



Universidade Federal do Rio Grande
Instituto de Ciências Biológicas
Pós-graduação em Biologia de
Ambientes Aquáticos Continentais



**Efeitos da Exposição ao Pesticida Carbofurano em
Duas Espécies de Microalgas (*Desmodesmus
communis* e *Pediastrum boryanum*) e seu Potencial
de Biorremediação**

Daniéli Saul da Luz

Orientadora: Camila De Martinez Gaspar Martins
Co-orientador: Danilo Giroldo

Rio Grande
2014



Universidade Federal do Rio Grande
Instituto de Ciências Biológicas
Pós-graduação em Biologia de Ambientes
Aquáticos Continentais



**Efeitos da Exposição ao Pesticida Carbofurano em Duas Espécies de
Microalgas (*Desmodesmus communis* e *Pediastrum boryanum*) e seu
Potencial de Biorremediação**

Aluno: Daniéli Saul da Luz

Orientadora: Camila De Martinez Gaspar Martins

Co-orientador: Danilo Giroldo

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biologia de Ambientes Aquáticos Continentais como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Biologia de Ambientes Aquáticos Continentais.

Rio Grande
2014

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, pelo apoio incondicional durante toda a minha jornada, mesmo que parte dela tenha sido longe de seus braços.

AGRADECIMENTOS

Durante o Mestrado em Biologia de Ambientes Aquáticos Continentais, foi possível vivenciar e aprender novas experiências, conhecer novas pessoas, lugares, mas principalmente conquistar novas amizades. Pessoas que fizeram toda a diferença para tornar essa trajetória marcante e agradável, além, é claro, das velhas amizades, as quais nunca deixaram de me acompanhar e apoiar. Dessa forma, dedico meus sinceros agradecimentos à(s); ao(s):

Minha família, que sempre me apoiou financeira e psicologicamente durante minha estada em Rio Grande. Souberam compreender minhas ausências e meu mal humor. Agradeço pela preocupação com meu bem estar constantemente.

Minhas amigas de Santa Maria/RS, que souberam compreender minhas ausências em aniversários, casamentos, festas, defesas de Mestrado e nem por isso deixaram de me convidar para tudo. Marcaram-me em fotos no *facebook* mesmo estando a 400 km de distância e não deixaram de me apoiar nos momentos de estresse e saudade longe de casa;

Minhas amigas de Rio Grande/RS, Marluci e Jéssica, que foram mais do que colegas, vizinhas, companhias para todas as horas (todas mesmo!), e como se não bastasse também me hospedaram muitas vezes quando eu já não morava mais na cidade;

Cibele, que conheci como colega de Mestrado e acabou se transformando em colega de apartamento, mas muito mais que isso! Tornou-se uma irmã durante esses dois anos e espero que assim seja para o resto da vida;

Vagner, que esteve presente de alguma forma durante esses dois anos e muito me auxiliou nas tarefas do Mestrado, e também soube me escutar e apoiar durante meus desabafos sobre as dificuldades nesse período;

Savênia, a primeira pessoa do Laboratório de Cultivos de Microalgas que conheci e a qual jamais vou esquecer, porque além de ter me auxiliado muito com meus cultivos e análises, tornou-se um exemplo de dedicação a tudo que faz dentro do laboratório. Também me acolheu e deu dicas quando eu conhecia pouco a cidade de Rio Grande/RS.

Orientadores, Camila Martins e Danilo Giroldo, pelo apoio, ensinamentos e paciência para corrigir e explicar tudo o que era necessário para vencer essa etapa;

Daniele, bolsista de iniciação científica do curso de Tecnologia em Toxicologia Ambiental, e minha principal auxiliar nos experimentos. Agradeço toda a dedicação, paciência e as caronas para a FURG;

Todos os funcionários e colegas de outros laboratórios da Universidade Federal do Rio Grande (FURG) que com paciência e boa vontade me ajudaram de alguma forma durante a realização desse Curso.

CAPES/CNPq pela concessão da minha bolsa de estudos durante os dois anos de Mestrado.

RESUMO

As microalgas são organismos de extrema importância responsáveis pela produção de matéria orgânica e oxigênio nos ambientes aquáticos, portanto, qualquer alteração causada por agrotóxicos na estrutura e/ou função desses organismos podem acarretar graves consequências para a biota. Nesta linha,, os efeitos tóxicos do pesticida carbofurano foram avaliados sobre duas espécies de microalgas da Classe Chlorophyceae, *Pediastrum boryanum* e *Desmodesmus communis*, a partir da mensuração de: viabilidade celular, biomassa, teor de clorofila e quantificação de espécies reativas de oxigênio (ERO). Ainda, foi avaliada a capacidade de estas algas retirarem o carbofurano presente no meio extracelular. Para tanto, ambas as espécies foram expostas agudamente ao carbofurano (100, 1.000 e 10.000 $\mu\text{g L}^{-1}$) na sua formulação comercial Furadan 350 SC[®] por 7 dias. Com o objetivo de escolher o melhor método para analisar a viabilidade das microalgas, foram testadas três metodologias usadas rotineiramente para medir a viabilidade de células animais – MTT, Azul de Evans e Vermelho Neutro (VN) – em *P. boryanum* e *D. communis* expostas ao herbicida glifosato (Roudup Transorb[®]), usado neste caso como tóxico de referência. Os resultados mostraram que as técnicas de MTT e VN são ferramentas aptas a serem utilizadas em análises de toxicidade de microalgas-alvo do estudo, sendo que o VN apresentou maior sensibilidade e o MTT maior facilidade de execução. Dessa forma, foi utilizado o MTT para medir a viabilidade das algas expostas ao carbofurano e não foi observada redução na viabilidade das células. Ainda, registramos que ambas as espécies cresceram quando em contato com o agroquímico, embora *D. communis* tenha apresentado crescimento menor que o controle, indicando um efeito negativo do pesticida sobre a espécie. Assim como a viabilidade celular, a concentração de clorofila não foi afetada pela presença do carbofurano. Em contrapartida, pudemos observar um aumento significativo na produção de ERO em *D. communis* e *P. boryanum* na maior concentração de exposição, sendo este aumento observado já aos quatro dias de exposição para a primeira alga e apenas ao sétimo dia para a segunda. Quanto à concentração de carbofurano no meio de cultivo, houve um rápido decréscimo do pesticida quando na presença das algas, indicando que elas foram capazes de remover o químico do meio em, no máximo, 5 dias de exposição. Em resumo, nossos resultados demonstram que existem diferenças de sensibilidade entre as duas algas, sendo a *D. communis* mais sensível. Além disso, a aplicação do carbofurano pode exercer efeitos negativos sobre as espécies de microalgas testadas, sendo estes expressos na forma de inibição do crescimento e geração de ERO; no entanto, tais efeitos ocorrem, principalmente, em concentração muito elevada do pesticida. Pela resistência e capacidade das microalgas em concentrar o carbofurano, sugere-se a

possibilidade de utilização destas cepas como ferramentas para descontaminação de ambientes impactados por esta classe de contaminantes.

Palavras-chave: algas, toxicidade, pesticida, descontaminação

ABSTRACT

Microalgae are very important organisms responsible for the production of organic matter and oxygen in aquatic environments. Therefore, any change caused by pesticides in the structure and / or function of these organisms may have serious consequences for biota. For this reason, the toxic effects of carbofuran were evaluated in two freshwater Chlorophyceae, *Pediastrum boryanum* and *Desmodesmus communis*. The parameters cell viability, biomass, chlorophyll a content and production of Reactive Oxygen Species (ROS) were measured. Still, we evaluated the capacity of these algae to remove carbofuran from the medium. Both species were exposed to carbofuran (100, 1000, and 10000 $\mu\text{g L}^{-1}$) as its commercial formula Furadan 350 SC[®] for 7 days. To choose the best method to analyze microalgae cell viability, we tested three methods which are routinely used to measure cell viability of animal cells – MTT, Evans' Blue, and Neutral Red (NR). This test was performed on *P. boryanum* and *D. communis* exposed to the herbicide glyphosate (Roudup Transorb[®]), used as a reference toxicant. Results showed that the techniques MTT and NR are appropriate tools to measure the microalgae cell viability. The NR was more sensitive and MTT the easiest to perform. Thus, MTT was used to measure cell viability of the microalgae exposed to carbofuran, and no reduction in their viability was observed. Likewise, we verified that both algae grew in the presence of the pesticide, however, *D. communis* was more affected by the pesticide than the control, indicating a negative effect of the pesticide on this species. As well as cell viability, chlorophyll a content was not affected by the presence of carbofuran. On the other hand, we observed a significant increase in ROS production by the fourth and seventh day for *D. communis* and just by the seventh day for *P. boryanum*, at the highest concentration tested. Regarding carbofuran concentration in the medium, there was a rapid decrease of its concentration in the presence of microalgae, which suggest that they are able to bioconcentrate the agrochemical at the maximum of 5 days. In summary, our results show that exist sensitivity differences between the two microalgae for carbofuran, being *D. communis* the most sensitive. Furthermore, the carbofuran exerted toxicity in the two species tested, being the toxic effects expressed as growth inhibition and ROS production; however, toxicity occurred mainly when the pesticide was present in high concentration. Due to their resistance and capacity to remove the agrochemical from the environment, even in high concentrations, these species have potential to be used as tools for decontamination of carbofuran contaminate environments.

Key-words: algae, toxicity, pesticides, decontamination

SUMÁRIO

1-	LISTA DE FIGURAS	10
2-	LISTA DE TABELAS	11
3-	INTRODUÇÃO GERAL	12
4-	OBJETIVOS	16
4.1-	OBJETIVO GERAL	16
4.2-	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	16
5-	REFERÊNCIAS DA INTRODUÇÃO GERAL	16
6-	CAPÍTULO 1.....	23
6.1-	NORMAS DA REVISTA JOURNAL OF PLANKTON RESEARCH.....	36
7-	CAPÍTULO 2.....	41
7.1-	RESUMO.....	43
7.2-	INTRODUÇÃO	44
7.3-	MATERIAL E MÉTODOS	45
7.3.1-	Cultivo de microalgas	45
7.3.2-	Desenho experimental.....	46
7.3.3-	Determinação da densidade celular e concentração de clorofila-a	46
7.3.4-	Quantificação das ERO	47
7.3.6-	Determinação do carbofurano.....	48
7.3.7-	Tratamento estatístico	48
7.4-	RESULTADOS.....	48
7.5-	DISCUSSÃO	50
7.6-	CONCLUSÃO	52
7.7-	AGRADECIMENTOS	52
7.8-	REFERÊNCIAS.....	53
7.9-	NORMAS DA REVISTA AQUATIC TOXICOLOGY.....	65

1- LISTA DE FIGURAS

Capítulo 1

Figura 1A e B.....	33
Figura 2A e B.....	34
Figura 3.....	35

Capítulo 2

Figura 1A e B.....	60
Figura 2A e B.....	61
Figura 3A e B.....	62
Figura 4A, B e C.....	63
Figura 5A, B e C.....	64

2- LISTA DE TABELAS

Capítulo 2

Tabela 1.....	58
---------------	----

3- INTRODUÇÃO GERAL

Os agrotóxicos têm sido amplamente utilizados em diversas culturas no mundo e seu uso vêm crescendo nos últimos anos devido ao aumento no consumo alimentício e também pela adaptação e resistência desenvolvida pelas pragas a esses produtos químicos (Pretty, 2008). No entanto, eles geralmente causam efeitos secundários indesejados e aumentam os custos da produção dos alimentos (Carvalho, 2006). Os agrotóxicos não atingem apenas as espécies-alvo, mas acabam por oferecer riscos a outros organismos não-alvos (Van den Brink & Ter Braak, 1999). Dessa forma, ao chegar aos ambientes aquáticos, podem afetá-lo modificando a estrutura e função da sua biota (Campanella et al., 2000; Ma et al., 2002).

O Brasil está entre os dez maiores produtores mundiais de arroz e a rizicultura irrigada é responsável por 75% da produção nacional total deste grão (EMBRAPA, 2011), sendo o Estado do Rio Grande do Sul o maior produtor brasileiro, responsável por 61% da produção (SOSBAI, 2010). Por conta disso, a rizicultura contribui com grande parte dos agrotóxicos lançados nos corpos d'água (Pinheiro et al., 2008).

Dados de monitoramento ambiental no Estado do Rio Grande do Sul revelam a presença de resíduos de agrotóxicos em sete pontos ao longo do Rio Piratini e Canal São Gonçalo, importantes recursos hídricos utilizados na captação de água para irrigação das lavouras de arroz e pontos de escoamento da água utilizada nos cultivos (Grützacher et al., 2008). Dentre os agrotóxicos mais frequentemente encontrados, está o inseticida carbofurano. No Rio Grande do Sul, o carbofurano foi detectado em diversas regiões do Estado (Fronteira Oeste, Campanha, Sul, Depressão Central, Região Costeira Interna e Externa a Lagoa dos Patos), sendo que a maior concentração média observada foi de $0,520 \mu\text{g L}^{-1}$ na região da planície costeira interna à Lagoa dos Patos (Silva et al., 2009).

O carbofurano (2,3-diidro-2,2-dimetil benzofuran-7-il- metil carbamato) faz parte do grupo dos carbamatos e é um inseticida sistêmico e nematicida, amplamente utilizado para controle de insetos que habitam o solo e que se alimentam de folhas em cultivos agrícolas de arroz, cana-de-açúcar, tabaco, milho, batata, soja e outros vegetais (Yen et al., 1997; Dembélé et al., 2000; Kale, 2001). Este composto é altamente solúvel em água, sendo suscetível à lixiviação e percolação através dos campos agrícolas; podendo ser transportado facilmente e contaminar mananciais hídricos superficiais e subterrâneos (Tariq et al., 2006; Lu et al., 2011). Por exemplo, Caldas (2009) encontrou carbofurano em águas subterrâneas da cidade do Rio Grande no sul Estado do Rio Grande do Sul.

Quando inalado ou ingerido, o carbofurano é altamente tóxico para os animais incluindo os seres humanos e, portanto, pode representar uma grave ameaça para aqueles que entram em contato

com ele, seja na sua fabricação e formulação ou em campos de cultivo (Lalah & Wandiga, 1996). Em animais, o principal mecanismo da ação tóxica dos carbamatos consiste na inibição da enzima acetilcolinesterase (AChE), cuja ação é degradar o neurotransmissor acetilcolina (ACh) (Fukuto, 1990, Rang et al., 1999). A ACh é um mediador químico secretado pelas células nervosas que ao atingir uma outra célula nervosa ou uma célula muscular, provoca, geralmente, resposta excitatória. A resposta excitatória traduz-se em impulsos nervosos, no caso de uma célula nervosa, ou em contração muscular, quando se trata de uma célula muscular. No entanto, no músculo cardíaco, esse neurotransmissor tem ação inibitória, reduzindo tanto a força quanto a frequência de contração do coração. A AChE, por sua vez, catalisa a hidrólise da acetilcolina (ACh) em acetato e colina, interrompendo a transmissão dos impulsos nervosos nas sinapses dos neurônios colinérgicos do sistema nervoso central e periférico. Assim, quando a atividade da AChE é reduzida, o mediador químico ACh age de forma intermitente na fenda sináptica e, conseqüentemente, observa-se um quadro de colapso nervoso e parada cardíaca que pode levar os indivíduos ao óbito (Klaassen, 2008).

Estudos recentes também associam a toxicidade dos pesticidas a um aumento na geração de espécies reativas de oxigênio (ERO), moléculas intermediárias altamente reativas que estão envolvidas nas defesas dos organismos (Macedo et al. 2008; Hernández-Moreno et al., 2011). As ERO reagem (oxidam) com biomoléculas como proteínas, ácidos nucleicos e lipídios, podendo levar a inúmeros danos celulares (Bagchi et al., 1995; Rai e Sharma, 2007, Macedo et al, 2008; Sabatini et al., 2009; Romero et al., 2011). Para combater as ERO, os organismos contam com um arsenal antioxidante formado por compostos enzimáticos (superoxidismutase, catalase, glutathione peroxidase) e não enzimáticos (carotenos, glutathione reduzida e vitaminas). Mesmo assim, situações de estresse oxidativo, causadas por um desbalanço entre pró e antioxidantes, têm sido observadas em mamíferos (Rai e Sharma, 2007), peixes (Hernández-Moreno et al 2008; 2011) e invertebrados (Akbar et al., 2012) após exposição ao carbofurano.

Não apenas restrita a animais, a quantificação de ERO também é realizada em plantas (Apel e Hirt, 2004; Tan et al, 2012) e algas (Okamoto et al., 2001; Zuppini et al., 2007; Sabatini et al., 2009; Galhano et al., 2011a; 2011b; Wei et al., 2011) a fim de se verificar efeitos adversos causados pela presença de poluentes, como metais e agroquímicos, no meio ambiente. Indiferentemente se em plantas ou animais, as ERO são subprodutos emergentes de reações metabólicas normais dos mesmos. No caso dos vegetais, as ERO são produzidas principalmente a partir da fotossíntese e respiração e ainda promovem a resistência a doenças (Kotchoni e Gachomo, 2006). Entretanto, sua superprodução em decorrência da presença de poluentes é prejudicial para o crescimento e desenvolvimento das plantas, indicando que um balanceamento redox adequado é essencial para a saúde destes organismos (Pitzschke et al., 2009).

