, 4,0, 5,0 e 10,0 ml) e adicionadas em tubo de ensaio tipo falcon com o volume final aferido a 10 ml com adição de etanol 90%. Estes tubos falcon com AL aferidas a 10 ml serão denominadas F10. Desta forma, com os dezessete tubos F10 foram gerados tubos com concentrações crescentes de clorofila. Na Figura 4a são apresentados unicamente cinco tubos F10. Em quinta etapa, no mesmo dia, a absorbância dos dezessete tubos F10 foi lida em espectrofotômetro Micronal B572, em cubeta de 10 mm de passo óptico, a 663 e 750 nm antes e após acidificação com HCl 0,1 N. Em sexta etapa, com as absorbâncias levantadas, para cada tubo F10, foi calculado o teor de clorofila *a* (em $\mu\text{g/l}$), segundo Lorenzen (1967). Em sétima etapa, calculou-se o IET, através da equação e critérios propostos por Lambarelli (2004), como executado pela CETESB - Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental, da Secretaria do Meio Ambiente do Governo do Estado de São Paulo, para o cálculo do IET das águas interiores paulistas.

2.2 PREPARAÇÃO DA ESCALA DE CORES

Com os dados obtidos seguindo os procedimentos apresentados no item anterior, seguiu-se a criação da escala de cores para a inferência do estado trófico. Para tanto, de F10 foram tomadas alíquotas de 5 ml e adicionados em cubeta plástica de 35 mm de altura e 20 mm de diâmetro interno (Figura 4b). Posteriormente essa cubeta foi fotografada por cima, com emprego de tripé, em luz ambiente a uma altura de 22 cm da borda superior da cubeta, (máquina fotográfica digital Sony H5, em modo automático com temporizador a 2 s, 50 f2.8 e 7 mega pixel, sem aplicação de flash) (Figura 4c). Após, as fotografias foram trabalhadas em programa Photoshop 7.0.1, sem aplicação de

tratamento, e de cada foto foi retirada uma porção circular de 35 cm de diâmetro contendo toda respectiva cubeta (Figura 4d). Essa porção foi salva em novo arquivo (jpeg, com qualidade máxima, 56,6 kbps, 300 pixel/cm, cores RGB). Esse novo arquivo foi posteriormente trabalhado, seguindo os procedimentos já descritos, e retirada outra porção circular representando o interior da cubeta plástica, com o solvente e o pigmento, respeitando o limite da borda interna do fundo da cubeta (Figura 4d). Deste modo, para as concentrações crescentes das alíquotas (tubos F10), foram calculadas as concentrações de clorofila (em $\mu\text{g/l}$) e seu respectivo IET (segundo Lamparelli, 2005). Além disso, através das fotografias das cubetas plásticas com solvente e pigmento, para cada tubo F10 foram obtidos em arquivos discos coloridos com crescentes tons de verde.

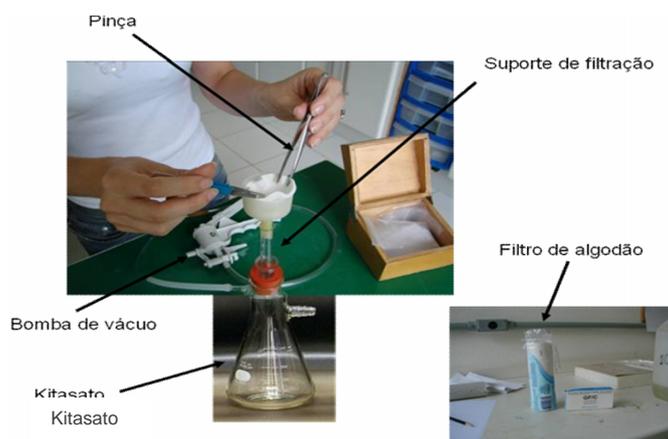


Figura 1: Filtração da solução mãe visando a preparação de alíquotas de diferentes concentrações de clorofila.

