



# NORMA TÉCNICA

L5.321

Dez/1989  
17 PÁGINAS

Água - determinação do potencial de crescimento algáceo:  
método de ensaio

**Companhia Ambiental do Estado de São Paulo**  
Avenida Professor Frederico Hermann Jr., 345  
Alto de Pinheiros CEP 05459-900 São Paulo SP  
Tel.: (11) 3133 3000 Fax.: (11) 3133 3402

<http://www.cetesb.sp.gov.br>

CETESB	<b>ÁGUA – DETERMINAÇÃO DO POTENCIAL DE CRESCIMENTO ALGÁCEO</b> Método de ensaio	L5.321 DEZ/89
--------	--	------------------

SUMÁRIO	Pág.
1 Objetivo.....	1
2 Normas complementares.....	1
3 Definições.....	1
4 Princípio do método.....	2
5 Aparelhagem.....	2
6 Execução do ensaio.....	3
7 Resultados.....	8
Anexo A - Preparo do meio de cultura L.C.Oligo.....	11
Anexo B - Manutenção da cultura de algas.....	13
Anexo C - Determinação de nutrientes limitantes.....	15
Anexo D - Referências bibliográficas.....	17

### 1 OBJETIVO

Esta Norma prescreve o método de determinação do potencial de crescimento algáceo de amostras de água natural, a partir de culturas mono-específicas. O procedimento descrito permite:

- a) avaliar o nível nutricional de amostras de água;
- b) detectar a eventual presença de substâncias tóxicas ou inibidoras do crescimento algáceo em amostras de água;
- c) com modificações sugeridas nesta Norma, identificar nutrientes limitantes para o crescimento algáceo.

### 2 NORMAS COMPLEMENTARES

Na aplicação desta Norma, é necessário consultar:

- ABNT 1:62.02-001 - Planejamento de amostragem de efluentes líquidos e corpos receptores.
- ABNT 1:62.02-002 - Preservação e técnica de amostragem de efluentes líquidos e corpos receptores.

### 3 DEFINIÇÕES

Para os efeitos desta Norma são adotadas as definições de 3.1 a 3.6.

#### 3.1 Biomassa máxima algácea

Quantidade máxima de biomassa algácea obtida durante o período de incubação que, por convenção, é atingida quando a elevação de biomassa

torna-se inferior a 5% ao dia.

### 3.2 Cultura mono-específica de algas

População de uma única espécie de alga mantida em meio nutritivo, sob condições controladas de laboratório.

### 3.3 Cultura axênica

Cultura mono-específica de algas, isenta de contaminação microbiana.

### 3.4 Nutriente limitante

Nutriente essencial para o crescimento de algas que, estando em baixas concentrações, ou não disponível biologicamente, limita a biomassa algácea. Pode ser identificado quando um aumento da sua concentração resulta em um aumento do crescimento algáceo.

### 3.5 Soluções-estoque

Soluções de um reagente que são utilizados no preparo do meio de cultura ou das soluções-teste, em ensaio para avaliação do nutriente limitante do crescimento algáceo.

### 3.6 Soluções-teste

Água natural, com ou sem adição de reagentes, nas quais são colocados os organismos-teste.

## 4 PRINCÍPIO DO MÉTODO

4.1 Este método consiste na exposição de cultura axênica de uma espécie de alga verde, de água doce (Clorofíceas) (ver item 6.4), à amostras de água natural, por um período de sete dias, nas condições prescritas nesta Norma.

4.2 O crescimento algáceo obtido é comparado com o de outras amostras de água, ou com os de diferentes tratamentos onde se adicionam reagentes específicos.