Em células vegetais as ERO podem danificar facilmente a molécula de clorofila responsável pelo processo da fotossíntese (Tan et al., 2012). A preservação da clorofila é de fundamental importância para a sobrevivência, crescimento e, produtividade das plantas, e os cloroplastos, armazenadores da clorofila, são compartimentos celulares altamente suscetíveis ao estresse oxidativo devido a alta produção de O_2 e H_2O_2 , fluxo de elétrons e presença de íons metálicos em seu interior (Okamoto et al., 2001; Davletova et al., 2005). Nesta linha, o teor de clorofila nas algas, também pode ser um importante marcador do efeito de poluentes. Para o carbofurano, a literatura descreve respostas diversas: para a alga verde *Chlorella vulgaris* e cianobactérias dos gêneros *Nostoc* e *Anabaena* o carbofurano provoca uma diminuição de clorofila-a (Megharaj et al. 1993; Hammouda 1999), enquanto para a alga *Euglena gracillis* não causa nenhum efeito significativo sobre a concentração deste pigmento (Azizzulah et al. 2011).

Estudos ecotoxicológicos sobre os efeitos dos pesticidas em microalgas são comuns, mas, a maioria deles se baseia, principalmente, em parâmetros de crescimento (Macedo et al., 2008; Romero et al., 2011), sendo que poucos trabalhos abordam aspectos como, por exemplo, a geração de ERO e a viabilidade celular. A análise de viabilidade das células nos mostra a proporção entre células metabolicamente ativas e não ativas em uma cultura. Isto nos permite, não apenas, avaliar a toxicidade de um contaminante, como também comparar a sensibilidade dos organismos frente um estressor específico (Berglund e Eversman, 1988; Lage et al 2001). Detectar efeitos tóxicos dos pesticidas em algas é de extrema importância pelo fato de que algas são base das cadeias tróficas e responsáveis pela produção de oxigênio e matéria orgânica nos ambientes aquáticos. Além disso, o fitoplâncton é considerado um importante indicador de qualidade de água devido à sua grande riqueza de espécies e alta sensibilidade a fatores ambientais (Nøges et al., 2010). Entre os grupos que fazem parte do fitoplâncton, destacam-se Chlorophyta, Heterokontophyta e Cyanobacteria como os grupos que assumem maior importância ecológica nos ecossistemas aquáticos de água doce.

Neste sentido, devemos nos preocupar com o destino do carbofurano e seus resíduos, principalmente, quanto a sua persistência e de mobilidade (Farahani et al., 2008). O carbofurano é conhecido por ser o inseticida mais persistente dentro do grupo dos carbamatos, devido à alta estabilidade química da sua molécula (Yen et al., 1997; Benitez et al., 2002). Os dois mecanismos principais que determinam a persistência do carbofurano no meio ambiente são a hidrólise e a degradação microbiana. No entanto, o carbofurano é mais resistente a métodos de degradação por possuir um caráter refratário, requerendo, portanto, mais tempo e micro-organismos específicos para biodegradá-lo de forma eficaz (Benitez et al., 2002; Lu et al., 2011).

A persistência dos agrotóxicos está diretamente relacionada aos problemas causados pelos mesmos nos ecossistemas aquáticos, aumentando o interesse por técnicas de descontaminação dos

corpos d'água. Neste contexto, a biorremediação torna-se uma técnica viável, pois na maioria das vezes não é necessário empregar compostos químicos no tratamento para descontaminação, além do custo relativamente baixo (Jiang et al., 2007). A biodegradação e a biorremediação baseiam-se na conversão ou metabolização de compostos químicos, no caso, por microrganismos e a diferença entre estes dois processos é que na biodegradação o processo é natural, enquanto que a biorremediação trata-se de uma tecnologia (Singh, 2008).

As algas têm sido estudadas como possíveis ferramentas para descontaminação da água contaminada por pesticidas. Há relatos de biodegradação do inseticida fenamifos por microalgas verdes e cianobactérias (Cáceres et al., 2008a; 2008b), de dois fungicidas (dimetomorfe e pirimetanil) e um herbicida (isoproturon) pela microalga verde *Scenedesmus* sp. (Dosnon-Olette et al., 2010), do inseticida endossulfano pela microalga verde *Chlorococcum* sp. (Sethunathan et al., 2004), do herbicida fluroxypyr pela microalga verde *Chlamydomonas reinhardtii* (Zhang et al., 2011), entre outros. Para o inseticida carbofurano, predominam as pesquisas de biodegradação envolvendo bactérias (Chapalmandugu e Chaudhry 1992; Ramanand et al. 1991; Chaudhry et al. 2002), havendo apenas um estudo sobre a degradação desse composto por microalgas. Bicho (2011) demonstrou que cinco cepas de microalgas, *Desmodesmus communis*, *Cosmarium depressum* var. *planctonicum*, *Pediastrum boryanum*, *Spondylosium pygmaeum* e *Xanthidium antilopaeum*, são capazes de degradar o inseticida. No entanto, não existe na literatura a descrição dos padrões de degradação e respostas fisiológicas frente a esse composto, aspectos relevantes para a aplicação destes organismos na remoção do carbofurano de ambientes naturais.

As microalgas são amplamente utilizadas como modelo biológico para estudos ecotoxicológicos pela sua importância ecológica além de possuírem um ciclo de vida curto, crescimento rápido, facilidade de manutenção das culturas e cultivos em meios sintéticos bem definidos (Vidotti e Rollemberg).

Com base no exposto, o objetivo do trabalho foi analisar as respostas das microalgas *D. communis* e *P. boryanum* ao carbofurano presente no meio e, caracterizar a capacidade destas algas em remediar o pesticida.

As espécies escolhidas para o estudo pertencem à Classe Chlorophyceae que possui, aproximadamente, 8.000 espécies conhecidas, sendo que 90% são de ambientes lacustres (Esteves, 1998). Ambos os gêneros-alvo, *Desmodesmus* e *Pediastrum*, são considerados cosmopolitas e característicos de ambientes eutrofizados (Bicudo e Menezes, 2006). Além disso, algas destes gêneros também compartilham uma importante característica que é a complexidade de sua parede celular, *D. communis* e *P. boryanum* apresentam biopolímeros altamente resistentes em sua composição (Blokker et.al, 1998).

4- OBJETIVOS

4.1- OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos da exposição aguda (7 dias) ao carbofurano (100; 1000 e 10000 $\mu\text{g L}^{-1}$) sobre duas espécies de microalgas dulcícolas da Classe Chlorophyceae (*Desmodesmus communis* e *Pediastrum boryanum*), e monitorar a concentração deste composto no meio durante o período de exposição para estimar o potencial de remediação do pesticida por estas algas.

4.2- OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a aplicabilidade das técnicas MTT, Vermelho Neutro e Azul de Evans para mensurar a viabilidade das algas *Desmodesmus communis* e *Pediastrum boryanum*;
- Determinar a viabilidade celular, crescimento, teor de clorofila, geração de espécies reativas de oxigênio (ERO) em *D. communis* e *P. boryanum* no decorrer de 7 dias de exposição ao carbofurano (100; 1000 e 10000 $\mu\text{g L}^{-1}$);
- Monitorar a concentração do carbofurano no meio, ao longo de 7 dias de e avaliar a capacidade de remediação do composto pelas microalgas testadas.

5- REFERÊNCIAS DA INTRODUÇÃO GERAL

Akbar, S.M.D., Sharma H.C., Jayalakshmi, S.K., Sreeramulu K., 2012. Methylparathion and carbofuran induced mitochondrial dysfunction and oxidative stress in *Helicoverpa armigera* (Noctuidae: Lepidoptera). *Pestic. Biochem. Physiol.* *in press*

Apel, K., Hirt, H., 2004. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annu. Rev. Plant Biol.* 55, 373–399.

Azizullah, A., Richter, P., Häder, D., 2011. Comparative toxicity of the pesticides carbofuran and malathion to the freshwater flagellate *Euglena gracilis*. *Ecotoxicology* 20,1442–1454.

Bagchi,D., Bagchi,M., Hassoun, E.A., Stohs, S.J., 1995. In vitro and in vivo generation of reactive oxygen species, DNA damage and lactate dehydrogenase leakage by selected pesticides. *Toxicology* 104, 129-140.

- Benitez, F. J., Acero, J.L., Real, F.J., 2002. Degradation of carbofuran by using ozone, UV radiation and advanced oxidation processes. *J. Hazard. Mater.* B89, 51-65.
- Berglund, D. L., Eversman, S. 1988. Flow cytometric measurement of pollutant stresses on algal cells. *Cytometry* 9, 150–155.
- Bicho, M. S., 2011. Avaliação da toxicidade e degradação do carbofurano por cinco espécies fitoplanctônicas dulcícolas subtropicais. 57p. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, Brasil.
- Bicudo, C. E. de M. & M. Menezes. (org) 2006. Gêneros de algas de águas continentais do Brasil (chave para identificação e descrições) 2ª edição. São Carlos: Rima
- Blokker, P., Schouten, S., Van den Ende, H., *et al.* (1998) Chemical structure of algaenans from the fresh water algae *Tetraedron minimum*, *Scenedesmus communis* and *Pediastrum boryanum*. *Org. Geochem.*, 29, 1453–1468.
- Cáceres, T. P., Mallavarapu Megharaj, M., Naidu, R., 2008 a. Biodegradation of the Pesticide Fenamiphos by Ten Different Species of Green Algae and Cyanobacteria. *Curr. Microbiol.* 57, 643–646
- Cáceres, T., Megharaj, M., Naidu, R., 2008 b. Toxicity and transformation of fenamiphos and its metabolites by two micro algae *Pseudokirchneriella subcapitata* and *Chlorococcum* sp. *Sci. Total Environ.* 398, 53-59.
- Caldas, S. S., 2009. Otimização e validação de métodos empregando DLLME, SPE, HPLC-DAD E LC-ESI-MS/MS para determinação de agrotóxicos em água subterrânea. 125p. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, Brasil.
- Campanella, L., Cubadda F., Sammartino P., Saoncella A., 2000. An algal biosensor for the monitoring of water toxicity in estuarine environments. *Water Res.* 35, 69–76.
- Carvalho, F.P., 2006. Agriculture, pesticides, food security and food safety. *Environ. Sci. Pol.* 9, 685-692.

Chapalmandugu, S., Chaudhry, GR., 1992. Microbial and biotechnological aspects of metabolism of carbamates and organophosphates. Crit. Rev. Biotechnol. 12, 357–389.

Chaudhry, GR., Mateen, A., Kaskar, B., Sardesai, M., Bloda, M.A., Bhatti, R., Walia, S.K., 2002. Induction of carbofuran oxidation to 4- hydroxycarbofuran by *Pseudomonas* sp. 50432. FEMS Microbiol. Lett. 214,171–176.

CONAMA - CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE, resolução n° 357, de 17 de março de 2005.

Davletova, S., Rizhsky, L., Liang, H., Shenggiang, Z., Oliver, D.J., Coutu, J., Shulaev, V., Schlauch, K., Mittler, R., 2005. Cytosolic ascorbate peroxidase 1 is a central component of the reactive oxygen gene network of *Arabidopsis*; Plant Cell 17, 268–281.

Dembélé,K., Haubruge,E., Gaspar,C., 2000. Concentration Effects of Selected Insecticides on Brain Acetylcholinesterase in the Common Carp (*Cyprinus carpio* L.). Ecotoxicol. Environ. Saf. 45, 49-54.

Dosnon-Olette,R., Trotel-Aziz,P., Couderchet,M., Eullaffroy, P., 2010. Fungicides and herbicide removal in *Scenedesmus* cell suspensions. Chemosphere 79, 117–123.

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária- EMBRAPA, 2011. Agência Embrapa de Informação Tecnológica: Arroz e Feijão. Disponível em: <http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/arroz/arvore/CONT000g1wcnzza02wx5ok0ha2lipwbeel46.html> Acesso em: 02 de maio de 2014.

Esteves, F. de A. Fundamentos de limnologia. 2ª ed. Rio de Janeiro: Interciência, 1998. 602 p.

Farahani G. H. N., Sahid, I.B., Zakaria, Z., Kuntom, A., Omar, D., 2008. Study on the downward movement of carbofuran in two malaysian soils. Bull Environ Contam Toxicol 81, 294–298.

Fukuto, T. R., 1990. Mechanism of action of organophosphorus and carbamate insecticides. Environ. Health Perspect. 87, 245–254.

Galhano, V., Santos, H., Oliveira, M.M., Gomes-Laranjo, J., Peixoto, F., 2011 a. Changes in fatty acid profile and antioxidant systems in a *Nostoc muscorum* strain exposed to the herbicide bentazon. *Process Biochem.* 46, 2152-2162.

Galhano, V.M.M., Gomes-Laranjo, J., Peixoto, F., 2011 b. Exposure of the cyanobacterium *Nostoc muscorum* from Portuguese rice fields to Molinate (Ordram®): Effects on the antioxidant system and fatty acid profile. *Aquat. Toxicol.* 101, 367–376.

Grützmacher, D. D., Grützmacher, A. D., Agostinetto, D., Loeck, A. E., Roman, R., Peixoto, S. C., Zanella, R. 2008. Monitoramento de agrotóxicos em dois mananciais hídricos no sul do Brasil. *Rev. Bras. Eng. Agric. e Ambient.* 12, 632–637.

Hammouda, O., 1999. Response of the paddy field cyanobacterium *Anabaena doliolum* to carbofuran. *Ecotoxicol Environ Saf.* 44, 215–219.

Hernández-Moreno, D., Soler-Rodríguez, F., Míguez-Santiyan, M.P., Pérez-López, M., 2008. Hepatic mono oxygenase (CYP1A and CYP3A) and UDPGT enzymatic activities as biomarkers for long-term carbofuran exposure in tench (*Tinca tinca* L.). *J. Environ. Sci. Health Part B* 43, 395–404.

Hernández-Moreno, D., Pérez-López, M., Soler, F., Gravato, C., Guilhermino, L., 2011. Effects of carbofuran on the sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.): Study of biomarkers and behavior alterations. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 74, 1905–1912.

Jiang, J., Zhang, R., Li, R., Gu, J.D., Li, S., 2007. Simultaneous biodegradation of methyl parathion and carbofuran by a genetically engineered microorganism constructed by mini-Tn5 transposon. *Biodegradation.* 18, 403–412.

Kale, S. P., Murthy, N.B.K., 2001. Degradation of ¹⁴C-carbofuran in soil using a continuous flow system. *Chemosphere* 44, 893-895.

Klaassen, C. D., 2008. Casarett and Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons. New York: McGraw Hill Professional. 7th edition. 1236 pp.

Kotchoni, S. O., Gachomo, E. W., 2006. The reactive oxygen species network pathways: an essential prerequisite for perception of pathogen attack and the acquired disease resistance in plants. *J. Biosci.* 31, 389-404.

Lage, O., Sansonetty, M., F., O'Connor, J. E., Parente, A. M. 2001. Flow cytometry analysis of chronic and acute toxicity of copper(II) on the marine dinoflagellate *Amphidinium carterae*. *Cytometry* 44:226–235.

Lalah, J.O., Wandiga, S.O., 1996. Adsorption/desorption and mobility of carbofuran in soil sample from Kenya. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 56, 575–583.

Lu, L. A., Ma, Y.S., Kumar, M., Lin, J.G., 2011. Photochemical degradation of carbofuran and elucidation of removal mechanism. *Chem. Eng. J.* 166, 150-156.

Ma, J., Xu, L., Wang, S., Zheng, R., Jin, S., Huang, S., Huang, Y., 2002. Toxicity of 40 herbicides to the green alga *Chlorella vulgaris*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 51,128-132.

Macedo, R.S., Lombardi, A.T., Omachi, C.Y., Rörig, L.R., 2008. Effects of the herbicide bentazon on growth and photosystem II maximum quantum yield of the marine diatom *Skeletonema costatum*. *Toxicol. in Vitro* 22, 716–722.

Megharaj, M., Pearson H.W., Venkateswarlu K., 1993. Toxicity of carbofuran to soil isolates of *Chlorella vulgaris*, *Nostoc linckia* and *N. muscorum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 39,644–648.

Nõges, P., Mischke, U., Laugaste, R., Solimini, A. G., 2010. Analysis of changes over 44 years in the phytoplankton of Lake Võrtsjärv (Estonia): the effect of nutrients, climate and the investigator on phytoplankton-based water quality indices. *Hydrobiologia* 646, 33-48.

Okamoto, O.K., Pinto, E., Latorre, L.R., Bechara, E.J.H., Colepicolo, P., 2001. Antioxidant modulation in response to metal-induced oxidative stress in algal chloroplasts. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 40, 18–24.

Pinheiro, A., Silva, M. R., Kraisch, R., 2010. Presença de pesticidas em águas superficiais e subterrâneas na bacia do Itajaí, SC. *Rega*, v.7, n.2, p.17-26, 2010.