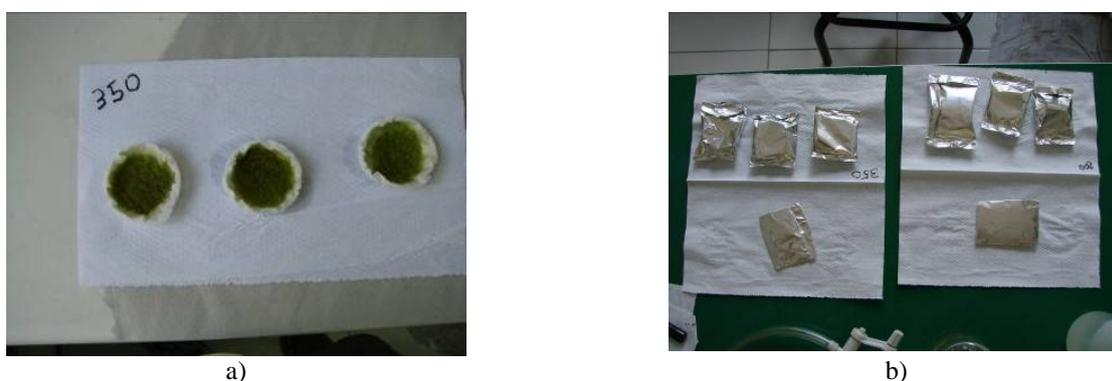


Figura 2: Filtros de algodão com material filtrado (a) e filtros acondicionados em envelopes de lâminas de alumínio.

Para preparar a cartela com a escala de cores de trabalho, com base no valor do IET e nos critérios de classes apresentados por Lamparelli (2004), da tabela gerada nos procedimentos descritos acima, os valores do IET foram contrastados com o limite superior de cada classe de trofia e a cor representativa do limite superior foi selecionada para compor a cartela com a escala de cores (Figura 5). Desta forma, foi construída uma cartela com cinco cores, representando os níveis superiores de trofia ultraoligotrófico, oligotrófico, mesotrófico, eutrófico e supereutrófico, estabelecidos por Lamparelli (2004). A cor de intensidade acima de supereutrófico, que indica ambiente hipereutrófico, não é necessária, pois neste caso a cor relativa ao supereutrófico já representa o limite superior dessa classe, e cor de intensidade acima disso é o hipereutrófico.

Portanto, é possível inferir o IET de dada massa d'água através de procedimento de baixo custo. Basta coletar amostras de água bruta (1 L), filtrá-las em discos de algodão, extrair a clorofila com solvente orgânico e aferir o filtrado a 10 ml. Posteriormente basta contrastar uma porção padrão dessa solução a uma cartela de cores gerada anteriormente, representando os IETs.

a)

b)

