



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



**Avaliação da Toxicidade e Degradação do
carbofurano por Cinco Espécies Fitoplanctônicas
Dulcícolas Subtropicais**

Mirian da Silva Bicho

Orientador: Danilo Giroldo

Rio Grande
2012



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



Avaliação da Toxicidade e Degradação do carbofurano por Cinco Espécies Fitoplanctônicas Dulcícolas Subtropicais

Aluno: Mirian da Silva Bicho

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
2012

AGRADECIMENTOS

- Aos meus pais pela vida, amor, apoio, confiança e incentivo durante toda minha vida;
- A minha avó Teresa que me acolheu com muito amor e carinho e se fez presente nos bons e maus momentos da minha vida;
- Aos meus irmãos que me incentivaram e se fizeram presentes em todos os momentos da minha vida, tornando-se parte indispensável no meu dia-a-dia;
- Ao meu amor, amigo e companheiro Valvitez que respeita e apóia dia-a-dia minhas decisões, tornando os dias mais fáceis e felizes;
- A toda minha família: tios, tias, primos, primas, afilhado pelo apoio e amor durante a minha vida. Em especial a Rosangela e Angélica que estiveram comigo, me apoiando principalmente na minha vida acadêmica;
- Aos amigos adquiridos ao longo da vida (Tati, Cris e Ita) pelas horas de felicidade, amor e carinho e por terem conseguido fazer parte da família sem que eu ao menos tenha percebido;
- Aos amigos da vida acadêmica Roberta, Carol da Matta pelas risadas, dificuldades vencidas e a Carol Igansi pela amizade e carinho e dias de estudos e discussões que nos levaram ao mestrado;
- Aos amigos do grupo fito: Lucas, Pablo, Daniele, Tchana, Layanna e Savênia (amiga e co-autora) pelas discussões, momentos de descontração, companhia e diversão nos congressos;
- Ao prof. Dr. Danilo Giroldo pela orientação, incentivo na vida acadêmica, por ter servido de exemplo como profissional e principalmente pela oportunidade e confiança que me permitiu executar este trabalho;
- A todo pessoal do laboratório de limnologia pelo espaço, auxílio, disponibilidade e principalmente aqueles que apareciam na sala de microscopia e me descontraíam durante as intermináveis horas de contagem;
- Ao prof. Dr. Ednei Primel e a mestre Sergiane Caldas da Escola de Química e Alimentos - FURG que colaboraram com as determinações do carbofurano;
- Ao SESu/MEC pela bolsa REUNI e PRONEX CNPq/FAPERGS pelo auxílio financeiro ao projeto.

RESUMO

O desenvolvimento de atividades agrícolas e industriais tem conduzido à contaminação de ambientes aquáticos por compostos químicos raramente ou nunca encontrados na natureza. Os pesticidas, incluindo os inseticidas que são frequentemente usados para reduzir ou eliminar pragas, trazem grandes preocupações à população pelo seu uso indiscriminado. O carbofurano é um inseticida de amplo espectro utilizado mundialmente, cuja toxicidade para o fitoplâncton tem sido pouco estudada, bem como o potencial de sua degradação. Este trabalho visa avaliar a influência do carbofurano no crescimento de cinco espécies fitoplanctônicas dulcícolas subtropicais, bem como a degradação deste composto pelas microalgas. Foram montadas culturas de *Desmodesmus communis*, *Cosmarium depressum* var. *planctonicum*, *Pediastrum boryanum*, *Spondylosium pygmaeum* e *Xanthidium antilopaeum*, com adição de seis concentrações de carbofurano (10; 100; 500; 1.000; 5.000 e 10.000 µg/L). Um controle com algas e sem carbofurano e outro sem algas e com carbofurano foram preparados para mensurar o crescimento padrão e a degradação não biológica, respectivamente. As culturas (triplicata) foram mantidas por aproximadamente 13 dias para análise dos parâmetros de crescimento e toxicológicos. Além disso, foi avaliada a concentração de carbofurano por espectrometria de massa (LC-ESI-MS/MS) no início e no final dos experimentos. Quatro cepas apresentaram diferenças significativas entre o crescimento observado no controle e as concentrações mais elevadas enquanto *Pediastrum boryanum* não apresentou toxicidade. *Desmodesmus communis* e *Xanthidium antilopaeum* apresentaram maior crescimento nas concentrações intermediárias de carbofurano, possivelmente relacionado à metabolização e utilização do composto. As análises de carbofurano demonstraram degradação de aproximadamente 100% na presença das cepas, enquanto a degradação não biológica foi de no máximo 50%. Este processo já foi bem estudado em bactérias e fungos, enquanto, para microalgas, apenas a degradação de outros pesticidas havia sido documentada, sendo este o primeiro registro de degradação do carbofurano pelo fitoplâncton.

Palavras-chave: inseticida, microalga, cultivo, biodegradação, inibição.

ABSTRACT

Pesticides, such as insecticides, have risen public concern on their uncontrolled use. Carbofuran is a broad spectra worldwide used insecticide, whose toxicity for the phytoplankton has been scarcely studied, as well as its potential degradation. This work aims to evaluate the carbofuran influence on the growth of five subtropical freshwater phytoplanktonic strains, as well as the degradation of this pesticide by microalgae. Experimental cultures of *Desmodesmus communis*, *Cosmarium depressum* var. *planctonicum*, *Pediastrum boryanum*, *Spondylosium pygmaeum* and *Xanthidium antilopaeum*, were prepared with six carbofuran concentrations (10; 100; 500; 1,000; 5,000 and 10,000 mg/L). Also two controls were prepared to measure the regular growth of each microalgae and the non-biological degradation processes. Cultures (triplicates) were maintained for approximately 13 days, in order to determine both growth and toxicological parameters. Besides, we evaluated the carbofuran concentration by mass spectrometry (LC-ESI-MS/MS) in the beginning and in the end of the experiment. We found significant differences in the growth of high concentration carbofuran exposed cultures for four strains, and only *P. boryanum* showed no growth inhibition. *D. communis* and *X. antilopaeum* showed growth enhancement in intermediary carbofuran concentrations, probably related to the metabolization of this pesticide, which has been only reported to bacteria before. All strains were able to degrade almost 100% of the added carbofuran, while the non-biological degradation was up to 50%. Carbofuran degradation was only demonstrated before by bacteria and fungi species. Our data showed for the first time carbofuran degradation by phytoplanktonic strains.