- Pitzschke, A., Djamei, A., Bitton, F., Hirt, H., 2009. A major role of the MEKK1–MKK1/2–MPK4 pathway in ROS signaling. *Mol. Plant* 2, 120–137 .
- Pretty, J., 2008. Agricultural sustainability: concepts, principles and evidence. *Philos. T. Roy. Soc. B.* 363, 447-465.
- Rai, D. K., Sharma, B., 2007 .Carbofuran-Induced Oxidative Stress in Mammalian Brain. *Mol. Biotechnol.* 37:66–71
- Ramanand, K., Sharmila, M., Singh, N., Sethunathan, N., 1991. Metabolism of carbamate insecticides by resting cells and cell-free preparations of a soil bacterium, *Arthrobacter* sp. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 46, 380–386.
- Rang, H. P., Dale, M. M., Ritter, J. M., 1999. *Farmacologia*. 4a edição. Editora Guanabara Koogan. Rio de Janeiro, RJ., 703 pp.
- Romero, D. M., Molina M.C.R., Juárez, A., 2011. Oxidative stress induced by a commercial glyphosate formulation in a tolerant strain of *Chlorella kessleri*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 74,741–747.
- Sabatini, S. E., Juárez, A. B., Eppis, M. R., Bianchi, L., Luquet, C. M., Molina, M. C. R., 2009. Oxidative stress and antioxidant defenses in two green microalgae exposed to copper. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 72, 1200–1206.
- Sethunathan, N., Megharaj, M.M., Chen, Z. L., Williams, B. D., Lewis , G., Naidu, R., 2004. Algal Degradation of a Known Endocrine Disrupting Insecticide, r-Endosulfan, and Its Metabolite, Endosulfan Sulfate, in Liquid Medium and Soil. *J. Agric. Food Chem.* 52, 3030-3035.
- Silva, D. R.O, Avila, L.A., Agostinetto, D. Magro, T. D., Oliveira, Zanella, R., Noldin, J. A., 2009. Monitoramento de agrotóxicos em águas superficiais de regiões orizícolas no sul do Brasil. *Cienc. Rural.*39, 2383-2389.
- Singh, D. K., 2008. Biodegradation and bioremediation of pesticide in soil: concept, method and recent developments. *Indian J. Microbiol.* 48,35–40.

Sociedade Sul Brasileira de Arroz Irrigado - SOSBAI. Arroz irrigado: Recomendações Técnicas da Pesquisa para o Sul do Brasil. Pelotas: SOSBAI, Embrapa Clima Temperado, 2010. 161 p.

Tan, D. X., Hardeland, R., Manchester, L. C., Korkmaz, A., Ma, S., Rosales Corral, S., Reiter, R. J., 2012. Functional roles of melatonin in plants, and perspectives in nutritional and agricultural science. *J. Exp. Bot.* 63, 577-597.

Tariq, M.I., Afzal, S., Hussain, I., 2006. Degradation and persistence of cotton pesticides in sandy loam soils from Punjab, Pakistan. *Environ. Res.* 100, 184-196.

Van den Brink, P. J., Ter Braak, C. J. F., 1999. Principal response curves: analysis of time-dependent multivariate responses of a biological community to stress. *Environ. Toxicol. Chem.* 18, 138-148.

Viarengo, A., Burlando, B., Cavaletto, M., 1999. Role of metallothionein against oxidative stress in the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Am. J. Physiol-R.E.G. I.* 277, 1612-1619.

Vidotti, E. C., Rollemberg, M.C. E. Algas: da economia nos ambientes aquáticos à bioremediação e à química analítica. *Quím. Nova.* 27, 139- 145.

Wei, Y.Y., Zheng, Q., Liu, Z.P., Yang, Z.M., 2011. Regulation of tolerance of *Chlamydomonas reinhardtii* to heavy metal toxicity by heme oxygenase-1 and carbon monoxide. *Plant Cell Physiol.* 52, 1665-1675.

Yen, J.H., Hsiao, F.L., Wang, Y.S., 1997. Assessment of the insecticide carbofuran's potential to contaminate groundwater through soils in the subtropics. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 38, 260-265.

Zhang, S., Qiu, C. B., Zhou, Y., Jin, Z.P., Yang, H., 2011. Bioaccumulation and degradation of pesticide fluroxypyr are associated with toxic tolerance in green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Ecotoxicology* 20,337–347.

Zuppini A., Andreoli C., Baldan B., 2007. Heat stress: an inducer of programmed cell death in *Chlorella saccharophila*. *Plant Cell Physiol.* 48, 1000–1009.

6- CAPÍTULO 1

Efficiency of Neutral Red, Evans Blue and MTT to assess viability of the freshwater microalgae *Desmodesmus communis* and *Pediastrum boryanum*

(Manuscrito – short communication - submetido à Journal of Plaknton Reserach)

Efficiency of Neutral Red, Evans Blue and MTT to assess viability of the freshwater microalgae *Desmodesmus communis* and *Pediastrum boryanum* (Chlorophyceae)

Da Luz, D.S.^a, Da Silva, D.G.^b, Souza, M.M.^{a,b}, Giroldo, D.^{a,b}, Martins, C.M.G.^{a,b}

^a Programa de Pós-Graduação em Biologia de Ambientes Aquáticos Continentais, Universidade Federal do Rio Grande – FURG, Rio Grande / RS, Brazil

^b Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Rio Grande – FURG, Rio Grande / RS, Brazil

Da Luz, D.S., Biol.: dani_saul@hotmail.com

Souza, M.M., PhD.: martasouza@furg.br

Da Silva, D.G., Tec: danielegdasilva@hotmail.com

Giroldo, D., PhD.: dmbgirol@furg.br

Martins, C.M.G., PhD.: camilaos@hotmail.com

Corresponding author: Camila De Martinez Gaspar Martins
Universidade Federal do Rio Grande - FURG
Instituto de Ciências Biológicas
Av. Itália km 8 – Campus Carreiros
96.203-900 – Rio Grande – RS – Brazil
Phone: + 55 53 393-5162
FAX: + 55 53 3233-6848
E-mail: camilaos@hotmail.com

ABSTRACT

This study assessed the usefulness of cell viability techniques - MTT, Evans Blue (EB) and Neutral Red (NR) - for two freshwater microalgae species, *Desmodesmus communis* and *Pediastrum boryanum*, exposed to a glyphosate-based herbicide. Our results showed that the EB is inadequate to measure cell viability in both species, whilst MTT and NR showed significant results to the decreased cellular viability for both algae. However, NR proved to be more sensitive than MTT for these algae.

KEY WORDS: Cell viability, microalgae, glyphosate

Phytoplankton constitutes the base of the trophic web in aquatic environments and any modification in their structure can seriously impact the aquatic biota (Campanella et al., 2000). To access the effects of pollutants in phytoplankton community, most of studies are based on algae growth tests, and they do not consider cell viability in the cultures as a measurement of toxicity, especially for freshwater microalgae (e.g. Ma et al, 2002; Tsui and Chu, 2003). Analyses of cell viability are rapid methods that show the proportion between metabolic active and non-active cells in a cell culture. Thus, by means of a cell viability test is possible to measure the toxic effect of pollutants and compare the sensitivity among organisms to a specific stressor (Lee and Rhee, 1997).

Concerning techniques used to determine cell viability; MTT, Neutral Red (NR) and Evans Blue (EB) are usual, feasible and well accepted in laboratories of animal cytology (Stockert et al., 2012). They provide cell viability within different cellular target. MTT consists in a yellow soluble dye which, when reduced by present in the metabolic active cells, become a blue-violet insoluble product called formazan crystals, which can be extracted by organic solvents as the DMSO and estimated by spectrophotometry (Freshney, 2010). Consequently, the total amount of formazan crystals is directly proportional to the number of metabolic active cells in a culture (Van Meerloo et al., 2011). On the other hand, Neutral Red (NR) (3-amino-7-dimethylamino-2-methylphenazine hydrochloride) is a weak cationic dye soluble in water that passes across the intact plasmatic membrane of animal cells and concentrates into the lysosomes of the viable cells. Agents that damage the surface of cells and their lysosomal membranes inhibit the incorporation of the red dye (Triglia et al., 1991). In plants and algae cells, the red dye is stored in the cytoplasm and/or in the vacuoles of viable cells (Crippen and Perrier, 1974; Zetsche and Meysman, 2012). Evans Blue (EB) has the cell membrane as target. It is an impermeable dye to the living cells membrane, but capable of penetrate into the dead and/or damaged cells which become blue. Thus, it seems that for algae, both NR and EB evaluate cell viability based on cell membrane integrity. In the NR method, red-stained cells are considered viable, while in the EB method, blue-stained cells are considered non-viable.

However, the application of these assays to access microalgae viability is controversy and data in literature are available mainly for marine ones. Therefore, the goal of this work was to analyze comparatively the three techniques: MTT, NR and EB in two different freshwater microalgae species *Desmodesmus communis* and *Pediastrum boryanum* (Chlorophyceae), which are cosmopolitan and characteristic of eutroficated environments (Bicudo and Menezes, 2006). For the tests, we used the herbicide Roundup Transorb[®], a glyphosate-based formulation widely used in agriculture, as a toxic of reference. Glyphosate's mode of action is the inhibition of the enzyme 5-enolpiruvoil-shikimato-3-fosfato sintetase (EPSPS) (Williams et al., 2000) responsible for plant growth. Besides, this herbicide can cause the disruption of the algae's chloroplasts, membranes, and

cell walls, as well as act on biochemical processes, leading to alterations in the photosynthesis and respiration of these organisms (Pérez et al., 2007).

Microalgae *D. communis* and *P. boryanum* were collected in lakes located in Southern Brazil at Universidade Federal do Rio Grande, Brazil (32°04'23" S / 52°09'55" W) and at Merin Lagoon (32°52'44" S / 52°46'04" W, respectively). They were isolated under microscope and kept in axenic cultures in WC/2 media (Guillard and Lorenzen, 1972) at 100 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ and $23 \pm 1^\circ\text{C}$ in a dark:light cycle of 12:12 h, at the Continental Microalgae Culture Collection from Universidade Federal do Rio Grande, Brazil. At the exponential growth phase, an aliquot (30 mL) of each microalgae species was centrifuged (20 min, 3000 g) and the algae-pellets were suspended in 1 mL of WC/2 (n=9), reaching the concentration of 542,275 cel mL⁻¹ (standard error \pm 5,395) for *P. boryanum* and 583,561 cel mL⁻¹ (standard error \pm 9,336) for *D. communis*, counted in Neubauer hemocytometer. Each 1 mL suspension were divided in 3 aliquots of 330 μL , and after centrifugation (20 min, 3000 g), two of them were resuspended to the same volume of media containing 30 or 150 μM of glyphosate in the Roundup Transorb[®] formulation (n=9), and the third aliquot of microalgae was resuspended in WC/2 without herbicide as a control (n=9). Roundup Transorb[®] is made by 64.8 % of isopropilamine (IPA) salt of glyphosate. Preparations were incubated for 24 h at the equal environmental conditions of the microalgae culture and then viability was assessed by MTT, EB and NR.

For MTT test, the microalgae (100 μL of 330 μL suspension) were distributed (in duplicate) in 96-well plates, centrifuged (20 min, 3000 g), supernatant was discarded, and the pellets were resuspended in 20 μL of MTT and 180 μL of WC/2 media (n=9 for each treatment). After 3 h of incubation at 23° C in dark conditions, the samples in the microplate were centrifuged again (20 min, 3000 g), the pellets were resuspended once again in 200 μL of DMSO and the absorbance was recorded at 550 nm (Li and Song, 2007).

Viability assessment with the vital dyes NR and EB was performed using the 50 μL of 330 μL suspension (n=9) for each technique. The microalgae (50 μL) were centrifuged (20 min, 3000 g) and pellets from each treatment (control, 30 and 150 μM of glyphosate) were suspended in 10 μL of 0,05% (w/v) Evans Blue solution (Morera and Villanueva, 2009) or 10% (w/v) of Neutral Red (Zetsche and Meysman, 2011) prepared in the WC/2 medium. Also, samples of 30 μL of each 330 μL suspension (n=9), was centrifuged (20 min, 3000 g) and pellets suspended just in 10 μL of WC/2 medium without stains. Cells with and without dyes were incubated for 2 h at 23°C. Observations were taken under a transmitted light microscope (CX41F Olympus, Tokyo, Japan) and cell viability was scored by counting live cells versus dead ones (red-stained cells as viable in the NR method and blue-stained cells as non-viable in the EB method). Likewise, cells without dyes were counted, and green microalgae were considered as viable while translucent were considered as

non-viable. All counts were analyzed in triplicate. The ratio of non-viable cells to total cell numbers reflects culture viability. Data were expressed by mean \pm standard error. Comparisons between treatments were subjected to analysis of variance ANOVA-one way followed by Tukey test and comparisons between algae subjected to Student's t-test. The significance level adopted was 95%. All reagents were purchased from Sigma-Aldrich.

Amongst the assays tested here, the EB is not recommended for both *D. communis* and *P. boryanum*, since it was difficult to visualize blue-stained cells because the weak pigmentation in the few cells that were blue (data not shown). Even doubling time of incubation and concentration of the EB dye in the media twice, this technique did not work properly. Perhaps, the complexity of the cell wall (presence of higher resistant non-hydrolyzable aliphatic biopolymers) and its thickness impeded the blue dye to seep into the dead microalgae, overestimating the number of viable cells (Blokker et al., 1998). Li and Song (2007) also found that EB overestimated viability of the heat-treated cyanobacteria *Microcystis aeruginosa*. The counting of cells without dyes also seems to overvalue the number of viable cells. In fact, no translucent cells were found after glyphosate exposure, indicating that 100 % of the algae were alive by the traditional counting of algae without any colorant.

Contrary to the results from Imase et al. (2013) for the freshwater microalgae *Chlorella sorokiniana*, we could clearly observe cells with or without the red dye (Fig. 1). Therefore, the NR seems to be an effective method for detection of cytotoxicity in *P. boryanum* and *D. communis* (Fig. 1A and 1B, respectively). Similar results were obtained by Zetsche and Meysmam (2012) for marine plankton. Even when microalgae did not show signs of mortality, like cell rupture or decomposing, they remained unstained, reducing the potential of false positives results as it was observed for EB technique or in the counting of cells deprived of treatment with dyes.

The techniques of MTT and NR showed a significant decrease in *P. boryanum* and *D. communis* viability following 24 h of glyphosate exposure (Fig. 2A and 2B, respectively). Figure 2A shows that viability of *P. boryanum* decreased inversely to the glyphosate concentration in the medium. However, the assays presented differences: at 30 μ M of glyphosate, 20 % of cells were healthy in the MTT method while only 5 % were alive in the NR; and at 150 μ M, 14 % were viable in the MTT, but only 1.7 % were viable according to the NR test. For the algae *D. communis*, cell viability declined significantly (57 %) only in the highest concentration of glyphosate according to the MTT test, but the NR method exhibited a significant decrease in the two concentrations (2 and 1 % of viability in the 30 and 150 μ M of glyphosate, respectively) (Fig. 2B). These differences indicate that NR is a more sensitive test when compared to MTT, especially for the *D. communis*. Perhaps, the record made at 550 nm in the MTT test was not influenced only by the blue-violet formazan crystal, but also by autofluorescence of the microalgae tested. Dobbs and Tang (2007)

drew attention to the fact that Green autofluorescence (GAF) can disturb some methods that use readings in the green spectrum. In addition, GAF intensity increases with time following cell death and also fixation. The authors tested the same genus used in this work (*Pediastrum* and *Desmodesmus*) and identified GAF in both. Thus, since our method uses the wavelength that is within the reading range of GAF (520-554 nm), it is possible that there was some interference by fluorescence, influencing our results of viability as an overestimate reading (a greater green fluorescence is produced after cell death masking the drop in viability of the sample). It is noteworthy that formazan crystals in these algae are not easily visualized, making impossible to measure them by microscopy. Therefore, colorimetric method can be the best way to analyze MTT results (Li and Song, 2007).

Confronting results from NR assay for both species, *D. communis* was more sensitive to glyphosate than *P. boryanum* and this difference was significant only when they were exposed to 30 μ M of herbicide (Fig. 3). Because of the complexity of cell wall of *D. communis* in comparison to the *P. boryanum* (Barsanti and Gualtieri, 2006) we expected *D. communis* to be more tolerant, but our results do not show that, suggesting that cell wall is not essentially related to sensitivity or tolerance of a microalgae for glyphosate.

In summary, although MTT assay was less sensitive when compared to NR, both techniques are useful methods to analyze *D. communis* and *P. boryanum* viability quickly, and these can be considered as tools for toxicity measurement for freshwater microalgae. Furthermore, it is important to consider the cellular target of each technique to choose the best one, having in mind the toxic action mode, despite we have not considered mode of action of glyphosate in this work.

ACKNOWLEDGEMENT

We wish to thank Robert Boyle (Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, RS, Brazil) for helpful with cell pictures. This study was financially supported by the FAPERGS from Brazil in the scope of PRONEX (Programa de Apoio a Núcleos de Excelência). Daniéli Saul da Luz is a graduate fellow from the Brazilian CAPES.

REFERENCES

Barsanti, L. and Gualtieri, P. (2006) *Algae: Anatomy, Biochemistry and Biotechnology*. CRC press, Taylor & Francis Group. Boca Raton, London. pp. 320.

Blokker, P., Schouten, S., Van den Ende, H., *et al.* (1998) Chemical structure of algaenans from the fresh water algae *Tetraedron minimum*, *Scenedesmus communis* and *Pediastrum boryanum*. *Org. Geochem.*, **29**, 1453–1468.

Campanella, L., Cubadda, F., Sammartino, P., *et al.* (2000) An algal biosensor for the monitoring of water toxicity in estuarine environments. *Water Res.*, **35**, 69–76.

Crippen, R. W. and Perrier, J. L. (1974) The use of neutral red and Evans blue for live-dead determinations of marine plankton (with comments on the use of rotenone for inhibition of grazing). *Biotech. Histochem.*, **49**, 97–104.

Freshney, R.I. (2005) *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique and Specialized Applications*. John Wiley and Sons, 5^a ed. New York.

Guillard, R. R. L. and Lorenzen, C. J. (1972) Yellow-green algae with chlorophyllide c. *J. Phycol.*, **8**, 10–14.

Imase, M., Ohko, Y., Takeuchi, M. *et al.* (2013) Estimating the viability of *Chlorella* exposed to oxidative stresses based around photocatalysis. *Int. Biodeter. Biodegr.*, **78**, 1–6.