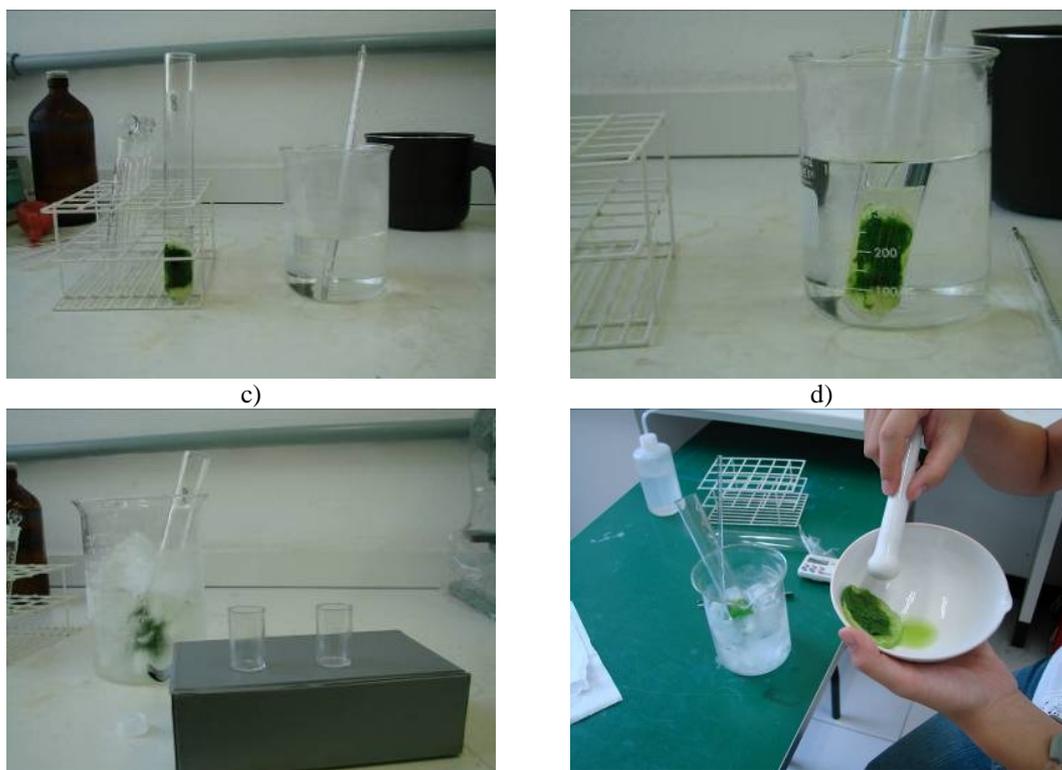


Figura 3: Extração com etanol a quente, com choque térmico, na determinação do teor de clorofila. a) e b) banho quente, sem maceração, com controle de temperatura, nunca superior a 65°C e c) posterior ao banho quente imediatamente imerso em banho de gelo, para choque térmico, e em primeiro plano as cubetas plásticas, d) após banho de gelo para maceração, para remover maior quantidade de pigmentos retidos no filtro de algodão.

3 A CONSTITUIÇÃO DO KIT: SUGESTÕES DE MATERIAIS E PROCEDIMENTOS

3.1 SOLVENTE ORGÂNICO: ETANOL, METANOL OU ACETONA?

Para facilitar a divulgação do “kit clorofila” e sua distribuição pelo país, é conveniente que de fato seja de baixo custo, empregue produtos facilmente encontrados, mesmo no longínquo interior brasileiro, que conferem maior praticidade e autonomia aos grupos interessados na sua utilização. Assim, baseado nessas premissas iniciais, como solvente para extração da clorofila, seria mais adequado empregar álcool, popularmente conhecido como álcool de farmácia, ou o álcool etílico hidratado, com 92° INPM, de uso doméstico. Acetona e metanol são produtos de comercialização restritos e adquiridos somente em firmas especializadas e mediante liberação por autoridades competentes, o que confere grande dificuldade para sua aquisição e reposição. Além disso, o álcool etílico hidratado, com 92° INPM apresenta menor potencial de periculosidade ambiental e ao próprio operador. Desta forma, recomenda-se fortemente o uso do álcool etílico hidratado como solvente para a extração do pigmento, em detrimento da acetona e do metanol.

3.2 ALGUNS MATERIAIS E PROCEDIMENTOS EM TRABALHOS DE CAMPO E LABORATÓRIO

Abaixo são apresentados sugestões de materiais para compor o kit, de maneira geral, na tentativa de reduzir seu custo de preparação e para facilitar a reposição dos consumíveis utilizados. Também são apresentados sugestões de procedimentos para serem adotados nos trabalhos de campo e laboratório. Outras considerações são apresentadas no corpo do manuscrito. Nas Figuras 1 a 4 são observados vários dos materiais sugeridos e apresentados os procedimentos empregados no processo de filtração e de construção da escala de cores do IET:

a)

b)