## 5 APARELHAGEM

A aparelhagem utilizada no ensaio consiste de:

### 5.1 Equipamentos

#### 5.1.1 Autoclave

#### 5.1.2 Bico de Bunsen

#### 5.1.3 Câmara de fluxo laminar

#### 5.1.4 Centrífuga

- 5.1.5 Fluorômetro ou Espectrofotômetro (opcionais)
- 5.1.6 Medidor de pH
- 5.1.7 Medidor de intensidade luminosa
- 5.1.8 Mesa agitadora com iluminação de lâmpadas fluorescentes (luz fria) (opcional)
- 5.1.9 Microscópio óptico
- 5.1.10 Termômetro
- 5.2 Materiais
  - 5.2.1 Balões volumétricos de 1 000 mL
  - 5.2.2 Câmaras para contagem de fitoplâncton
  - 5.2.3 Equipamento para filtração em membrana
  - 5.2.4 Frascos Erlenmeyer de 100, 250 ou 500 mL
  - 5.2.5 Kitassatos de 1 000 mL ou 2 000 mL
  - 5.2.6 Membrana de acetato de celulose, de 0,45 µm de porosidade
  - 5.2.7 Pipetas tipo Mohr de 1,2,5 e 10 mL
  - 5.2.8 Provetas de 100 mL
  - 5.2.9 Tampões de gaze ou outro material adequado
  - 5.2.10 Tubos de centrífuga com tampa, autoclaváveis

Nota: Todo o material que entre em contato com as soluções deve ser quimicamente inerte, preferencialmente de vidro.

## 6 EXECUÇÃO DO ENSAIO

### 6.1 Reagentes

Todos os reagentes utilizados na execução do teste devem ser de grau analítico.

- 6.1.1 Ácido bórico ( $H_3BO_3$ )
- 6.1.2 Ácido cítrico ( $H_3C_6H_5O_7 \cdot H_2O$ )
- 6.1.3 Ácido clorídrico (HCl)
- 6.1.4 Bicarbonato de sódio ( $NaHCO_3$ )
- 6.1.5 Citrato de ferro ( $C_6H_5FeO_7 \cdot 5H_2O$ )
- 6.1.6 Cloreto férrico ( $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ )
- 6.1.7 Fosfato dibásico de potássio ( $K_2HPO_4$ )

6.1.8 Molibdato de amônia  $[(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}\cdot 4\text{H}_2\text{O}]$

6.1.9 Nitrato de cálcio  $[\text{Ca}(\text{NO}_3)_2\cdot 4\text{H}_2\text{O}]$

6.1.10 Nitrato de manganês  $[\text{Mn}(\text{NO}_3)_2\cdot 4\text{H}_2\text{O}]$

6.1.11 Nitrato de potássio ( $\text{KNO}_3$ )

6.1.12 Solução lugol

6.1.13 Sulfato de cobre ( $\text{CuSO}_4\cdot 5\text{H}_2\text{O}$ )

6.1.14 Sulfato ferroso ( $\text{FeSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ )

6.1.15 Sulfato de magnésio ( $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ )

6.1.16 Sulfato de zinco ( $\text{ZnSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ )

## 6.2 Lavagem de material

6.2.1 A vidraria nova a ser utilizada nos ensaios deve ser lavada com detergente neutro, e enxaguada com água de torneira, acetona, pura, solução de ácido nítrico a 5% e água destilada.

6.2.2 A vidraria a ser utilizada na manutenção das culturas de algas deve ser previamente lavada da seguinte forma:

6.2.2.1 Lavar com detergente neutro.

6.2.2.2 Enxaguar com água de torneira.

6.2.2.3 Deixar em solução de ácido clorídrico a 10% por 24 horas.

6.2.2.4 Enxaguar com água de torneira, e água destilada.

6.2.2.5 Secar a vidraria limpa em estufa a  $105^\circ\text{C}$ .

6.2.2.6 Fechar os frascos Erlenmeyer com tampões apropriados, cobrir com papel alumínio e autoclavar a  $121^\circ\text{C}$  (15 psi) por 15 minutos.

6.2.3 A vidraria utilizada nos ensaios com algas deve ser lavada com soluções adequadas para a remoção dos contaminantes específicos e enxaguada com água destilada. Para a lavagem de vidraria, seguir a ABNT 1:62.02-002.

## 6.3 Meio de cultura

O meio de cultura utilizado no teste é o meio L.C. Oligo, cujo preparo está descrito no Anexo A.

## 6.4 Organismo-teste

Para a realização desse ensaio pode-se empregar algas verdes dos seguintes gêneros: Chlorella, Scenedesmus, Selenastrum, mantidos em meio L.C. Oligo, em culturas axênicas e condições controladas de tem

peratura e luminosidade.