Lee, D. Y., and Rhee, G. Y. (1997) Kinetics of cell death in the cyanobacterium *Anabaena flos-aquae* and the production of dissolved organic carbon. *J. Phycol.*, **33**, 991–998.

Li, J. and Song, L. (2007) Applicability of the MTT assay for measuring viability of cyanobacteria and algae, specifically for *Microcystis aeruginosa* (Chroococcales, Cyanobacteria). *Phycologia*, **46**, 593–599.

Ma, J., Xu, L., Wang, S., *et al.* (2002) Toxicity of 40 herbicides to the green alga *Chlorella vulgaris*. *Ecotox. Environ. Safe.*, **51**, 128–132.

Morera, C. and Villanueva, M. A. (2009) Heat treatment and viability assessment by Evans blue in cultured *Symbiodinium kawagutii* cells. *World. J. Microbiol. Biotechnol.*, **25**, 1125–1128.

Pérez, G. L.; Torremorell, A.; Mugni, H. *et al.* (2007) Effects of the herbicide roundup on freshwater microbial communities: a mesocosm study. *Ecol. Appl.*, **17**, 2310–2322.

Stockert, J. C., Blázquez-Castro, A., Cañete, M., *et al.* (2012) MTT assay for cell viability: Intracellular localization of the formazan product is in lipid droplets. *Acta Histochem.*, **114**, 785–796.

Tang, Y. Z. and Dobbs, F. C. (2007) Green autofluorescence in dinoflagellates, diatoms, and other microalgae and its implications for vital staining and morphological studies. *Appl. Environ. Microb.*, **73**, 2306–2313.

Triglia, D., Braa, S. S., Yonan, C. *et al.* (1991) In vitro toxicity of various classes of test agents using the neutral red assay on a human three-dimensional physiologic skin model. *In Vitro Cell. Dev. Biol.*, **27A**, 239–244.

Tsui, M. T. K. and Chu, L. M. (2003) Aquatic toxicity of glyphosate-based formulations: comparison between different organisms and the effects of environmental factors. *Chemosphere*, **52**, 1189–1197.

Van Meerloo, J., Kaspers, G.J., Cloos J. (2011) Cell sensitivity assays: the MTT assay. *Methods Mol. Biol.*, **731**, 237–45.

Williams, G.M., Kroes, R., Munro, I.C. (2000) Safety evaluation and risk assessment of the herbicide Roundup and its active ingredients, glyphosate, for humans. *Regul. Toxicol. Pharm.*, **31**, 117–165.

Zetsche, E. M. and Meysman, F. J. R. (2012) Dead or alive? Viability assessment of micro- and mesoplankton. *J. Plankton Res.*, **34**, 493–509.

FIGURE LEGENDS

Fig. 1- *P. boryanum* (A) and *D. communis* (B) stained with NR. Pictures were taken with inverted microscope Olympus IX81 (objective magnification 63x).

Fig. 2- Cell viability results by MTT and NR for *P. boryanum* (A) and *D. communis* (B). Data are presented as mean percentage \pm standard error. The different letters denote significant differences among the treatments and (*) indicate significant differences between the techniques tested.

Fig. 3- Cell viability NR results comparing *P. boryanum* and *D. communis*. Data are presented as mean percentage \pm standard error. (*) Indicate significant differences between the microalgae.

FIGURES

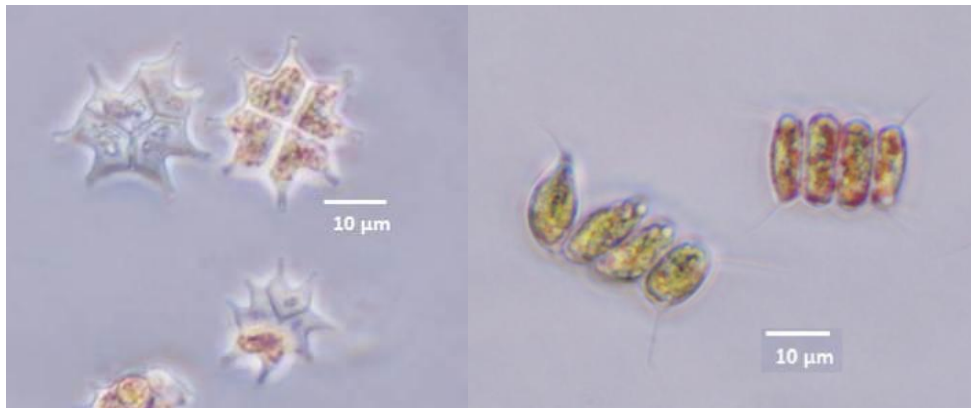


Figure 1

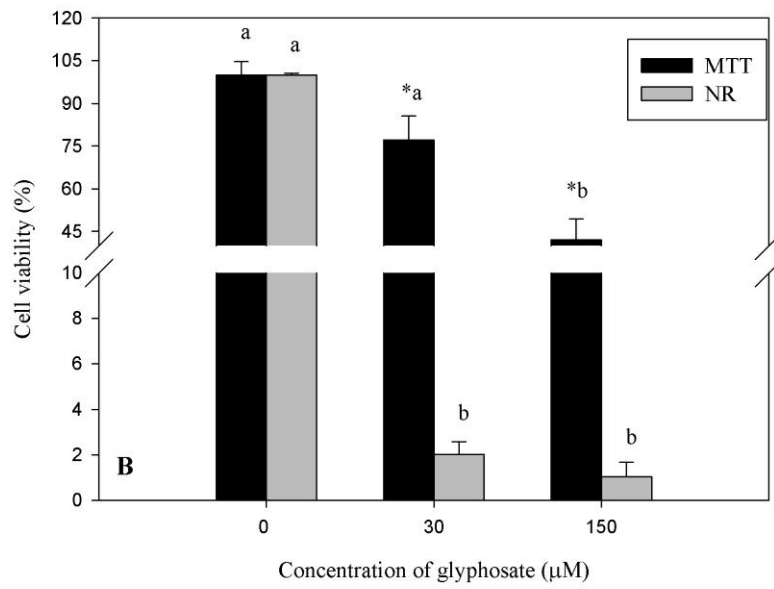
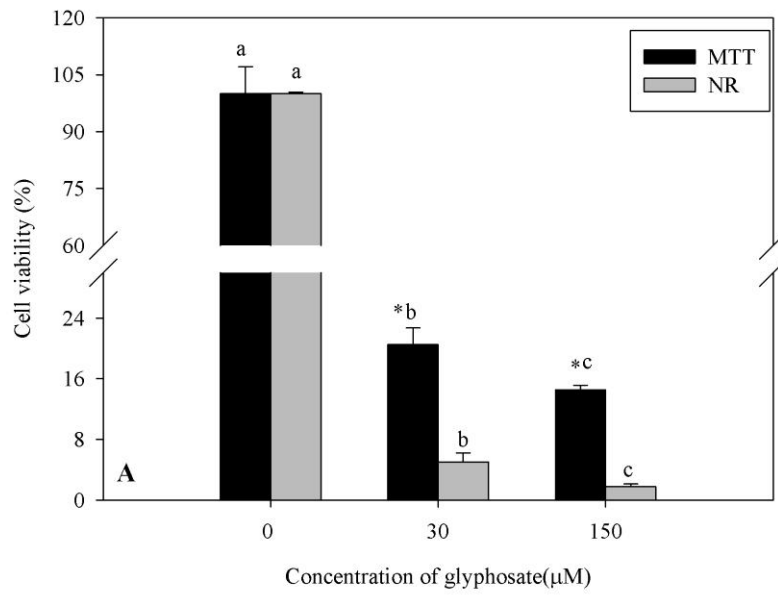


Figure 2

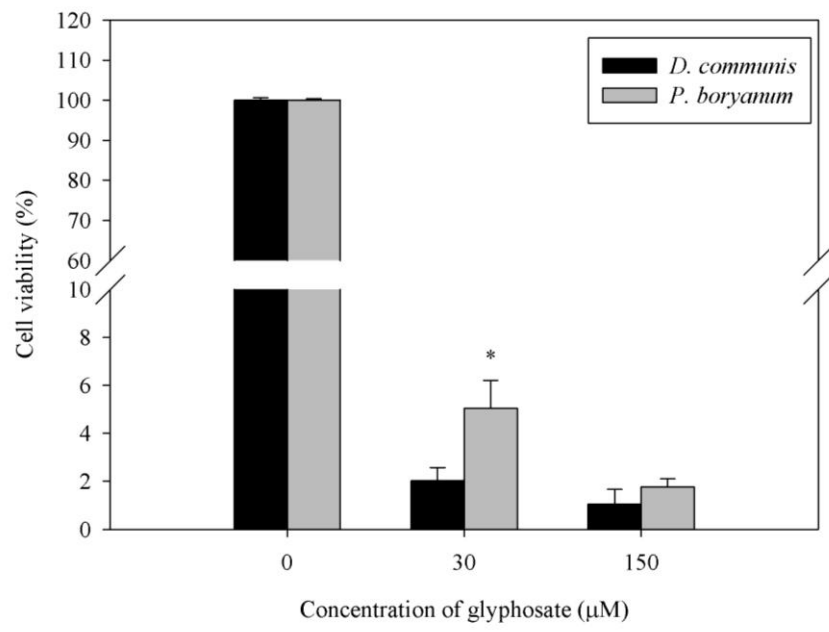


Figure 3

6.1- NORMAS DA REVISTA JOURNAL OF PLANKTON RESEARCH

PREPARATION OF MANUSCRIPTS

Scope of the Journal *Journal of Plankton Research* publishes innovative papers that significantly advance the field of plankton research. All kinds of marine, brackish and freshwater plankton are considered: viruses, bacteria, fungi, phytoplankton and zooplankton, including meroplankton and ichthyoplankton. The main topics covered are:

- plankton ecology and behaviour, including model studies
- plankton physiology, including experimental results
- genetics and taxonomy of planktonic organisms
- biological properties and content of natural waters as they impinge directly on plankton physiology and ecology
- development and testing of new methods for plankton research

Hypothesis-driven work is particularly welcomed; purely descriptive papers will generally not be considered. Investigations carried out using interdisciplinary methods are encouraged.

Categories of papers The *Journal of Plankton Research* publishes papers in each of the following five categories:

- **Original articles**- traditional research papers. Text not normally exceeding 7000 words. Max. **12 printed pages** inclusive of text, appropriate references, figs, and tables.
- **Short communications** – these should not exceed **2000 words** of text (excl. references and figures), **3 figures or tables**, and **20 references**. The method, results and discussion should all be presented in a single, untitled section. Include a short Abstract (**max. 75 words**) and present the acknowledgements and references as in a full-length paper. Max. **5 printed pages** inclusive of text, appropriate references, figs, and tables.
- **Horizons articles** - topical and provocative reviews; Manuscripts for consideration should be short, approximately 2500 words. Max. **8 printed pages** inclusive of text, appropriate references, figs, and tables.
- **Review articles**- more comprehensive reviews on topics of wide general interest within plankton research. Potential authors are advised to contact the Editor regarding topic and proposed length.
- **Responses** - comments on, or replies to published papers, particularly Horizons articles, within 6 months of appearance in the Journal of Plankton Research; approximately 500 words. Max. **2 printed pages**.

General Format of Submitted Manuscripts

- Manuscripts should occupy not more than the page limit for the manuscript category including text, all tables and figures. The Editor-in-Chief should be consulted prior to submission if this limit cannot be achieved

- Number each page to enable reviewers to refer to items in the manuscript easily.
- Use 1.5 line spacing with a 2 cm margin on all sides of the text.
- The text should be Times New Roman font size 12 (except if required within tables where size 10 may be used).
- Avoid footnotes.
- Use 'L' for litre (eg mL), not 'l'
- Nutrient concentrations should be reported as molar (not mass; i.e. μM nitrate (not μg nitrate- N L^{-1})
- Avoid use of 'reduce' (opposite of oxidise) except when for chemical usage.
- Use 'autumn' not fall.
- Identify sampling locations by latitude, longitude and by country as appropriate.
- Check the PDF for the clear reproduction of figures, special symbols and Greek letters.
- Differentiate between the letter O and zero, and the letters I and l and the number 1.

Title, abstract, and key words

Please pay particular attention to providing an accurate and informative title, abstract and key words. For online bibliographic searching these have a key role in drawing the attention of potential readers to your paper. The Abstract should be self-contained including, background to the study, significance and principle findings, and conclusions and wider significance.

References

Authors are responsible for the accuracy of the References. Published articles and those in press (state the journal which has accepted them) may be included.

If you use EndNote and/or Reference Manager to facilitate referencing citations (not required for submission), this journal's style is available for use.

In the text a reference should be cited by author and date as:

...experiments by Author (Author, 1989) have demonstrated...,

'or'

...as reported earlier (Author and Author, 1985; Author et al., 1998)...

Do **NOT** place text other than the author and date within the parentheses. No more than two authors may be cited per reference; if there are more than two authors use et al. If in doubt, please consult the most recent issue of the Journal.

Reference Citation:

At the end of the manuscript the citations should be typed in alphabetical order by first author's surname followed by initials. References should include, in the following order:

- Authors' names

- Year
- Paper title
- Journal title
- Volume number and inclusive page numbers

The name of the journal should be abbreviated according to the World List of Scientific Periodicals. Book references should also include the editors and the name and address of the publisher.

Some examples:

Langeland, A. and Rognerud, S. (1974) Statistical analyses used in the comparison of three methods of freshwater zooplankton sampling. *Arch. Hydrobiol.*, **3**, 403--410.

Russell, F. A. and Yonge, M. (eds) (1976) *Advances in Marine Biology*. Vol. 13. Academic Press, London.

Schimizu, I. (1978) Dinoflagellate toxins. In Scheuer, D. J. (ed.), *Marine Natural Products, Chemical and Biological Perspectives*. Vol. 1. Academic Press, London, pp. 1--42.

Personal communications should cite the name and location of the author (J. Smith, Sydney, personal communication) and unpublished data should be cited as '(unpublished data)'. Both should be used as sparingly as possible.

Reference citation checklist

- Year of publication should appear in brackets
- Journal name must be appropriately abbreviated (see World List of Scientific Periodicals)
- Journal name must be in italics
- Journal volume number must be in bold
- Do not include journal issue numbers
- Use comma, not colon to separate volume number from page range
- Use a semi-colon rather than comma to separate reference citations within the text - (Harris, 2009; Harris, 2010) rather than (Harris, 2009, Harris, 2010)

Legends for Tables and Figures

These should be listed on a separate, numbered page of the manuscript (or several pages if needed) after the References. Define all symbols and abbreviations used in the figure unless these are defined within the figure itself. Common abbreviations and those defined in the preceding text need not be redefined in the legend.

Tables

Tables should be typed on separate pages and numbered consecutively with Roman numerals. They should be self-explanatory and include a brief descriptive title. They should be of such a size that, when typeset, they will easily fit onto a Journal page, the type area of which is 220 (height) x 164 mm (width).

Footnotes to tables indicated by lower case letters are acceptable, but they should not include extensive experimental detail.

Figures

All illustrations (line drawings and photographs) should be referred as 'Fig. 1' throughout text and legends.

Electronic illustrations submitted to the Journal must:

- use Adobe Postscript fonts, not TrueType or system 'bitmap' fonts
- be converted to grayscale or bitmap mode if originally in colour but are to be reproduced in black and white
- have any unnecessary white space cropped from around the outside of the image if the file is a .tif file.
- each be saved in a separate file. If a figure has multiple parts (e.g., Fig. 1A, Fig. 1B) all parts should be saved into one file arranged as the author wishes them to appear in the final publication
- have a resolution of 600 dpi for line figures, and 300 dpi for half tones) for publication, saved as .tif, .jpg, .gif, .bmp, .eps, Word (or .rtf) or PowerPoint files
- if they are to be reproduced in colour, be in CMYK, not RGB mode, and saved at 300 dpi
- always use the latest version of the software program available. Files from older versions often lose integrity when opened in newer versions.

Line Figures

Line figures should be the size intended for publication (maximum dimensions 220 x 164 mm including legends), with uniform lettering style which is in proportion with the overall dimensions of the drawing. All lines, letters and symbols should be black: grey does not reproduce on printing. No additional artwork, re-drawing or typesetting will be done. Scale bars, where appropriate, should be included within the figure, not in the legend.

Photographs

Photographs must be submitted for printing in the desired final size so that reduction can be avoided. Photographs, including their legends, must not exceed 220 x 164 mm. Photographs should be of sufficiently high quality with respect to detail, contrast and fineness of grain to withstand the inevitable loss of contrast and detail inherent in the printing process. Please indicate the magnification by a rule on the photograph. Do not state the magnification in the legend: it may be necessary to change photographs slightly to improve the layout of the paper.

Colour Figures

Colour illustrations are accepted, but will incur a charge of **£350** per figure. Illustrations for which colour is not essential can be reproduced in black and white in the print Journal and, additionally, in colour as online Supplementary Data. This option is not subject to colour charges. Authors should indicate clearly that they would like to take up this option in their original submission.

Colour Figures as Supplementary Data

Illustrations for which colour is not essential can be made available online as Supplementary data, linked to the online manuscript. The availability of additional colour images as Supplementary Data should be mentioned where relevant in the main text of the manuscript.

Process. Authors should indicate clearly that they would like to take up this option in their original submission. Colour figures for online-only reproduction must be submitted at the same time as the main manuscript. They cannot be altered or replaced after the paper has been accepted for

publication. The figures must be identical to those reproduced in the print journal, but for the addition of colour.