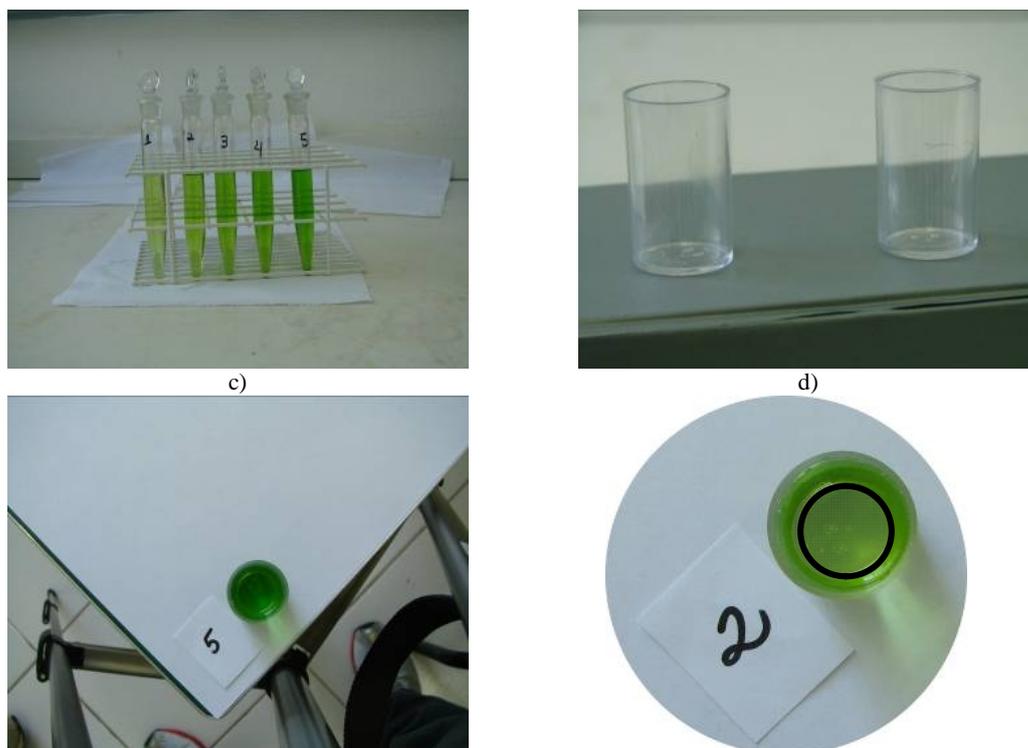


Figura 4: Tubos com diferentes concentrações de clorofila (a), cubetas plásticas (b) empregadas na leitura da cor por fotografia (c) e a primeira porção retirada do arquivo fotográfico (d). Em (d) o aro negro representa a segunda porção interna da cubeta retirada para a efetiva construção da escala de cores.

- A escolha dos pontos de monitoramento da qualidade da água deve seguir inúmeros critérios, não aprofundado neste manuscrito, mas alguns ressaltados a seguir: permitir atingir os principais objetivos previamente definidos, ter facilidade de acesso, ser representativo da massa de água e ter importância principalmente na avaliação dos dados em série histórica. Quanto à periodicidade de amostragem, na medida do possível, deverá ser mensal e amostrado sempre os mesmos locais e seguindo a mesma metodologia.

- Ter sempre em mãos um GPS (Global Positioning System), para corretamente anotar a localização das estações de coleta.

- Na medida do possível, sempre contar com máquina fotográfica para manter registro fotográfico de todos os aspectos considerados importantes da cada estação de coleta.

- Para tomada de amostras de água em situação de campo empregar galão de cinco litros por estação de coleta (alternativamente também poderá empregar garrafas PET de três litros). Antes de cada coleta lavar seu interior com 100 ml de uma solução de água sanitária (5 partes de água de torneira x uma parte de água sanitária - encontrada no setor de higiene pessoal e limpeza dos supermercados) e enxaguá-lo dez vezes com abundante água de torneira. Já em campo, enxaguá-lo com água do local de coleta, antes da tomada da amostra definitiva. Evitar águas sanitárias com adição de desinfetantes e odorizadores.;

- Após a coleta, manter o galão com a amostra de água protegidas da luz e calor intensos. Para tanto empregar bolsas térmicas ou caixas de isopor, o que for mais conveniente, e em cada bolsa térmica adicionar ao menos duas garrafas PET de 600 ml com água congelada. Esta medida é de extrema importância para evitar ao máximo a degradação da clorofila.

- Caso a profundidade do local de coleta não permita o uso direto do galão, empregar o fundo de meia garrafa de refrigerante (2 litros), abundantemente enxaguada com água do local de coleta.