#### 6.4.1 Preparo do inóculo de algas

Dois a três dias antes do início do teste, a cultura de alga mantida em ágar (ver Anexo B) deve ser inoculada em 100 mL de meio de cultura L.C. Oligo líquido esterilizado, utilizando-se uma alça de platina. Essa nova cultura deve ser mantida em incubação na mesa agitadora nas mesmas condições de temperatura, luminosidade e agitação utilizadas no teste. No dia da montagem do teste, a nova cultura, que deverá estar na fase exponencial de crescimento, será utilizada como inóculo, e deverá ser preparada da seguinte forma:

6.4.1.1 Centrifugar a cultura em frascos de centrífuga esterilizado, durante 10 a 15 minutos a 1 500 rpm, e descartar o sobrenadante.

6.4.1.2 Ressuspender o sedimentado em 15 a 20 mL de solução esterilizada de  $\text{NaHCO}_3$  (15 mg/L) e repetir o mesmo procedimento de centrifugação e ressuspensão por mais duas vezes.

6.4.1.3 A suspensão de células resultante deve ser amostrada para contagem da densidade de células de algas, utilizando-se câmaras para contagem de fitoplâncton e microscópio óptico, e o volume do inóculo a ser adicionado nos frascos-teste deve ser calculado, de maneira a resultar em uma concentração inicial de  $10^4$  células/mL em cada frasco. O volume a ser adicionado deve estar entre 0,1 e 1,0 mL. Todo o procedimento de preparo do inóculo deve ser realizado em câmara de fluxo laminar, de maneira a evitar contaminação da cultura algácea.

#### 6.5 Amostragem

Para se obter uma amostra representativa do local em estudo, uma programação de amostragem, e escolha dos pontos de coleta deve ser realizada. Deve constar dessa programação se é adequado proceder amostragens de superfície ou em várias profundidades.

6.5.1 Para a coleta de amostras de água deve-se seguir a ABNT 1:62.02-001. Os frascos devem ser totalmente preenchidos com a amostra, de maneira a evitar a presença de ar nos mesmos. O ensaio deve ser realizado o mais rápido possível, não excedendo o período de seis horas contadas a partir do início da coleta. Na impossibilidade de ser obedecido este intervalo de tempo, a amostra deve ser mantida a  $4^\circ\text{C}$ , a partir do momento da coleta, durante o período de no máximo 24 horas.

## 6.6 Preparo da amostra

6.6.1 No laboratório, as amostras devem ser filtradas em membrana de acetato de celulose esterilizadas, de 0,45 µm de porosidade, dentro do campo de esterilidade de um Bico de Bunsen ou câmara de fluxo laminar. A membrana filtrante deve ser lavada com 50 mL de água destilada esterilizada antes da filtração das amostras de água, para evitar a contaminação com nutrientes liberados da membrana, que podem modificar o resultado do ensaio.

6.6.2 Determinações físico-químicas da amostra devem ser efetuadas, como pH, OD, condutividade e dureza.

## 6.7 Procedimento

### 6.7.1 Preparo das soluções-teste

6.7.1.1 O preparo das soluções e todas as etapas do ensaio devem ser realizadas em ambiente isento de vapores ou poeiras tóxicas e à temperatura ambiente ( $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ).

6.7.1.2 As amostras de água filtrada devem ser colocadas em frascos-teste (Erlenmeyer) esterilizados.

6.7.1.3 A relação superfície do frasco e volume da amostra deve ser adequada para que se mantenha uma troca satisfatória de gases na interface água-ar. Recomenda-se o emprego das seguintes relações:

- a) 40 mL de amostra em frasco Erlenmeyer de 125 mL;
- b) 60 mL de amostra em frasco Erlenmeyer de 250 mL;
- c) 100 mL de amostra em frasco Erlenmeyer de 500 mL.

6.7.1.4 Se for realizado o ensaio para identificar nutrientes limitantes, deve-se adicionar as soluções-estoque dos reagentes em estudo, nas concentrações escolhidas, nos frascos-teste já contendo a água filtrada (Ver Anexo C).