Conventions

In general, the Journal follows the conventions of the CBE Style Manual (Council of Biology Editors, Bethesda, MD, 1983, 5th edn). Follow Chemical Abstracts and its indexes for chemical names. For guidance in the use of biochemical terminology follow the recommendations issued by the IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature, as given in *Biochemical Nomenclature and Related Documents*, published by the Biochemical Society, UK. For enzymes use the recommended name assigned by the IUPAC-IUB Commission on the Biochemical Nomenclature, 1978, as given in *Enzyme Nomenclature*, published by Academic Press, New York, 1980. Where possible, use the recommended SI (Système International) units. Genotypes should be italicized (underline in typed copy): phenotypes should not be italicized. For bacterial genetics nomenclature follow Demerec *et al.* (1966) *Genetics*, **54**, 61-76.

Abbreviations

Try to restrict the use of abbreviations to SI symbols and those recommended by the IUPAC-IUB. Abbreviations should be defined in brackets after their first mention in the text. Standard units of measurements and chemical symbols of elements may be used without definition in the body of the paper.

Chemical formulae and mathematical equations

Wherever possible, write mathematical equations and chemical formulae on a single line. Submit complicated chemical structures as artwork.

7- CAPÍTULO 2

**Efeitos da Exposição ao Pesticida Carbofurano em duas Espécies de Microalgas
(*Desmodesmus communis* e *Pediastrum boryanum*) e sua Capacidade de Biorremediação**

(Manuscrito a ser submetido para a revista Aquatic Toxicology)

Efeitos da Exposição ao Pesticida Carbofurano em duas Espécies de Microalgas (*Desmodesmus communis* e *Pediastrum boryanum*) e sua Capacidade de Biorremediação

Da Luz, D.S.^a, Primel, E.^b, Giroldo, D.^a, Martins, C.M.G.^a

^a Instituto de Ciências Biológicas - Programa de Pós-Graduação em Biologia de Ambientes Aquáticos Continentais, Universidade Federal do Rio Grande – FURG, Rio Grande / RS, Brazil

^b Escola de Química e Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande – FURG, Rio Grande / RS, Brazil

Corresponding author: Camila De Martinez Gaspar Martins
Universidade Federal do Rio Grande - FURG
Instituto de Ciências Biológicas
Av. Itália km 8 – Campus Carreiros
96.203-900 – Rio Grande – RS – Brazil
Phone: + 55 53 393-5162
FAX: + 55 53 3233-6848
E-mail: camilaos@hotmail.com

7.1- RESUMO

Os efeitos tóxicos do pesticida carbofurano foram avaliados sobre duas espécies de microalgas, *Pediastrum boryanum* e *Desmodesmus communis*, a partir da mensuração de parâmetros como: viabilidade celular, crescimento, teor de clorofila e produção de espécies reativas de oxigênio (ERO). Ainda, avaliamos a capacidade destas algas retirarem o carbofurano presente no meio. Para tanto, ambas as espécies foram expostas ao carbofurano nas concentrações de 100, 1.000 e 10.000 $\mu\text{g L}^{-1}$ na sua formulação comercial FURADAN 350 SC® pelo período de 7 dias. Como resultados não observamos redução na viabilidade celular das algas e a concentração de clorofila também não foi afetada pela presença do carbofurano. Ainda, registramos que ambas as espécies cresceram quando em contato com o agroquímico, no entanto, a microalga *D. communis* cresceu menos do que o controle, indicando um efeito negativo do químico sobre a espécie. Ainda, observamos um aumento significativo na produção de ERO em *D. communis* e *P. boryanum* na maior concentração de exposição, sendo este observado já aos 4 dias de exposição para a primeira alga e apenas ao 7º dia para a segunda. Quanto a concentração de carbofurano no meio de cultivo, a alga *P. boryanum* removeu por completo o carbofurano do meio de todas as concentrações em até 2 dias, já *D. communis* somente conseguiu atingir esta situação aos 5 dias de teste. Em resumo, nossos resultados demonstram que existem diferenças de sensibilidade entre as duas algas, sendo a *D. communis* mais sensível. Além disso, a aplicação do carbofurano pode exercer efeitos negativos sobre as espécies de microalgas testadas, sendo estes expressos na forma de inibição do crescimento e geração de ERO; no entanto, os tais efeitos ocorrem, principalmente, quando à uma concentração muito elevada do pesticida. Pela resistência e capacidade das microalgas em concentrar o carbofurano, sugere-se a possibilidade de utilização destas cepas como ferramentas para descontaminação de ambientes impactados por esta classe de contaminantes.

Palavras-chave: microalga, toxicidade, carbofurano, biorremediação

7.2- INTRODUÇÃO

O Brasil está entre os dez principais produtores mundiais de arroz e a rizicultura irrigada é responsável por 75% da produção nacional total deste grão (EMBRAPA, 2011), sendo o Estado do Rio Grande do Sul o maior produtor brasileiro (SOSBAI, 2010). Assim, a rizicultura contribui com grande parte dos agrotóxicos lançados nos corpos d'água (Pinheiro et al., 2010) e dentre os agrotóxicos mais frequentemente encontrados, está o inseticida carbofurano e seu metabólito 3-hidroxi-carbofurano (Silva et al., 2009).

O carbofurano (2,3-diidro-2,2-dimetil benzofuran-7-il- metil carbamato) faz parte do grupo dos carbamatos e é um inseticida sistêmico e nematicida, amplamente utilizado para controle de insetos que habitam o solo e que alimente-se de folhas em cultivos agrícolas de arroz, cana-de-açúcar, tabaco, milho, batata, soja e outros vegetais (Yen et al., 1997; Dembélé et al., 2000; Kale, 2001). Este composto é altamente solúvel em água sendo suscetível a lixiviação e percolação através dos campos agrícolas, podendo ser transportado facilmente e contaminar mananciais hídricos superficiais e subterrâneas (Tariq et al., 2006; Lu et al., 2011).

O carbofurano é altamente tóxico para os animais incluindo os seres humanos e, portanto, pode representar uma grave ameaça para aqueles que entram em contato com ele, seja por ingestão ou inalação (Lalah e Wandiga, 1996). Em animais, o principal mecanismo de ação dos carbamatos consiste na inibição da enzima acetilcolinesterase (AChE), cuja ação é degradar o neurotransmissor acetilcolina liberado nas sinapses colinérgicas durante processos neurofuncionais (Fukuto, 1990, Rang et al., 1999). No entanto, outro efeito que tem se constatado é o aumento na geração de espécies reativas de oxigênio (ERO), moléculas intermediárias altamente reativas que estão envolvidas nas defesas dos organismos (Macedo et al. 2008; Hernández-Moreno et al., 2011). As ERO reagem (oxidam) com biomoléculas como proteínas, ácidos nucleicos e lipídios, podendo levar a inúmeros danos celulares (Bagchi et al., 1995; Romero et al., 2011). Não apenas restrita a animais, análises de ERO também são realizadas em plantas (e.g. Apel e Hirt, 2004; Tan et al, 2012) e algas (e.g. Okamoto et al., 2001; Zuppini et al., 2007; Sabatini et al., 2009; Gallano et al., 2011a; 2011b; Wei et al., 2011) a fim de se verificar efeitos adversos causados pela presença de poluentes como metais e agrotóxicos. Os cloroplastos são compartimentos celulares altamente suscetíveis às ERO devido a alta produção de O_2 e H_2O_2 , fluxo de elétrons e presença de íons metálicos em seu interior (Okamoto et al., 2001; Davletova et al., 2005). As ERO podem danificar as moléculas de

clorofila presentes nos cloroplastos (Tan et al., 2012), afetando a sobrevivência, crescimento e, finalmente, a produtividade das plantas.

Assim, o destino do carbofurano e de seus resíduos é de grande preocupação em termos de persistência e de mobilidade (Farahani et al., 2008). O carbofurano é o inseticida mais persistente dentro do grupo dos carbamatos (Yen et al., 1997; Benitez et al., 2002) e os dois mecanismos principais que determinam a persistência do carbofurano no meio são a hidrólise e a degradação microbiana. O carbofurano é, ainda, mais resistente a métodos de degradação por possuir um caráter refratário, requerendo, portanto, mais tempo e micro-organismos específicos para degradá-lo eficientemente (Benitez et al., 2002; Lu et al., 2011).

As algas têm sido estudadas como possíveis ferramentas para descontaminação da água por pesticidas. Há relatos de biodegradação de inseticidas, fungicidas e herbicidas por microalgas verdes e cianobactérias (e.g. Sethunathan et al., 2004; Cáceres et al., 2008a; 2008b; Dosnon-Olette et al., 2010). Para o inseticida carbofurano predominam as pesquisas de biodegradação envolvendo bactérias (Chapalmandugu e Chaudhry 1992; Ramanand et al. 1991; Chaudhry et al. 2002), havendo apenas um estudo sobre degradação desse composto por microalgas (Bicho, 2011). No entanto, não existe na literatura a descrição dos padrões de degradação e respostas fisiológicas frente a esse composto, aspectos relevantes para a aplicação destes organismos na remoção do carbofurano de ambientes naturais.

Com base no exposto, esse estudo objetivou avaliar possíveis efeitos tóxicos do carbofurano em duas espécies de microalgas verdes dulcícolas *Desmodesmus communis* e *Pediastrum boryanum* (Chlorophyceae) e averiguar o potencial destas algas para a biorremediação de ambientes aquáticos contaminados por este pesticida. Essas algas são características de ambientes eutrofizados e pertencem a gêneros considerados cosmopolitas (Bicudo e Menezes, 2006).

7.3- MATERIAL E MÉTODOS

7.3.1- Cultivo de microalgas

Para o presente estudo foram utilizadas duas cepas da divisão Chlorophyta, pertencentes à Classe Chlorophyceae e Ordem Chlorococcales: *Desmodesmus communis* e *Pediastrum boryanum*. As cepas foram obtidas a partir de amostras planctônicas coletadas em lagoas e lagos subtropicais localizadas nas cidades de Rio Grande e Santa Vitória do Palmar, na região do extremo sul do Brasil. *D. communis* foi

isolada de pequenas lagoas presentes na Universidade Federal do Rio Grande - FURG (32°04'23"S / 52°09'55"W) na cidade do Rio Grande, enquanto *P. boryanum* foi isolada da Lagoa Mirim (32°52'44"S / 52°46'04"W) em Santa Vitória do Palmar. As mesmas são mantidas na Coleção de Culturas de Microalgas Continentais do Instituto de Ciências Biológicas (CCMD-FURG) em uma sala de incubação com irradiância controlada em aproximadamente 100 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, fotoperíodo ajustado com ciclos de 12:12 h claro:escuro e temperatura de $23 \pm 1^\circ\text{C}$. Todos os experimentos foram realizados com culturas axênicas obtidas através da lavagem com solução de Dakin (Vieira, 1983) e cultivadas em meio WC/2 (Guillard e Lorenzen, 1972).

7.3.2- Desenho experimental

Cada cultura experimental foi mantida em "Carboys" de 5 L de capacidade com 4 L de meio WC/2, às mesmas condições de cultivo. Em cada "Carboy" foi adicionado um inoculo de 400 mL da alga a ser testada. A densidade celular foi monitorada até o estabelecimento do crescimento exponencial, quando cada cultura foi assepticamente divididas em 12 alíquotas de 200 mL acondicionadas em frascos "Erlenmeyers" de 250 mL, sob as mesmas condições de irradiância e temperatura do cultivo. Em sequência, foram adicionadas três concentrações de carbofurano (100; 1000 e 10000 $\mu\text{g L}^{-1}$) na sua formulação Furadan 350 SC® (35% m/v de carbofurano) preparada em meio WC/2, a partir do limite máximo permitido pela legislação brasileira (CONAMA, resolução n° 357, de 17 de março de 2005) para carbamatos totais em águas doce da classe III que é de 70 $\mu\text{g L}^{-1}$. Além disso, manteve-se um controle sem adição de carbofurano, totalizando quatro condições experimentais, todas em triplicata (12 frascos Erlenmeyers). Um segundo tipo de controle, sem adição de microalgas, também foi mantido nas mesmas três concentrações de carbofurano testadas (100; 1000 e 10000 $\mu\text{g L}^{-1}$) para monitorar a degradação não biológica deste composto.

Os experimentos foram sustentados por 7 dias com amostragens diárias das culturas para as análises de densidade celular (2 mL), teor de clorofila-a (5 mL) e concentração de carbofurano no meio (10 mL). As ERO e viabilidade celular (15 mL de amostra para cada teste) foram analisadas somente no 4º e 7º dia (Tabela 1).

7.3.3- Determinação da densidade celular e concentração de clorofila-a

A densidade celular foi determinada através de contagens ao microscópio (CX41F Olympus, Tokyo, Japan), utilizando-se para isto uma Câmara de Neubauer. As amostras

foram previamente fixadas em lugol acético e os valores foram expressos em número de células mL⁻¹.

A clorofila-a foi extraída após centrifugação à 4000 rpm por 20 min (Nova Instruments / NI 1813, Piracicaba, Brasil) da correspondente alíquota de 5 mL, descarte do sobrenadante e adição de metanol absoluto por 12 horas no escuro. Após, foi realizada a leitura da amostra em espectrofotômetro (Shimadzu, UV mini – 1240, Kyoto, Japão) nos comprimentos de onda de 665 e 750 nm. Os valores de absorbância foram transformados em µg L⁻¹ de clorofila-a de acordo com a equação descrita por Mackinney (1941) e relativizados pelo número de células das respectivas algas em 1 mL de amostra.

7.3.4- Quantificação das ERO

Para a determinação das Espécies Reativas de Oxigênio (ERO), foi utilizado o diacetato de 2,7 diclorofluoresceína (H2DCFDA) que ao entrar na célula é clivado pelas enzimas esterases e, então, oxidado na presença de ERO gerando fluorocromo, que é detectado utilizando-se comprimentos de onda de 488 e 525 nm para a excitação e emissão, respectivamente. Para tanto, utilizamos alíquotas recém-coletadas de 15 mL de microalgas a fim de concentrá-las por centrifugação em 1 mL. A ressuspensão desse 1 mL foi feita em meio WC/2 sem a adição dos micronutrientes metálicos, para que estes não interferissem na reação gerando mais ERO. As algas passaram por dois processos de centrifugação e ressuspensão nesse meio para lavagem e, finalmente, foram ressuspensas em uma solução de meio WC/2 sem micronutrientes e com o fluorocromo (100 µM). As preparações foram incubadas por 1h:30 min no escuro à 27 °C; posteriormente, passaram por nova centrifugação e ressuspensão em meio WC/2 sem metais, e imediata leitura em fluorímetro (Victor 2, Perkin Elmer) a cada 5 min ao longo de 2 horas. As amostras foram analisadas em triplicata e os dados relativizados pelo número de células em 1 mL.

7.3.5- Viabilidade celular

Foi utilizada a técnica de MTT (Methyl-thiazolyl-tetrazolium) que consiste em um corante solúvel amarelo que, quando reduzido por agentes redutores presentes em células metabolicamente ativas, torna-se um produto insolúvel em solução aquosa, de cor azul-violeta, denominado cristal de formazan (Freshney, 2010). Para tanto, cada alíquota de 15 mL foi centrifugada por 20 min à 4000 rpm (Nova Instruments- NI 1813, Piracicaba, Brasil) e ressuspensa em 1 mL de meio WC/2 com ou sem carbofurano (tratamentos:

controle, 100, 1000 e 10000 $\mu\text{g L}^{-1}$ de carbofurano, respectivamente). As preparações foram adicionadas (180 μL) em duplicata em uma placa de 96 poços e o MTT foi adicionado (20 μL). A placa foi incubada por 3 horas a 23 °C no escuro e, posteriormente centrifugada a 2.300 rpm por 20 min (NOVATECNICA NT 820). O sobrenadante foi retirado de cada poço, as amostras foram ressuspensas em 200 μL de DMSO e, após, submetidas à leitura em espectrofotômetro à 550 nm (Li e Song, 2007).

7.3.6- Determinação do carbofurano

As alíquotas para amostragem de carbofurano (10 mL) foram filtradas em filtros 0,45 μm GF-3 (Macherey-Nagel, Düren, Alemanha), e analisadas imediatamente para determinar-se a concentração de pesticida no meio de cultura. O composto foi analisado em cromatógrafo líquido *Alliance Separations* modelo 2695 Waters (Milford, MA, USA) equipado com amostrador automático e acoplado a um espectrômetro de massa, Detector MS, Micromass® Quatro Micro™ API Waters com fonte API, utilizando o modo de ionização por Electrospray, com sistema de aquisição de dados pelo software Masslynx 4.0 Waters. 13

7.3.7- Tratamento estatístico

Os dados estão expressos como média \pm erro padrão. As diferenças entre os tratamentos para os testes de viabilidade e ERO foram analisadas por ANOVA-*one way*, enquanto que as diferenças entre os tratamentos e os tempos experimentais para os demais parâmetros avaliados foram analisados por ANOVA – *two way*. Quando houve diferença estatística aplicou-se o teste *a posteriori* de Tukey. Para as diferenças entre as algas, para cada parâmetro medido, foi aplicado o *Test t - student*. O nível de significância adotado foi de 95% ($\alpha = 0,05$). A homogeneidade e homocedasticidade das amostras foram previamente testadas antes da aplicação dos testes estatísticos.