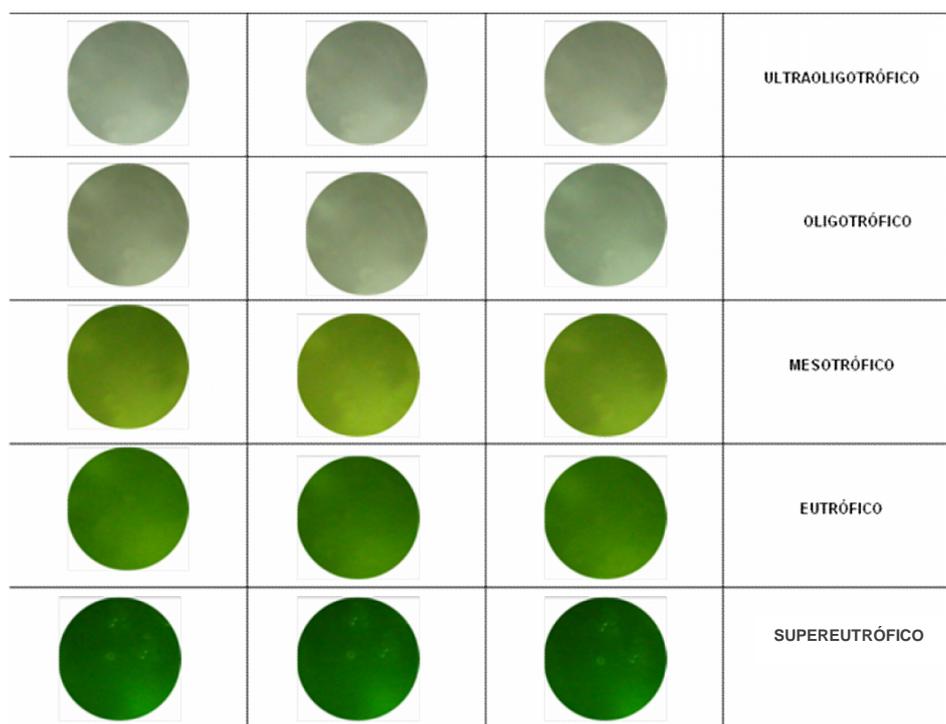


Figura 5: Cartela de cor com tréplica da escala de cores de trabalho para cada classe do IET, construída seguindo os procedimentos descritos no texto. Cada cor representa o limite superior de sua respectiva classe do IET, baseado em Lamparelli (2004).

- Pinça para manipulação dos filtros (Figura 1);
- Filtros: discos de algodão, empregados para limpeza facial, como sugestão, podem ser utilizados o Johnson's de 70 unidades e 35 g (Figura 1).
- Funil de Büchner de 45 mm de diâmetro: por exemplo, em poliprolineno e desmontável para facilitar a limpeza, marca Brand, empregado como meio de suporte aos filtros de algodão (Figura 1). Na montagem do filtro no funil, manter uma borda alta e ao filtrar cuidado para a água não escapar pela lateral do filtro contra o funil, para tanto, adicionar lentamente a água a filtrar (Figs. 1 e 2a). Alternativamente poderá ser utilizado funil cônico, mais facilmente encontrado e na montagem do filtro e durante a filtração, tomar os mesmos cuidados relativos ao funil Büchner.
- Kitasato de 1 litro (Figura 1): frasco de filtração com saída lateral, preferencialmente de plástico, empregado para receber a água filtrada. No momento da filtração nele será acomodada uma rolha vazada com o funil introduzido bem vedado na abertura da rolha.
- Bobina de papel alumínio, encontrada em supermercados, para preservar os filtros de algodão utilizados (Figura 2b).
- Proveta de 1 litro, empregada na tomada de amostra para a filtração. Alternativamente poderá utilizar garrafa PET com seu volume tarado em balança (considerar que 1 quilo de água em temperatura ambiente, descontando o peso da garrafa, equivale a 1 litro) e com uma caneta, para marcação permanente, anotar no corpo do frasco o nível máximo da garrafa a ser preenchido.
- Como procedimento para gerar vácuo, visando acelerar a filtração, pode ser empregado bomba a vácuo manual (Nalgene, por exemplo) (Figura 1), ou mesmo seringas de injeção, fáceis de adquirir em farmácias por todo Brasil, para tanto basta conectar uma pequena mangueira ligando a saída lateral do kitasato à seringa.
- Todo processo de filtração deverá ocorrer o mais brevemente, preferencialmente no mesmo dia da coleta. Caso a filtração ocorra somente no dia seguinte, manter todos os frascos de coleta sob