6.7.1.5 A qualidade do inóculo de algas utilizado no teste deve ser verificada através do acompanhamento do crescimento em frascos controle, contendo somente o meio de cultura indicado nesta Norma (item 5.3).

6.7.1.6 Para os procedimentos descritos nos itens 6.7.1.2, 6.7.1.4 e 6.7.1.5, recomenda-se a utilização de no mínimo 3 réplicas para cada tratamento.

### 6.7.2 Inoculação das soluções-teste

Antes de receber o inóculo de algas, os frascos-teste devem ser agitados para homogeneização das soluções-teste. Após a adição do inóculo, os frascos devem ser novamente agitados. Aliquotas devem ser então retiradas de cada frasco, para posterior determinação do número inicial de células (ver item 6.7.5).

#### 6.7.3 Distribuição dos frascos ao acaso

Após a amostragem inicial, os frascos devem ser distribuídos ao acaso na mesa agitadora (ou local de teste) e a posição dos mesmos deve ser mudada todos os dias, de modo a minimizar possíveis diferenças especiais de luminosidade e temperatura no crescimento algáceo.

#### 6.7.4 Condições do teste

A incubação dos frascos deve ser realizada nas condições padronizadas de:

- a) temperatura:  $24 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ;
- b) iluminação contínua:  $5\ 000 \pm 10\%$  lux;
- c) velocidade de agitação contínua: 100 a 175 rpm;
- d) período de teste: 7 dias, ou até que os frascos controle (meio de cultura) atinjam a biomassa máxima.

6.7.4.1 Se alguma das condições de teste estabelecidas no item 5.7.4 for modificada, deve-se realizar um estudo prévio para conhecimento do comportamento da espécie de alga em estudo ao longo do tempo. Recomenda-se que uma curva de crescimento seja obtida antes do início do ensaio, nas condições de teste escolhido, para que se estabeleça o período de teste adequado.

#### 6.7.5 Determinação do crescimento algáceo

Diariamente devem ser colhidos 2 a 3 mL de cada frasco-teste para determinação da biomassa algácea. A biomassa produzida durante o período de incubação pode ser determinada através de métodos estabelecidos (D-2), como segue:

- a) contagem celular (ao microscópio óptico, ou com contador eletrônico de partículas);
- b) conteúdo de clorofila (fluorimetria ou espectrofotometria);
- c) turbidez (absorvância luminosa a 750 nm);
- d) massa seca.

No caso de ser utilizada a contagem celular ao microscópio óptico, as amostras devem ser preservadas em lugol para posterior determinação do crescimento, através de câmaras de contagem de fitoplâncton. Qualquer que seja o método escolhido, recomenda-se a obtenção de curvas de regressão para estabelecimento da relação entre a unidade de leitura e o número de células/mL ou massa seca (g). Deve ser verificado, ao microscópio óptico, se ocorreram anormalidades no tamanho ou formato das células.

## 7 RESULTADOS

### 7.1 Análise dos dados

7.1.1 As biomassas iniciais (tempo zero) devem ser subtraídas das biomassas máximas de cada frasco-teste, obtendo-se assim a biomassa produzida no final do período de exposição. A partir desses dados, deve-se calcular a biomassa média em cada tratamento, considerando-se todas as suas réplicas. Curvas de crescimento para cada tratamento e controle poderão ser feitos (crescimento em função do tempo) ao longo do período de teste.

7.1.2 No caso de ensaio para identificação do nutriente limitante, deve ser realizada uma análise estatística adequada, que possibilite a comparação dos resultados obtidos em cada tratamento. Se para, os diversos tratamentos, as hipóteses de normalidade e homocedasticidade forem satisfeitas, emprega-se então a estatística F-Fischer (ANOVA) (D-4) para comparação das médias. Caso contrário, estatísticas não-paramétricas devem ser utilizadas, por exemplo a estatística sugerida por Kruskal-Wallis (D-5).

### 7.2 Expressão dos resultados

A biomassa produzida no período de exposição em ensaios com amostras de água natural, com ou sem adição de nutrientes, deve ser expressa em número de células/mL, massa seca (g), ou concentração de clorofila.