7.4- RESULTADOS

A Figura 1 mostra os dados de crescimento das algas *D. communis* e *P. boryanum* (Fig. 1A e 1B, respectivamente) com base nas densidades das mesmas em suas respectivas culturas, a cada tempo amostral. Para *D. communis* foi possível observar um efeito negativo significativo dos tratamentos com carbofurano, uma vez que, as algas expostas ao pesticida apresentaram menor crescimento que as algas controles, sendo que este crescimento foi ainda menor na maior concentração de exposição (Fig. 1A). No

entanto, a mesma figura mostra que as microalgas conseguiram crescer significativamente ao longo do período experimental, mesmo quando expostas à concentração de 10000 $\mu\text{g L}^{-1}$ de carbofurano. Por outro lado, o carbofurano não afetou a densidade da alga *P. boryanum*, e esta espécie também cresceu significativamente ao longo dos 7 dias de teste (Fig. 1B).

Os resultados de clorofila-a mostram que sua concentração não diferiu entre os tratamentos, mas apenas entre os tempos de amostragem. Para *D. communis* houve uma redução na quantidade de clorofila-a nos 2º e 7º dias de exposição ao carbofurano (Fig. 2A), enquanto que para a microalga *P. boryanum* foi possível observar apenas uma redução significativa no 2º dia de exposição ao pesticida (Fig. 2B). Na mesma linha dos resultados de clorofila-a, a viabilidade de ambas as algas, medida pela técnica de MTT, não variou significativamente nem entre os tratamentos e nem entre os dias de amostragem (4º e 7º dia de teste). A viabilidade das microalgas *D. communis* submetidas ao tratamento com carbofurando foi em torno de 98 % no 4º dia de experimento e 120 % no 7º dia, em relação ao controle; e a viabilidade da *P. boryanum* expostas ao pesticida foi de aproximadamente 120 % tanto no 4º quanto no 7º dia, também em relação ao seu respectivo controle.

Tendo em vista que a viabilidade das células não variou entre os tratamentos, os resultados de ERO foram relativizados pelo número de células em 1 mL da cultura contadas na data da análise. Em *D. communis* foi possível observar uma quantidade mais elevada de ERO apenas no tratamento com a maior concentração de carbofurano (10000 $\mu\text{g L}^{-1}$) tanto para o 4º quanto para o 7º dia (Fig. 3A). Já, para *P. boryanum* não houve diferença significativa na quantidade de ERO ao 4º dia de exposição, mas foi possível verificar que no 7º dia de experimento houve uma redução de ERO no tratamento com 1000 $\mu\text{g L}^{-1}$ de carbofurano e um aumento na concentração de 10000 $\mu\text{g L}^{-1}$, em relação ao controle (Fig. 3B). Nota-se que há uma diferença na escala das Figuras 3A e 3B, indicando *P. boryanum* apresentou uma quantidade de ERO muito mais elevada que *D. communis*, no entanto, estes dados não foram comparados estatisticamente.

Os resultados da degradação de carbofurano (Fig. 4 e 5) revelaram que a degradação do pesticida nos meios que não continham algas não chegou a 35%. No entanto, com a presença das algas, o inseticida desapareceu rapidamente do meio em sua totalidade. Nos tratamentos contendo a alga *D. communis*, foi possível observar o total desaparecimento do carbofurano em até 72 h para as concentrações de 100 e 1000 $\mu\text{g L}^{-1}$ (Fig. 4A e 4B, respectivamente), já para maior concentração testada, 10000 $\mu\text{g L}^{-1}$ (Fig. 4 C), o carbofurano desapareceu do meio em até 120 h. Por outro lado, nos meios

contendo a alga *P. boryanum* houve um desaparecimento do carbofurano por completo em até 24h para concentração de 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ (Fig. 5A) e em até 48h para as concentrações de 1000 e 10000 $\mu\text{g L}^{-1}$ (Fig. 5B e 5C, respectivamente). É válido ressaltar que não temos a medida no tempo zero para a alga *D. communis* por falta de amostragem. Nas figuras 4 e 5 podemos ver ainda que o crescimento de ambas as algas torna-se aparentemente mais pronunciado, após o desaparecimento completo do pesticida no meio.

7.5- DISCUSSÃO

A partir dos resultados de crescimento, pode-se notar diferenças na sensibilidade das duas microalgas, sendo que *D. communis* mostrou-se mais sensível que *P. boryanum*, dada a redução na sua densidade em função da concentração do agrotóxico no meio (Fig. 1A e 1B). Por outro lado, devemos considerar também que ambas as algas cresceram significativamente no decorrer do período de exposição. Algumas microalgas, como as cianobactérias do gênero *Anabaena*, tem a capacidade de utilizar o carbofurano a curto prazo, possivelmente, como substrato para seu crescimento (proliferação) e, portanto não sofrem inicialmente com a presença do inseticida; entretanto o acúmulo de altas concentrações de carbofurano e produtos da sua degradação hidrolítica podem exercer toxicidade a longo prazo nessas cianobactérias (Hammouda, 1999). Para as microalgas dulcícolas *Scenedesmus bijugatus* e *Nostoc linckia* (cianobactéria), é descrito um aumento significativo no crescimento quando estas foram expostas à concentrações de até 20 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de carbofurano; já em concentrações maiores, houve redução no crescimento das culturas (Megharaj et al., 1989).

Com relação aos dados de clorofila-a (Fig. 2A e 2B), não foi observado uma variação de resposta em consequência da exposição ao carbofurano tanto em *D. communis* como em *P. boryanum*, sugerindo que esse parâmetro não é o mais adequado para identificar a possível toxicidade do pesticida nessas algas. Da mesma forma, para *Euglena gracilis*, o carbofurano não afetou o nível de clorofila-a, segundo Azizullah et al. (2011).

Em contrapartida, a quantidade de ERO variou não só entre os tratamentos, mas com relação ao tempo amostral (Fig. 3A e 3B). Os resultados indicam que a presença do carbofurano no meio, em altas concentrações, estimula a produção de ERO, podendo ser este um mecanismo de toxicidade do pesticida, caso o arsenal antioxidante das algas não acompanhe o aumento na quantidade de ERO. De qualquer forma, o aumento de ERO

evidencia o potencial tóxico do pesticida para as microalgas *D. communis* e *P. boryanum*. No entanto, houve um diferencial entre as algas, a *D. communis* teve um aumento na quantidade de ERO aos 4 dias de exposição ao carbofurano ($10000 \mu\text{g L}^{-1}$), enquanto que na *P. boryanum* esta situação só foi observada aos 7 dias de teste. Novamente, a microalga *D. communis* parece ser mais sensível ao pesticida do que a *P. boryanum*.

Outro ponto é a nítida diferença na quantidade de ERO entre o 4º e o 7º dia de teste, independente da alga analisada. Possivelmente, tal diferença possa estar relacionada à uma maior manipulação da cultura até o 4º dia e depois, ao 7º dia de experimento. De fato, até o 4º dia e no 7º dia de teste foram retiradas diversas alíquotas da cultura para as análises de crescimento, viabilidade celular, quantificação de ERO e análise de carbofurano, enquanto que nos 5º e 6º dias de exposição, foram retiradas apenas uma alíquota para análise de carbofurano. A manipulação é um tipo de estresse que pode gerar situação de estresse oxidativo, podendo ser esta uma explicação para a variação observada acima (Apel e Hirt, 2004).

Ainda, os valores de ERO registrados para *D. communis* foram inferiores aos registrados para *P. boryanum*. Uma explicação para isto pode estar na composição e forma da parede celular destas algas. Segundo Barsanti e Gualtieri (2006), a parede celular do gênero *Desmodesmus* é mais complexa do que a do gênero *Pediastrum*, portanto, o fluorescente pode ter atravessado mais facilmente a parede da *P. boryanum* e, conseqüentemente, ter reagido mais com as esterases, resultando em uma maior fluorescência e maiores valores de ERO. No entanto, essa barreira mecânica (parede celular) não é um fator determinante para indicar uma maior tolerância das algas à contaminantes presentes no ambiente, tendo em vista que o tamanho e composição química desses compostos devem ser considerados.

O uso de algas como ferramentas para biorremediação depende da sua habilidade de sobreviver aos contaminantes expostos (Pinto et al., 2003), além da sua eficiência em retirá-los do meio. Nossos resultados apontaram que as duas microalgas analisadas são capazes de retirar o carbofurano do meio em até cinco dias, sendo a *P. boryanum* mais eficiente que *D. communis* nessa remoção (Fig. 5 e 6). Além disso, ambas as algas mantêm o crescimento celular ao longo do tempo e nesse contexto destaca-se a microalga *P. boryanum* por apresentar maior tolerância ao inseticida. Isto vai ao encontro do que diz Wong e Pak (1992), que espécies tolerantes à poluentes podem ter maior capacidade de acumulação e biotransformação.

No presente estudo, não foi possível precisar se estas microalgas adsorvem o carbofurano em suas estruturas externas (parede celular e/ou envoltório de

polissacarídeos), como acontece com a microalga *Scenedesmus vacuolatus* quando exposta ao cobre (Sabatini et al., 2009); se também internalizam o composto e o bioacumulam apenas, como faz a diatomácea *Navicula incerta* (Liu et al., 2010); ou se o degradam, conforme Gao et al. (2011) descrevem para a alga verde *Chlorella vulgaris* exposta ao nonilfenol (metabólito da degradação de pesticidas a base de fenol) e Jin et al. (2012) para alga verde *Chlamydomonas reinhardtii* tratada com o herbicida prometrina. No último exemplo, os autores ainda indicam que a *C. reinhardtii* é capaz de utilizar o herbicida e/ou produtos de sua degradação como fontes de carbono para seu crescimento. Da mesma forma, as microalgas *P. boryanum* e *D. communis* poderiam estar fazendo este processo, uma vez que apresentaram crescimento mais pronunciado após concentrar todo o pesticida presente no meio, independente da concentração de exposição (Fig. 4 e 5). No entanto, mais testes são necessários para confirmar esta hipótese.

7.6- CONCLUSÃO

A partir desse estudo, foi possível verificar que o carbofurano tem potencial para exercer toxicidade nas microalgas *P. boryanum* e *D. communis*, por um efeito inibitório no crescimento e/ou por estimular a geração de ERO, sendo estes, portanto, possíveis marcadores da contaminação aquática por carbofurano. Entretanto, as algas testadas apresentam diferenças na sensibilidade ao pesticida, sendo a *D. communis* mais sensível. Por fim, ambas espécies são indicadas como ferramentas para remoção do carbofurano do meio e descontaminação de ambientes impactados por esta classe de contaminantes.

7.7- AGRADECIMENTOS

Agradecemos a MSc. Sergine Caldas pelas análises de carbofurano. Agradecemos à CAPES pela bolsa da Daniéli Saul da Luz. O presente projeto foi realizado no âmbito do PRONEX (Programa de Apoio a Núcleos de Excelência), fomentado pela FAPERGS.

7.8- REFERÊNCIAS

- Apel, K., Hirt, H., 2004. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annu. Rev. Plant Biol.* 55, 373–399.
- Azizullah A., Richter, P. E, Häder D.P., 2011. Comparative toxicity of the pesticides carbofuran and malathion to the freshwater flagellate *Euglena gracilis*. *Ecotoxicology*. 20, 1442–1454.
- Bagchi,D., Bagchi,M., Hassoun, E.A., Stohs, S.J., 1995. In vitro and in vivo generation of reactive oxygen species, DNA damage and lactate dehydrogenase leakage by selected pesticides. *Toxicology* 104, 129-140.
- Barsanti, L. and Gualtieri, P. (2006) *Algae: Anatomy, Biochemistry and Biotechnology*. CRC press,Taylor & Francis Group. Boca Raton, London. pp. 320.
- Benitez, F. J., Acero, J.L., Real, F.J., 2002. Degradation of carbofuran by using ozone, UV radiation and advanced oxidation processes. *J. Hazard. Mater.* B89, 51-65.
- Bicho, M. S., 2011. Avaliação da toxicidade e degradação do carbofurano por cinco espécies fitoplanctônicas dulcícolas subtropicais. 57p. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, Brasil.
- Bicudo, C. E. de M. & M. Menezes. (org) 2006. *Gêneros de algas de águas continentais do Brasil (chave para identificação e descrições)* 2ª edição. São Carlos: Rima
- Cáceres, T. P., Mallavarapu Megharaj, M., Naidu, R.,2008 a. Biodegradation of the Pesticide Fenamiphos by Ten Different Species of Green Algae and Cyanobacteria. *Curr. Microbiol.* 57, 643–646.
- Cáceres, T., Megharaj,M., Naidu, R., 2008 b. Toxicity and transformation of fenamiphos and its metabolites by two micro algae *Pseudokirchneriella subcapitata* and *Chlorococcum* sp. *Sci. Total Environ.* 398, 53-59.

Chapalmandugu, S., Chaudhry, GR., 1992. Microbial and biotechnological aspects of metabolism of carbamates and organophosphates. *Crit. Rev. Biotechnol.* 12, 357–389.

Chaudhry, GR., Mateen, A., Kaskar, B., Sardesai, M., Bloda, M.A., Bhatti, R., Walia, S.K., 2002. Induction of carbofuran oxidation to 4- hydroxycarbofuran by *Pseudomonas* sp. 50432. *FEMS Microbiol. Lett.* 214,171–176.

Davletova, S., Rizhsky, L., Liang, H., Shenggiang, Z., Oliver, D.J., Coutu, J., Shulaev, V., Schlauch, K., Mittler, R., 2005. Cytosolic ascorbate peroxidase 1 is a central component of the reactive oxygen gene network of *Arabidopsis*; *Plant Cell* 17, 268–281.

Dembélé,K., Haubruge,E., Gaspar,C., 2000. Concentration Effects of Selected Insecticides on Brain Acetylcholinesterase in the Common Carp (*Cyprinus carpio* L.). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 45, 49-54.

Dosnon-Olette,R., Trotel-Aziz,P., Couderchet,M., Eullaffroy, P., 2010. Fungicides and herbicide removal in *Scenedesmus* cell suspensions. *Chemosphere* 79, 117–123.

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária- EMBRAPA, 2011. Agência Embrapa de Informação Tecnológica: Arroz e Feijão. Disponível em: <http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/arroz/arvore/CONT000g1wcnzza02wx5ok0ha2lipwbeel46.html> Acesso em: 02 de Maio de 2014.

Farahani G. H. N., Sahid, I.B., Zakaria, Z., Kuntom, A., Omar, D., 2008. Study on the downward movement of carbofuran in two malaysian soils. *Bull Environ Contam Toxicol* 81, 294–298.

Fukuto, T. R., 1990. Mechanism of action of organophosphorus and carbamate insecticides. *Environ. Health Perspect.* 87, 245–254.

Freshney, R.I., 2005. *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique and Specialized Applications*. John Wiley and Sons, 5^a ed. New York.

Galhano, V., Santos, H., Oliveira, M.M.,Gomes-Laranjo, J., Peixoto, F., 2011 a. Changes in fatty acid profile and antioxidant systems in a *Nostoc muscorum* strain exposed to the herbicide bentazon. *Process Biochem.* 46, 2152-2162.

Galhano, V.M.M., Gomes-Laranjo, J., Peixoto, F., 2011 b. Exposure of the cyanobacterium *Nostoc muscorum* from Portuguese rice fields to Molinate (Ordram®): Effects on the antioxidant system and fatty acid profile. *Aquat. Toxicol.* 101, 367–376.

Gao, Q.T., Wong, Y.S., Tam N.F.Y.,2011. Removal and biodegradation of nonylphenol by different *Chlorella* species. *Mar. Pollut. Bull.* 63, 445–451.

Guillard, R. R. L., Lorenzen, C. J. 1972. Yellow-green algae with chlorophyllide c. *J. Phycol.* 8,10-14.

Hammouda,O., 1999 Response of the Paddy Field Cyanobacterium *Anabaena doliolum* to Carbofuran. *Ecotox. Environ. Safe.* 44, 215- 219.

Hernández-Moreno, D., Pérez-López, M., Soler, F., Gravato, C., Guilhermino, L., 2011. Effects of carbofuran on the sea bass (*Dicentrarchuslabrax* L.): Study of biomarkers and behavior alterations. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 74, 1905–1912.

Jin , Z.P., Luo, K., Zhang, S., Zheng, Q., Yang, H., 2012. Bioaccumulation and catabolism of prometryne in green algae. *Chemosphere.* 87,278-284.

Kale, S. P., Murthy, N.B.K., 2001. Degradation of 14C-carbofuran in soil using a continuous flow system. *Chemosphere* 44, 893-895.

Lalah, J.O., Wandiga, S.O., 1996. Adsorption/desorption and mobility of carbofuran in soil sample from Kenya. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 56, 575–583.

Li, J., Song, L., 2007. Applicability of the MTT assay for measuring viability of cyanobacteria and algae, specifically for *Microcystis aeruginosa* (Chroococcales, Cyanobacteria). *Phycologia.* 46, 593–599.

Liu, Y., Guan, Y., Gao, Q., Tam, N.F.Y., Zhu, W., 2010. Cellular responses, biodegradation and bioaccumulation of endocrine disrupting chemicals in marine diatom *Navicula incerta*. *Chemosphere* 80, 592–599.

Lu, L. A., Ma, Y.S., Kumar, M., Lin, J.G., 2011. Photochemical degradation of carbofuran and elucidation of removal mechanism. *Chem. Eng. J.* 166, 150-156.

Macedo, R.S., Lombardi, A.T., Omachi, C.Y., Rörig, L.R., 2008. Effects of the herbicide bentazon on growth and photosystem II maximum quantum yield of the marine diatom *Skeletonema costatum*. *Toxicol. in Vitro* 22, 716–722.

Mackinney, G. 1941. Absorption of light by chlorophyll solutions. *Journal of Biol. Chem.* 140, 315-322.