baixa intensidade luminosa e temperatura, no interior de uma geladeira, mas este procedimento deve ser adotado unicamente em caso extremo e nunca como rotina.

- O volume empregado no processo de filtração deverá ser compatível com o volume empregado na construção da escala de cores, do mesmo modo, que todos os demais volumes empregados na sequência da análise. No processo de filtração preferencialmente adotar 1 litro como volume padrão, daí a necessidade de coletar ao menos 3 litros de água, pois cada galão deve ser analisado em réplica, restando mais 1 litro na necessidade de repetição.

- Após a filtração manter os filtros sob papel absorvente, por exemplo, rolos de papel toalha multiuso, encontradas em supermercados em pacotes de 2 rolos com 60 toalhas, mas dê preferência para os totalmente brancos. Cubra os filtros com papel toalha protegendo-os da intensa luz direta.

- Antes de guardar cada filtro em envelopes confeccionados com a folha de alumínio (Figura 2b), dobrá-los, secá-los nas toalhas de papel, de modo a eliminar a maior porção de água possível, sem, contudo, perder o material retido. O melhor modo para preservar os filtros até o momento da análise é mantê-los congelados em freezer a pelo menos -20°C .

- No Quadro I são apresentados sugestões de procedimento para extração dos pigmentos, particularmente empregando choque térmico (quente/frio).

- Para criar a cartela impressa com a escala de cores para uso em bancada e em atividades de campo foram testados alguns procedimentos. Inicialmente a cartela constituída na Figura 5 foi impressa em impressoras jato de tinta e a laser, mas as cores geradas não são representativas da cor apresentada no arquivo. Desta forma, ao menos para impressoras de uso nas atividades comum de escritório, estas não devem ser consideradas para imprimir a cartela. Uma alternativa empregada com maior sucesso foi a impressão em papel brilhante da Figura 5 como fotografia (15x10).

Quadro I: Sugestões de procedimentos para extração do pigmento

- ✓ colocar cada filtro a ser analisado em tubo tipo falcon de 15 ml;
- ✓ aferir o volume do tubo a 10 ml com adição de etanol 90%;
- ✓ envolver os tubos com papel alumínio e numerá-los, mantendo-os protegidos da luz direta;
- ✓ fechar os tubos e colocar fita crepe na tampa dos mesmos, desta forma evita-se a evaporação do solvente;
- ✓ colocar os tubos em béquer coberto com papel alumínio em banho-maria a temperatura de 78°C durante 5 minutos (controlar a temperatura da água com termômetro de mercúrio, pois temperaturas muito elevadas degradam a clorofila);
- ✓ depois deste período provocar choque térmico colocando os tubos em outro béquer com gelo imerso em uma bacia também cheia de gelo, por 5 minutos;
- ✓ posteriormente, levar os tubos cobertos com papel alumínio à geladeira por um período de 24 horas e só então efetuar o contraste com a cartela de cores;
- ✓ os procedimentos apresentados são suficientes para romper a parede celular do fitoplâncton e liberar o pigmento, no entanto, neste procedimento alternativo de baixo custo, é conveniente seguir a extração. Assim, momentos antes do contraste com a cartela de cores macerar o filtro e espremê-lo para remover ao máximo os pigmentos contidos no filtro de algodão. O volume final deverá ser aferido a 10 ml e se necessário adicionar etanol 90%, a temperatura ambiente;
- ✓ em todas as etapas do procedimento de extração evitar contato do filtro e extrato com a luz intensa.