### 7.3 Validade dos resultados

Os resultados devem ser considerados válidos se:

- a) o crescimento obtido no meio de cultura (controle de qualidade de da cultura de algas) for normal;
- b) as condições estabelecidas para o teste se mantiverem constantes durante o período de exposição.

### 7.4 Relatório

Devem constar no relatório de teste as seguintes informações:

- a) método utilizado;
- b) procedimento de preparo de amostras soluções-estoque e soluções-teste;
- c) substâncias testadas e tratamentos utilizados;
- d) dados físico-químicos referentes ao teste;
- e) resultados do teste, expresso em número de células/mL, massa seca ou concentração de clorofila;
- f) método estatístico utilizado;
- g) qualquer anomalia observada na cultura de algas durante o teste;
- h) modificações introduzidas e eventuais ocorrências durante a realização do teste.

/ANEXO A

REVOGADA

ANEXO A - PREPARO DO MEIO DE CULTURA L.C.OLIGO (AFNOR, 1980)A-1 Soluções

Todas as soluções utilizadas no meio (Tabela) devem ser preparadas com reagentes de boa qualidade (P.A.) e com água destilada ou desionizada, com condutividade igual ou menor que 10  $\mu\text{S/cm}$  e isenta de contaminantes.

TABELA - Soluções-estoque do meio L.C.Oligo

Nº da solução	Substância química	Massa (g)	Volume final da solução (mL)
1	$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	4	100
2	$\text{KNO}_3$	10	100
3	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	3	100
4	$\text{K}_2\text{HPO}_4$	4	100
5	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ $\text{Mn}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ $\text{H}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$ $\text{H}_3\text{BO}_3$	0,030 0,060 0,060 0,060 0,060 0,060	1 000
6	$\text{C}_6\text{H}_5\text{FeO}_7 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	1,625 0,625 0,625	1 000
7	$\text{NaHCO}_3$	15	1 000

A-2 Preparo do meio

Em balão volumétrico de 1 000 mL, colocar 500 mL de água destilada ou desionizada, e adicionar na seguinte ordem:

- a) 1 mL das soluções 1, 2, 3 e 4;
- b) 0,5 mL das soluções 5 e 6;
- c) 1 mL da solução 7.

Completar para 1 000 mL com água e agitar durante 1 hora para estabilizar a solução. O pH do meio deve estar na faixa de  $7,1 \pm 0,1$ . Se necessário, o pH do meio pode ser ajustado com soluções de NaOH ou HCl 1N. O meio deve ser colocado em recipientes de borossilicato e

autoclavado a 121°C por 20 minutos.

---

/ANEXO B

REVOGADA

ANEXO B - MANUTENÇÃO DA CULTURA DE ALGASB-1 Meio de ágar para manutenção das algas

As culturas de algas podem ser mantidas em meio de ágar inclinado com peptona protease, em condições controladas de temperatura (4°C) e luminosidade (150 lux). Para o preparo do meio sólido, o seguinte procedimento deve ser seguido:

B-1.1 Em um litro de água destilada ou desionizada, adicionar 10 g de ágar e deixar hidratar por 30 minutos.

B-1.2 O ágar hidratado é aquecido em banho-maria, com agitações constantes, até que esteja totalmente dissolvido.

B-1.3 Após a dissolução total do ágar, adicionar os seguintes sais nutrientes: 0,2 g de  $\text{KNO}_3$ ; 0,02 g de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  e 0,02 g de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ . Quando o ágar estiver quase frio, e ainda líquido, adicionar 1 g de peptona protease.

B-1.4 Coloca-se o meio nos frascos, em quantidade suficiente para preparar os meios inclinados e deixa-se esfriar sem tampar.

B-1.5 Em seguida, os frascos devem ser tampados, autoclavados por 15 minutos a 121°C e colocados em ângulo de 45° para a obtenção do meio inclinado.

B-2 Repique da cultura de algas

A cultura de algas escolhida é repicada de uma garrafa de ágar inclinado para outro a cada 4 a 5 meses. Deve-se evitar repiques sucessivos e muito frequentes para reduzir o risco de desvio genético e perda da condição axênica da cultura. As culturas novas são incubadas a  $24 \pm 2^\circ\text{C}$  sob luminosidade de  $2\ 100 \pm 10\%$  lux, até que um bom crescimento algáceo seja obtido. As culturas são então, colocadas nas condições descritas em B-1.