Megharaj, M., Venkateswarlu, K., Rao, A.S., 1989. Effects of Carbofuran and Carbaryl on the Growth of a Green Alga and Two Cyanobacteria Isolated from a Rice Soil. *Agr. Ecosyst. Environ.* 25, 329-336.

Okamoto, O.K., Pinto, E., Latorre, L.R., Bechara, E.J.H., Colepicolo, P., 2001. Antioxidant modulation in response to metal-induced oxidative stress in algal chloroplasts. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 40, 18–24.

Pinheiro, A., Silva, M. R., Kraisch, R., 2010. Presença de pesticidas em águas superficiais e subterrâneas na bacia do Itajaí, SC. *Rega*, v.7, n.2, p.17-26, 2010.

Pinto, E., Sigaud-Kutner, T.C.S., Leitão, M.A.S., Okamoto, O.K., Morse, D., Colepicolo, P., 2003. Heavy Metal-induced Oxidative Stress in Algae. *J. Phycol.* 39, 1008–1018.

Ramanand, K., Sharmila, M., Singh, N., Sethunathan, N., 1991. Metabolism of carbamate insecticides by resting cells and cell-free preparations of a soil bacterium, *Arthrobacter* sp. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 46, 380–386.

Rang, H. P., Dale, M. M., Ritter, J. M., 1999. *Farmacologia*. 4a edição. Editora Guanabara Koogan. Rio de Janeiro, RJ., 703 pp.

- Romero, D. M., Molina M.C.R., Juárez, A., 2011. Oxidative stress induced by a commercial glyphosate formulation in a tolerant strain of *Chlorella kessleri*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 74, 741–747.
- Sabatini, S.E., Juárez, A.B., Eppis, M.R., Bianchi, L., Luquet, C. M., Molina, M.C.R., 2009. Oxidative stress and antioxidant defenses in two green microalgae exposed to copper. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 72, 1200–1206.
- Sethunathan, N., Megharaj, M.M., Chen, Z. L., Williams, B. D., Lewis, G., Naidu, R., 2004. Algal Degradation of a Known Endocrine Disrupting Insecticide, r-Endosulfan, and Its Metabolite, Endosulfan Sulfate, in Liquid Medium and Soil. *J. Agric. Food Chem.* 52, 3030-3035.
- Silva, D. R.O, Avila, L.A., Agostinetto, D. Magro, T. D., Oliveira, Zanella, R., Noldin, J. A., 2009. Monitoramento de agrotóxicos em águas superficiais de regiões orizícolas no sul do Brasil. *Cienc. Rural.* 39, 2383-2389.
- Sociedade Sul Brasileira de Arroz Irrigado - SOSBAI. Arroz irrigado: Recomendações Técnicas da Pesquisa para o Sul do Brasil. Pelotas: SOSBAI, Embrapa Clima Temperado, 2010. 161 p.
- Tan, D.X., Hardeland, R., Manchester, L.C., Korkmaz, A., Ma, S., Rosales Corral, S., Reiter, R.J., 2012. Functional roles of melatonin in plants, and perspectives in nutritional and agricultural science. *J. Exp. Bot.* 63, 577-597.
- Tariq, M.I., Afzal, S., Hussain, I., 2006. Degradation and persistence of cotton pesticides in sandy loam soils from Punjab, Pakistan. *Environ. Res.* 100, 184-196.
- Vieira, A. A. H. 1983. Purification of phytoplankton cultures with Dakin solution. *Rev. Microbiol.* 14, 202–3.
- Wong, M.H., Pak, D.C.H., 1992. Removal of copper and nickel by free and immobilized microalgae. *Biomed. Environ. Sci.* 5, 99–108.

TABELAS

Tabela 1: Desenho experimental de amostragem ao longo dos 7 dias de experimento.

Análise	Volume amostral (mL)	Tempo amostral (dias após a exposição)
Densidade celular	2	1 ^o , 2 ^o , 3 ^o , 4 ^o e 7 ^o
Teor de clorofila-a	5	1 ^o , 2 ^o , 3 ^o , 4 ^o e 7 ^o
EROs	15	4 ^o e 7 ^o
Viabilidade	15	4 ^o e 7 ^o
Carbofurano	10	1 ^o , 2 ^o , 3 ^o , 4 ^o , 5 ^o , 6 ^o e 7 ^o

LEGENDAS PARA AS FIGURAS

Fig 1- Crescimento celular de *D. communis* (A) e *P. boryanum* (B) ao longo de sete dias de exposição ao carbofurano. Letras minúsculas indicam diferenças significativa entre os tratamentos e as [letras maiúsculas] indicam diferença significativa entre os tempos amostrais (ANOVA – *two way*). Os dados estão expressos como média \pm erro padrão.

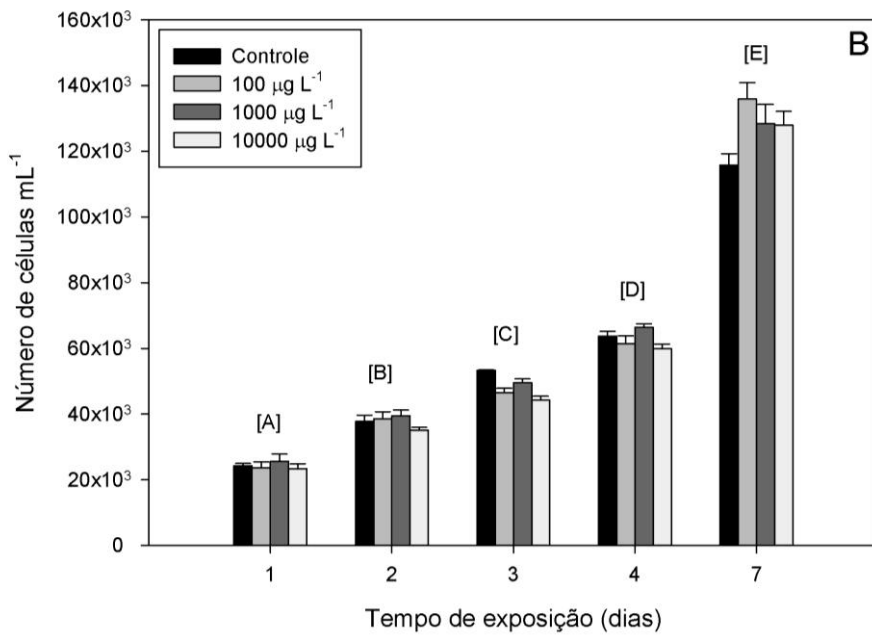
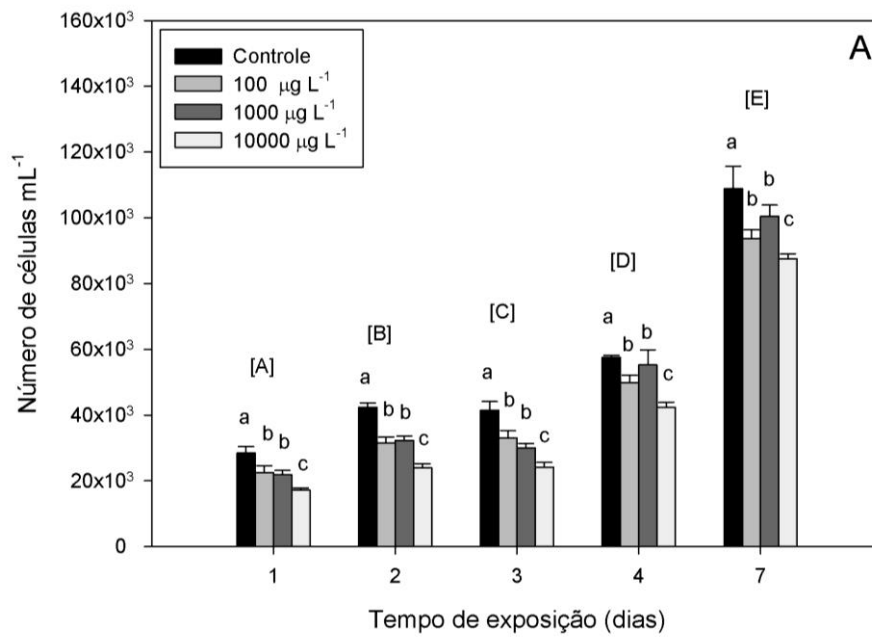
Fig. 2- Concentração de clorofila-a de *D. communis* (A) e *P. boryanum* (B) ao longo de sete dias de exposição ao carbofurano. As [letras maiúsculas] indicam diferença significativa entre os tempos amostrais (ANOVA – *two way*). Os dados estão expressos como média \pm erro padrão.

Fig. 3- Quantidade de espécies reativas de oxigênio (ERO) para *D. communis* (A) e *P. boryanum* (B) expostas ao carbofurano por 4 e 7 dias. Letras minúsculas indicam diferenças significativa entre os tratamentos (ANOVA – *one way*). Os dados estão expressos como média \pm erro padrão.

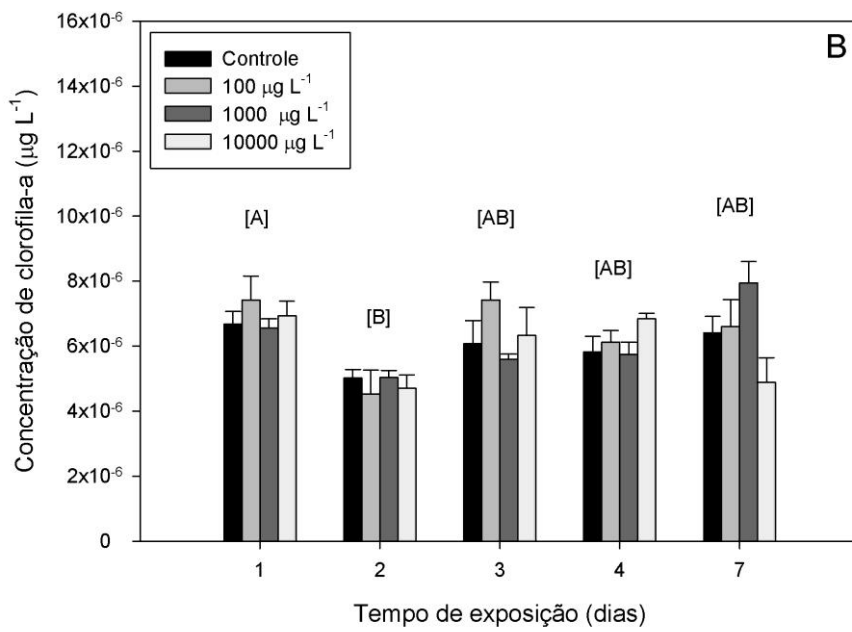
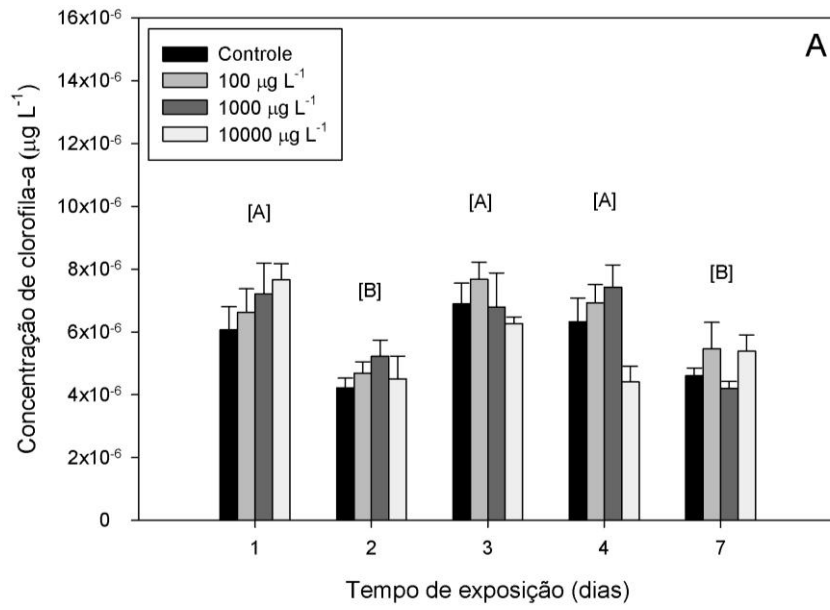
Fig. 4- Concentração de carbofurano transformada em logaritmo natural (Log) (eixo y da esquerda) e crescimento da cultura de *D. communis* em o número de células mL⁻¹ (eixo y da direita). (A) representa os resultados para concentração de 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ de carbofurano, (B) representa os resultados para concentração de 1000 $\mu\text{g L}^{-1}$ de carbofurano e (C) representa os resultados para concentração de 10000 $\mu\text{g L}^{-1}$ de carbofurano. Os dados estão expressos como média \pm erro padrão.

Fig. 5- Concentração de carbofurano transformada em logaritmo natural (Log) (eixo y da esquerda) e crescimento da cultura de *P. boryanum* em o número de células mL⁻¹ (eixo y da direita). (A) representa os resultados para concentração de 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ de carbofurano, (B) representa os resultados para concentração de 1000 $\mu\text{g L}^{-1}$ de carbofurano e (C) representa os resultados para concentração de 10000 $\mu\text{g L}^{-1}$ de carbofurano. Os dados estão expressos como média \pm erro padrão.

FIGURAS



Figuras 1A e 1B



Figuras 2A e 2B

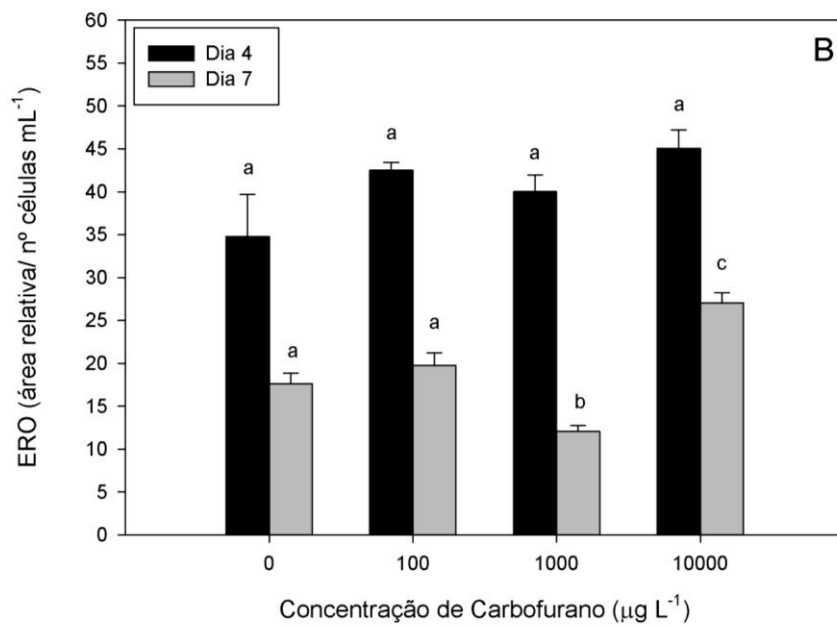
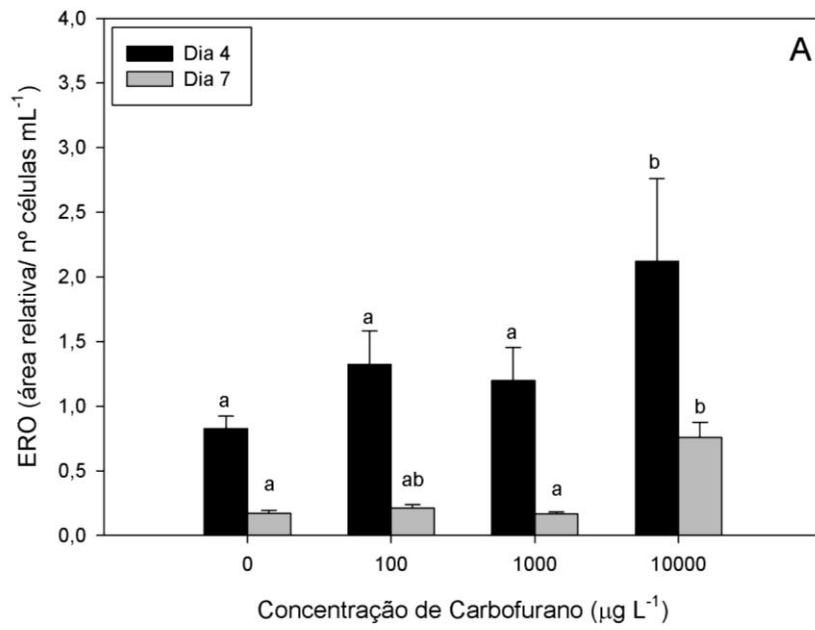