Fontes: Lorenzen (1967), Nush (1980), Marker et al. (1980), Sartory; Grobbelaar (1984), Wetzel; Likens (1991)

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a FAPESP (Projetos nº 2006/51705-0, 2009/16652-1).

REFERÊNCIAS

CAMACHO, F. P.; SOUZA-CONCEIÇÃO, J. M. Distribuição espaço-temporal da clorofila *a* e das variáveis ambientais em praias estuarinas da ilha de São Francisco do Sul (baía da Babitonga, sul do Brasil). **Boletim Técnico Científico CEPENE**, v. 15, n. 2, p. 9-16, 2007. Disponível em: <http://www4.icmbio.gov.br/cepene/modulos/boletim/visualiza.php?id_arq=174>. Acesso em: 01 jan. 2014.

- CARLSON, R. E. A trophic state index for lakes. **Limnol. Oceanogr.**, v. 22, n. 2, p. 361-369, 1977.
- CETESB. COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL. **Relatório de qualidade de águas interiores no Estado de São Paulo 2005**. São Paulo: CETESB, 2006. 488 p.
- DOS SANTOS, A. C. A.; CALIJURI, M. C.; MORAES, E. M.; ADORNO, M. A. T.; FALCO, P. B.; CARVALHO, D. P.; DEBERDT, G. L. B.; BENASSI, S. Comparison of three methods for Chlorophyll determination: Spectrophotometry and Fluorimetry in samples containing pigment mixtures and spectrophotometry in samples with separate pigments through High Performance Liquid Chromatography. **Acta Limnol. Bras.**, v. 15, n. 3, p. 7-18, 2003.
- EIJCKELHOFF, C.; DEKKER, J. P. A routine method to determine the chlorophyll *a*, pheophytin *a* and β -carotene contents of isolated Photosystem II reaction center complexes. **Photosynthesis Research**, v. 52, p. 69-73, 1997. Disponível em: <<http://psi.cz/ftp/publications/others/97-09.pdf>>. Acesso em: 01 jan. 2014.
- EPA. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. **Lake Michigan mass balance: methods compendium, standard operating procedure for chlorophyll-a sampling method: field procedure**. Washington: EPA, 1997. Disponível em: <<http://www.epa.gov/grtlakes/lmmb/methods/chlfield.pdf>>. Acesso em: 01 jan. 2014.
- EPA. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. **Volunteer lake monitoring**. Washington: EPA-Office of Water, s.d. (EPA440-4-91-002). Disponível em: <http://water.epa.gov/type/watersheds/monitoring/upload/2002_08_02_monitoring_volunteer_lake_lakevolman.pdf>. Acesso em: 01 jan. 2014.
- FUNDEL, B.; Stich, H. B.; SCHMID, H.; MAIER, G. Can phaeopigments be use as markers for *Daphnia* grazing in Lake Constance? **J. Plankton Research**, v. 20, n. 8, p. 1449-1462, 1998. Disponível em: <<http://plankt.oxfordjournals.org/content/20/8/1449.full.pdf>>. Acesso em: 01 jan. 2014.
- KURODA, E. K.; DOS SANTOS, A. C. A.; QUEIROZ, L. A.; CALIJURI, M. C.; BERNARDO, L. D. Determinação de clorofila pelo método espectrofotométrico visando o monitoramento da eficiência do tratamento de águas para abastecimento. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA SANITÁRIA E AMBIENTAL, 23., 2005, Campo Grande. **Anais...** Campo Grande: ABES, 2005. Disponível em: <http://www.academia.edu/1218314/I-074_DETERMINACAO_DE_CLOROFILA_PELO_METODO_ESPECTROFOTOMETRICO_VISANDO_O_MONITORAMENTO_DA_EFICIENCIA_DO_TRATAMENTO_DE_>. Acesso em: 01 jan. 2014.
- LAMPARELLI, M. C. **Graus de trofia em corpos d'água do estado de São Paulo: avaliação dos métodos de monitoramento**. 2004. 238 p. Tese (Doutorado em Ecologia) – Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, 2004.
- LORENZEN, C. J. Determination of chlorophyll and phaeo-pigments: Spectrophotometric equations. **Limnol. Oceanogr.**, v. 2, n. 2, p. 343-346, 1967.
- MARKER, A. F. H.; NUSCH, H.; RAI, H.; RIEMANN, B. The measurement of photosynthetic pigments in freshwater and standardization of methods: conclusion and recomendations. **Arch. Hydrobiol. Beih.**, v. 14, p. 91-106, 1980.
- MATORIN, D. N.; ANTAL, T. K.; OSTROWSKA, M.; RUBIN, A. B.; FICEK, D.; MAJCHROWSKI, R. Chlorophyll fluorimetry as a method for studying light absorption by photosynthetic pigments in marine algae. **Oceanologia**, v. 46, n. 4, p. 519-531, 2004. Disponível em: <<http://www.iopan.gda.pl/oceanologia/464mator.pdf>>. Acesso em: 01 jan. 2014.
- NUSCH, E. A. Comparison of different methods for chlorophyll and phaeopigment determination. **Hydrobiol. Belh. Ergebn. Limnol.**, v. 14, p. 14-36, 1980.
- POMPÊO, M.; CARDOSO-SILVA, S.; MOSCHINI-CARLOS, V. A deterioração da qualidade das águas continentais brasileiras: o processo de eutrofização. **Saneas**, v. 2, n. 21, p. 24-28, 2005.
- POMPÊO, M.; MOSCHINI-CARLOS, V. O abastecimento de água e o esgotamento sanitário: propostas para minimizar os problemas no Brasil. In: ROSA, A. H.; FRACETO, L. F.; MOSCHINI-CARLOS, V. (Org.). **Meio ambiente e sustentabilidade**. Porto Alegre: Bookman, 2012. 410 p.
- PROENÇA, L. A. O. Clorofila *a* do fitoplâncton em seis enseadas utilizadas para o cultivo de moluscos bivalves no litoral de Santa Catarina. **Notas Técnicas Facimar**, v. 6, p. 33-44, 2002. Disponível em: <<http://www6.univali.br/seer/index.php/bjast/article/viewFile/2513/1741>>. Acesso em: 01 jan. 2014.