REVOGADA

ANEXO C - DETERMINAÇÃO DE NUTRIENTES LIMITANTESC-1 Princípio da limitação de nutrientes (D-2 e D-3)

A quantidade de células produzidas em um meio é limitada pela concentração relativa de nutrientes presentes, considerando-se as necessidades do organismo. Se uma quantidade do nutriente limitante é adicionada ao meio, a produção de células aumenta até que esse suprimento adicional seja todo utilizado, ou até que algum outro nutriente se torne limitante. Adições de substâncias que não são limitantes não proporcionalizarão tal aumento na produção de células.

C-2 Procedimento

O objetivo do estudo determinará o tipo de tratamento a ser utilizado, e o planejamento do experimento deverá ser feito de forma a que os efeitos possam ser medidos e comparados.

C-2.1 Os nutrientes podem ser adicionados individualmente ou em combinação, e as respostas de crescimento são comparadas com os controles onde nada foi adicionado, para identificar as substâncias que limitam a taxa de crescimento ou a produção de células.

C-2.2 A seleção das substâncias a serem adicionadas (nitrogênio, fósforo, ferro, efluentes, etc.) irá depender dos objetivos do estudo.

C-2.3 Recomenda-se adicionar o menor volume de solução de nutrientes necessário para se obter uma resposta mensurável. A concentração dos nutrientes adicionados deve estar relacionado com os níveis de nutrientes do local em estudo.

Nota: O controle não tratado às vezes é altamente produtivo, e assim variações entre os frascos pode ser maior, mascarando o efeito de pequenas condições do nutriente limitante. É necessário analisar a água a ser testada para verificar uma eventual presença de substâncias tóxicas.

C-2.4 Experimentos onde os efeitos de um ou dois nutrientes são comparados, em uma ou mais concentrações, requerem planejamento dos diferentes grupos de tratamento.

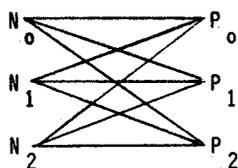
Como exemplo:

Se os efeitos de duas substâncias nutritivas (nitrato e fosfato), cada uma em dois níveis, forem comparados, deve ser utilizado um experimento fatorial de 3 x 3, com grupos experimentais que abranjam as diversas situações, como no esquema a seguir:

Nitrato

Fosfato

Grupos experimentais:



$$G_1 = N_0 + P_0$$

$$G_2 = N_0 + P_1$$

$$G_3 = N_0 + P_2$$

$$G_4 = N_1 + P_0$$

$$G_5 = N_1 + P_1$$

$$G_6 = N_1 + P_2$$

$$G_7 = N_2 + P_0$$

$$G_8 = N_2 + P_1$$

$$G_9 = N_2 + P_2$$

onde: o = ausência do nutriente

1 = concentração 1

2 = concentração 2

C-2.5 Os resultados obtidos em experimentos assim planejados devem ser analisados através de análise estatística, que possibilite com parar os efeitos de cada tratamento (ver item 7.1.2 desta Norma).

/ANEXO D

ANEXO D - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

D-1 AFNOR - Association Française de Normalisation. Norme expérimentale T90-304. Essais des eaux. Détermination de l'inhibition de Scenedesmus subspicatus par une substance, 1980.

D-2 APHA - American Public Health Association. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 15<sup>a</sup> ed. New York, 1980. pp:615-743.

D-3 USEPA - Algal Assay Procedure: Bottle Test. National Eutrophication Research Program. Corvallis, Oregon. 1971. 82 p.

D-4 MOOD, A.M., GRAYBILL, F.A., BOES, D.C. Introduction to the theory of statistics. McGraw-Hill International Book Company-International Student Edition. 3<sup>a</sup> ed. 1982, 564 p.

D-5 SIEGEL, S. Estatística não-paramétrica para as ciências do comportamento. Editora McGraw-Hill do Brasil, Ltda. 1979, 350 p.