Figura 3A e 3B

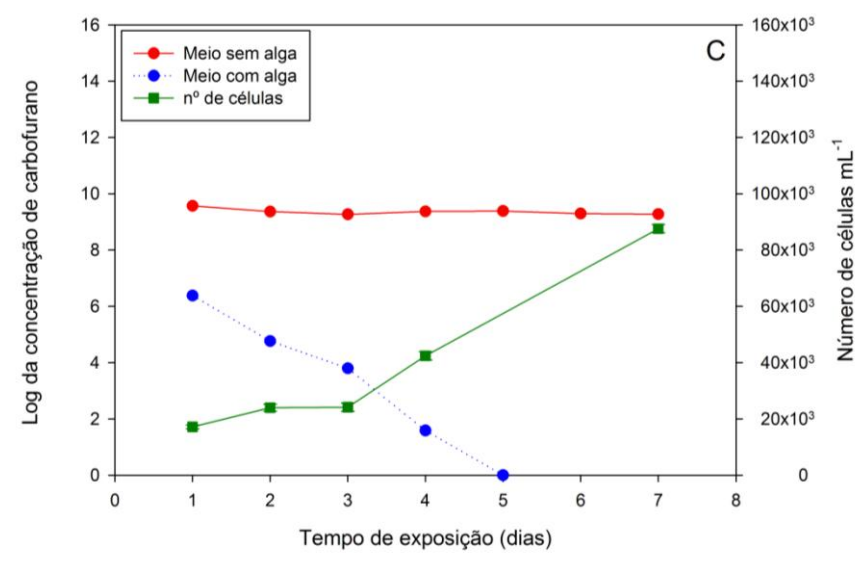
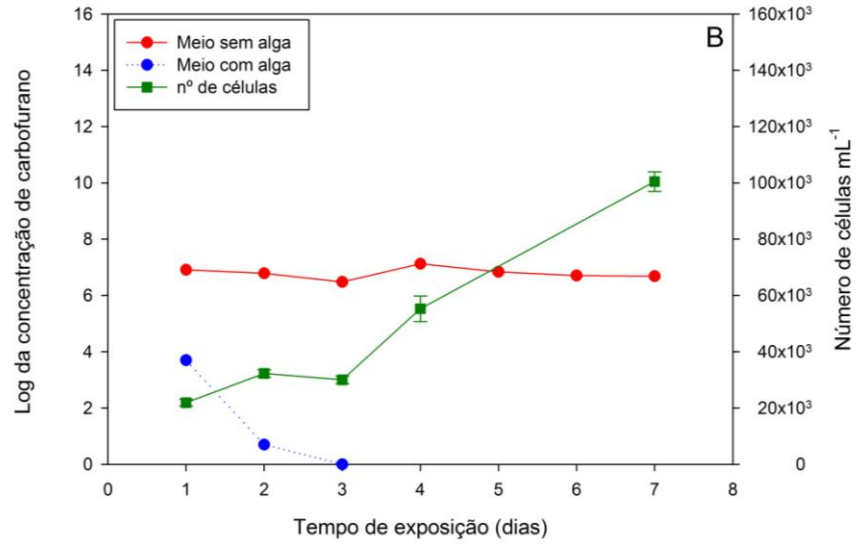
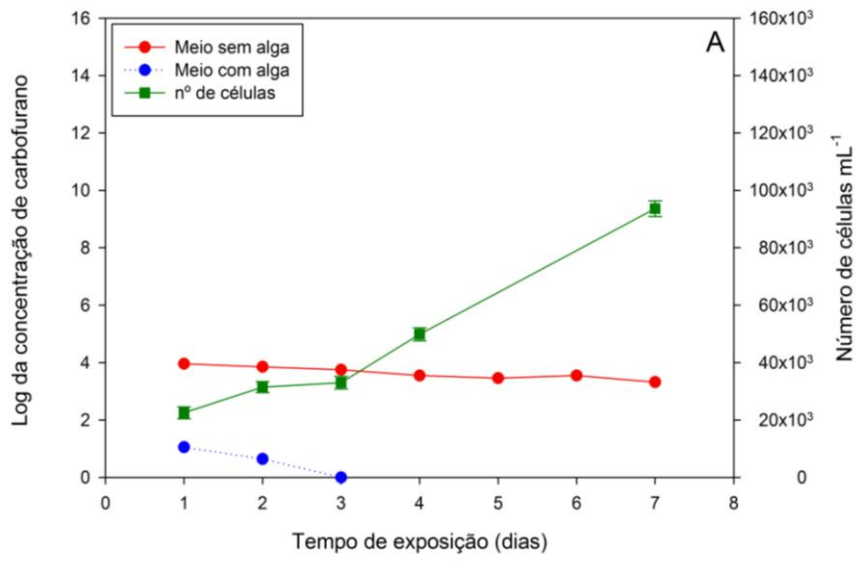


Figura 4A, 4B e 4C

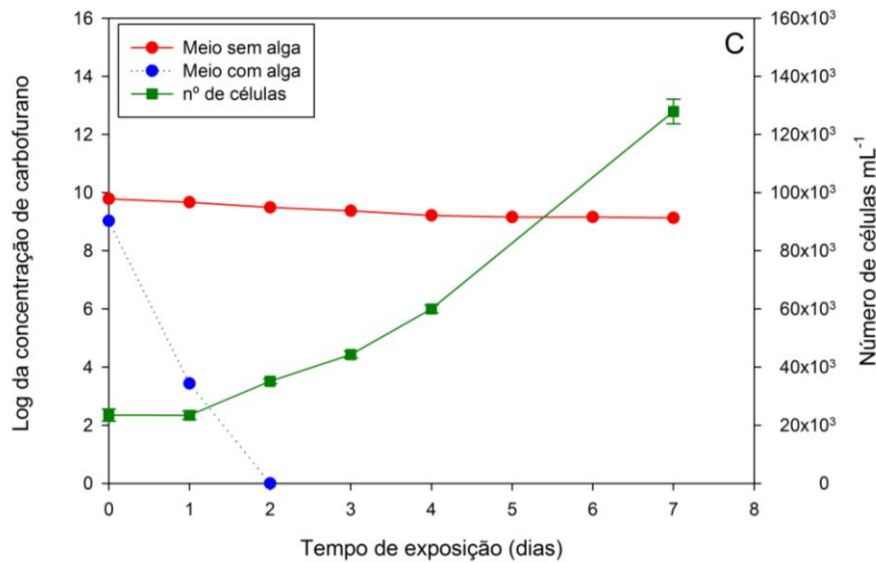
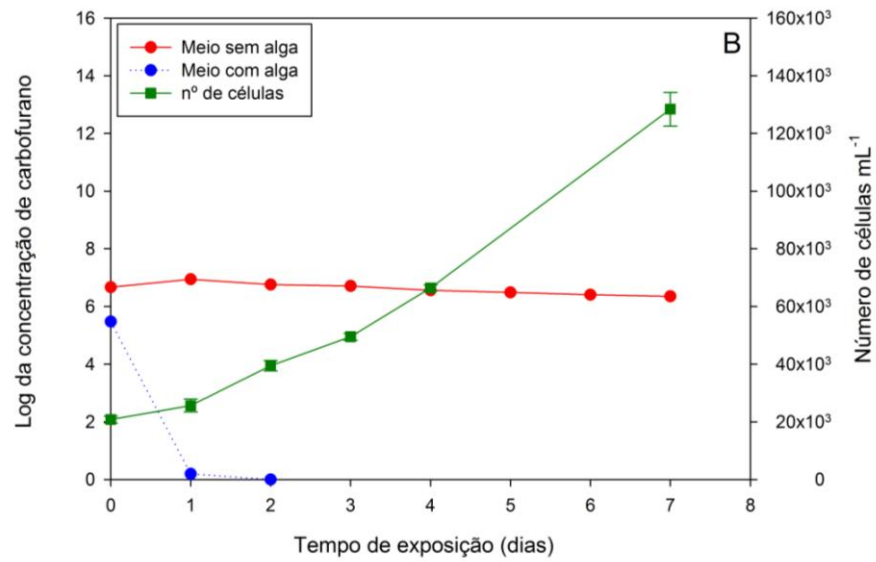
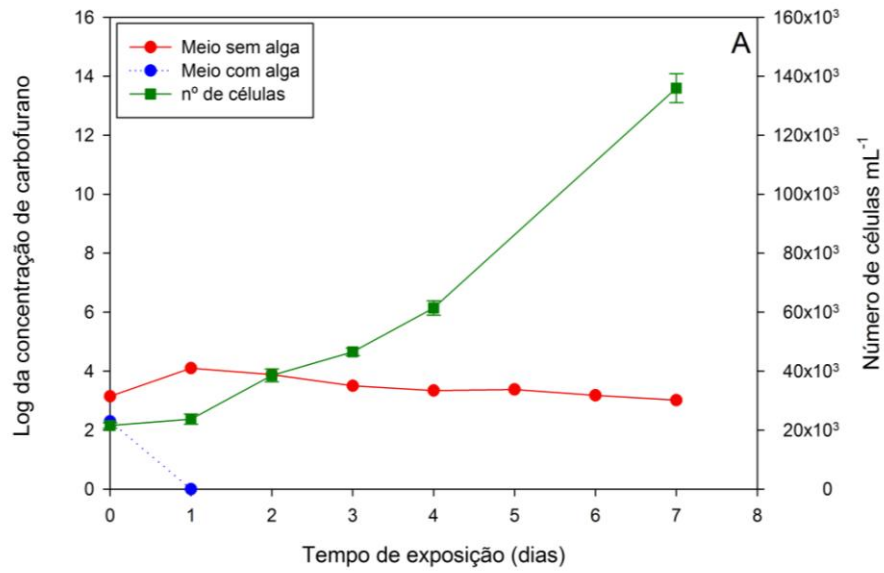


Figura 5A, 5B e 5C

GUIDE FOR AUTHORS

INTRODUCTION

Types of paper

1. Original Research Papers (Regular Papers)
2. Review Articles
3. Short Communications
4. Letters to the Editor

Original Research Papers should report the results of original research. The material should not have been previously published elsewhere, except in a preliminary form.

Article structure

Subdivision - numbered sections

Divide your article into clearly defined and numbered sections. Subsections should be numbered

1.1 (then 1.1.1, 1.1.2, ...), 1.2, etc. (the abstract is not included in section numbering). Use this numbering also for internal cross-referencing: do not just refer to 'the text'. Any subsection may be given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line.

Introduction

State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results.

Material and methods

Provide sufficient detail to allow the work to be reproduced. Methods already published should be indicated by a reference: only relevant modifications should be described.

Theory/calculation

A Theory section should extend, not repeat, the background to the article already dealt with in the Introduction and lay the foundation for further work. In contrast, a Calculation section represents a practical development from a theoretical basis.

Results

Results should be clear and concise.

Discussion

This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. A combined Results and Discussion section is often appropriate. Avoid extensive citations and discussion of published literature.

Conclusions

The main conclusions of the study may be presented in a short Conclusions section, which may stand alone or form a subsection of a Discussion or Results and Discussion section.

Appendices

If there is more than one appendix, they should be identified as A, B, etc. Formulae and equations in appendices should be given separate numbering: Eq. (A.1), Eq. (A.2), etc.; in a subsequent appendix, Eq. (B.1) and so on. Similarly for tables and figures: Table A.1; Fig. A.1, etc.

Essential title page information

- **Title.** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems.

Avoid

abbreviations and formulae where possible.

- **Author names and affiliations.** Where the family name may be ambiguous (e.g., a double name), please indicate this clearly. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.

- **Corresponding author.** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. **Ensure that phone numbers (with country and area code) are provided in addition to the e-mail address and the complete postal address.**

Contact details must be kept up to date by the corresponding author.

- **Present/permanent address.** If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

Abstract

A concise and factual abstract is required of no more than 400 words. The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separate from the article, so it must be able to stand alone. For

this reason, References should be avoided, but if essential, they must be cited in full, without reference to the reference list. Also, non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself.

Keywords

Immediately after the abstract, provide a maximum of 6 keywords, using American spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, 'and', 'of'). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

Abbreviations

Define abbreviations that are not standard in this field in a footnote to be placed on the first page of the article. Such abbreviations that are unavoidable in the abstract must be defined at their first mention there, as well as in the footnote. Ensure consistency of abbreviations throughout the article.

Acknowledgements

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise. List here those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.).

Math formulae

Present simple formulae in the line of normal text where possible and use the solidus (/) instead of a horizontal line for small fractional terms, e.g., X/Y. In principle, variables are to be presented in italics. Powers of e are often more conveniently denoted by exp. Number consecutively any equations that have to be displayed separately from the text (if referred to explicitly in the text).

Footnotes

Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article. Many wordprocessors build footnotes into the text, and this feature may be used. Should this not be the case, indicate the position of footnotes in the text and present the footnotes themselves separately at the end of the article. Do not include footnotes in the Reference list.

Table footnotes

Indicate each footnote in a table with a superscript lowercase letter.

Artwork

Electronic artwork

General points

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Preferred fonts: Arial (or Helvetica), Times New Roman (or Times), Symbol, Courier.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Indicate per figure if it is a single, 1.5 or 2-column fitting image.
- For Word submissions only, you may still provide figures and their captions, and tables within a single file at the revision stage.
- Please note that individual figure files larger than 10 MB must be provided in separate source files.

A detailed guide on electronic artwork is available on our website:

<http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.

Formats

Regardless of the application used, when your electronic artwork is finalized, please 'save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):

EPS (or PDF): Vector drawings. Embed the font or save the text as 'graphics'.

TIFF (or JPG): Color or grayscale photographs (halftones): always use a minimum of 300 dpi.

TIFF (or JPG): Bitmapped line drawings: use a minimum of 1000 dpi.

TIFF (or JPG): Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale): a minimum of 500 dpi is required.

Please do not:

AUTHOR INFORMATION PACK 27 Mar 2014 www.elsevier.com/locate/aqtox 9

- Supply files that are optimized for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); the resolution is too low.
- Supply files that are too low in resolution.
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

Color artwork

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF (or JPEG), EPS (or PDF), or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color on the Web (e.g., ScienceDirect and other sites)

regardless of whether or not these illustrations are reproduced in color in the printed version. **For color reproduction in print, you will receive**

information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article.

Please indicate your preference for color: in print or on the Web only. For further information on the preparation of electronic artwork, please see <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Please note: Because of technical complications which can arise by converting color figures to 'gray scale' (for the printed version should you not opt for color in print) please submit in addition usable black and white versions of all the color illustrations.

Figure captions

Ensure that each illustration has a caption. A caption should comprise a brief title (**not** on the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used.

Tables

Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text. Place footnotes to tables below the table body and indicate them with superscript lowercase letters. Avoid vertical rules. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in tables do not duplicate results described elsewhere in the article.

References

Citation in text

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication date with either 'Unpublished results' or 'Personal communication'. Citation of a reference as 'in press' implies that the item has been accepted for publication.

Reference links

Increased discoverability of research and high quality peer review are ensured by online links to the sources cited. In order to allow us to create links to abstracting and indexing services, such as Scopus, CrossRef and PubMed, please ensure that data provided in the references are correct. Please note that incorrect surnames, journal/book titles, publication year and pagination may prevent link creation. When copying references, please be careful as they may already contain errors. Use of the DOI is encouraged.

Web references

As a minimum, the full URL should be given and the date when the reference was last accessed. Any further information, if known (DOI, author names, dates, reference to a source publication, etc.), should also be given. Web references can be listed separately (e.g., after the reference list) under a different heading if desired, or can be included in the reference list.

References in a special issue

Please ensure that the words 'this issue' are added to any references in the list (and any citations in the text) to other articles in the same Special Issue.

Reference formatting

There are no strict requirements on reference formatting at submission. References can be in any style or format as long as the style is consistent. Where applicable, author(s) name(s), journal title/book title, chapter title/article title, year of publication, volume number/book chapter and the pagination must be present. Use of DOI is highly encouraged. The reference style used by the journal will be applied to the accepted article by Elsevier at the proof stage. Note that missing data will be highlighted at proof stage for the author to correct. If you do wish to format the references yourself they should be arranged according to the following examples:

Reference style

Text: All citations in the text should refer to:

1. *Single author:* the author's name (without initials, unless there is ambiguity) and the year of publication;
2. *Two authors:* both authors' names and the year of publication;
3. *Three or more authors:* first author's name followed by 'et al.' and the year of publication. Citations may be made directly (or parenthetically). Groups of references should be listed first alphabetically, then chronologically.

Examples: 'as demonstrated (Allan, 2000a, 2000b, 1999; Allan and Jones, 1999). Kramer et al. (2010) have recently shown'

List: References should be arranged first alphabetically and then further sorted chronologically if necessary. More than one reference from the same author(s) in the same year must be identified by the letters 'a', 'b', 'c', etc., placed after the year of publication.

Examples:

Reference to a journal publication:

Van der Geer, J., Hanraads, J.A.J., Lupton, R.A., 2010. The art of writing a scientific article. *J. Sci. Commun.* 163, 51–59.

Reference to a book:

Strunk Jr., W., White, E.B., 2000. *The Elements of Style*, fourth ed. Longman, New York.

Reference to a chapter in an edited book:

Mettam, G.R., Adams, L.B., 2009. How to prepare an electronic version of your article, in: Jones, B.S., Smith, R.Z. (Eds.), *Introduction to the Electronic Age*. E-Publishing Inc., New York, pp. 281–304.

Journal abbreviations source

If journal names are abbreviated, the abbreviations should follow the List of Title Word Abbreviations:

<http://www.issn.org/services/online-services/access-to-the-ltwa/>.

Submission checklist

The following list will be useful during the final checking of an article prior to sending it to the journal for review. Please consult this Guide for Authors for further details of any item.

Ensure that the following items are present: One author has been designated as the corresponding author with contact details:

- E-mail address
- Full postal address
- Telephone

All necessary files have been uploaded, and contain:

- Keywords
- All figure captions
- All tables (including title, description, footnotes)

Further considerations

- Manuscript has been 'spell-checked' and 'grammar-checked'
- All references mentioned in the Reference list are cited in the text, and vice versa
- Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Web)
- Color figures are clearly marked as being intended for color reproduction on the Web (free of charge) and in print, or to be reproduced in color on the Web (free of charge) and in black-and-white in print
- If only color on the Web is required, black-and-white versions of the figures are also supplied for printing purposes For any further information please visit our customer support site at <http://support.elsevier.com>.