- SALAS, H. J.; MARTINO, P. **Metodologias simplificadas para la evaluation de eutrofication em lagos calidos tropicales**. Washington: CEPIS, 1990.
- SALDANHA-CORRÊA, F. M. P.; GIANESELLA, S. M. F.; BARRERA-ALBA, J. J. A comparison of the retention capability among three different glass-fiber filters used for chlorophyll-a determinations. **Brazilian Journal of Oceanography**, v. 52, n. 3/4, p. 243-247, 2004. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/bjoc/v52n3-4/07.pdf>>. Acesso em: 01 jan. 2014.
- SARTORY, D. P.; GROBBELAAR, J. U. Extraction of chlorophyll *a* from freshwater phytoplankton for spectrophotometric analysis. **Hydrobiologia**, v. 114, p. 177-187, 1984. Disponível em: <http://download.springer.com/static/pdf/481/art%253A10.1007%252FBF00031869.pdf?auth66=1390576061_7e19e1422d79f8a1813e9a870aab8bae&ext=.pdf>. Acesso em: 01 jan. 2014.
- SALONEN, K.; SARVALA, J. **Field manual for the determination of chlorophyll and primary production in Lake Tanganyika research**. Washington: Research for the Management of the Fisheries on Lake/Finnish International Development Agency Food and Agriculture/Organization of the United Nations, 1995, 20 p. Disponível em: <<http://ftp.fao.org/fi/ltr/FM18.PDF>>. Acesso em: 01 jan. 2014.
- TOLEDO JR, A. P.; TALARICO, N.; CHINEZ, S. J.; AGUDO, E. G. Aplicação de modelos simplificados para avaliação de processo de eutrofização em lagos e reservatórios tropicais. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA SANITÁRIA E AMBIENTAL, 12., 1983, Camboriú. **Anais...** São Paulo: CETESB, 1983. p. 1-34.
- WETZEL, R. G.; LIKENS, G. E. **Limnological analyses**. 2. ed. Dordrecht: Springer-Verlag, 1991. 391 p.