Keywords: insecticide, microalgae, cultivation, biodegradation, inhibition.

Sumário

Agradecimentos	3
Resumo	4
Abstract	5
1. Introdução	7
2. Objetivo	12
3. Artigo a ser submetido ao Periódico Journal of Phycology	13
3.1. Introdução	15
3.2. Materiais e Métodos	16
3.2.1. Organismos e condições de cultivo	16
3.2.2. Experimentos	17
3.2.3. Amostragem	18
3.2.4. Análises estatísticas	19
3.3. Resultados	20
3.3.1. Crescimento celular	20
3.3.2. Degradação do carbofurano	35
3.4. Discussão	37
3.5. Conclusão	40
3.6. Referência Bibliográfica	41
3.7. Anexos	45
3.7.1. Normas do Periódico Journal of Phycology	45
3.7.2. Figuras estrutura molecular carbofurano e cepas	54

1. INTRODUÇÃO

As algas são organismos morfológicamente muito variados, compreendendo desde microalgas unicelulares até macroalgas com dezenas de metros de comprimento. Apresentam ampla distribuição geográfica, ocorrendo em oceanos, água doce, solos, rochas, geleiras, árvores, desertos entre outros graças às suas eficientes adaptações morfo-fisiológicas (Van den Hoek *et al.* 1995).

As microalgas adaptadas a viver parcialmente ou continuamente em águas abertas compõem o fitoplâncton, um importante compartimento ecológico dos sistemas aquáticos (Reynolds 2006). A comunidade fitoplantônica consiste num conjunto diversificado de algas, tendo como principais representantes na água doce as algas verdes (Divisão Chlorophyta), as cianobactérias (Divisão Cyanobacteria), as diatomáceas (Divisão Ochrophyta, Classe Bacillariophyceae), as crisofíceas (Divisão Ochrophyta, Classe Chrysophyceae), os dinoflagelados (Divisão Dinophyta) e as euglenofíceas (Divisão Euglenophyta) (Van den Hoek 1995; Esteves 1998; Reynolds 2006). Estes organismos desempenham importantes funções ecológicas, tais como a maior parte da produção primária de ambientes pelágicos, a produção de oxigênio e de compostos orgânicos extracelulares, além de refletir as características do sistema, funcionando como eficientes bioindicadores (Reynolds 2006).

O critério fundamental para estimar o estado ecológico das massas de água é a biodiversidade, a complexidade da organização estrutural-funcional do ecossistema aquático e o seu grau de estabilidade. Embora corpos de água que não estejam sujeitos a alterações antrópicas sejam raros, a conservação da qualidade da água é necessária para preservar a saúde da população, a biodiversidade, bem como as potencialidades paisagísticas e de lazer da natureza. As comunidades fitoplantônicas de água doce são vulneráveis à poluição e, ao mesmo tempo, tem elevada taxa de reprodução, o que lhes permite responder rapidamente à mudança nas condições ambientais (Sharov 2008).

O desenvolvimento das atividades agrícolas e industriais tem conduzido à síntese de compostos químicos, sobretudo orgânicos, cujas configurações estruturais envolvem átomos ou grupos funcionais raramente ou nunca encontrados na natureza (Zagatto e Bertolletti 2006). Uma vez introduzidos no ambiente, tais compostos, denominados xenobióticos, podem se tornar poluentes caso produzam efeitos indesejáveis em consequência de sua concentração e toxicidade. Qualquer composto encontrado na natureza acima de seus limites normais caracteriza-se como contaminante e, no momento em que tais níveis propiciem prejuízo a qualquer recurso ambiental, ele passa a ser considerado um poluente (Zagatto e Bertolletti 2006).

Ao atingirem o ambiente aquático, estes compostos passam por processos de transporte e transformação, podendo ser adsorvidos no sedimento, dissolvidos na água, ou podem ser perdidos para outros compartimentos ambientais por volatilização. Podem ainda sofrer reações químicas como hidrólise, oxidação ou fotólise, bem como ser biodegradados ou sofrer especiação com formação de novas espécies químicas. Além disso, estes compostos frequentemente podem se acumular em organismos após a sua introdução no ambiente (Zagatto e Bertolletti 2006).

A assimilação e a retenção de um contaminante por um organismo pode ocorrer por absorção direta a partir do ambiente ou por ingestão de alimento contaminado, possibilitando que os contaminantes possam ser transferidos de um nível trófico a outro na cadeia alimentar, aumentando a probabilidade de causar efeitos deletérios (Zagatto e Bertolletti 2006). Por outro lado, estes organismos bioacumuladores podem ser potenciais filtros biológicos para descontaminação de ambientes degradados, como por exemplo, no cultivo massivo de microalgas para descontaminação de efluentes industriais.

Alternativamente à bioacumulação, a biodegradação também é um processo com potencial utilização biotecnológica. Neste caso, podem ocorrer mudanças relativamente pequenas na molécula original, como substituição ou modificação de um grupo funcional, ou mesmo a completa destruição do composto, tendo como resultado final a formação de CO₂, H₂O

e sais orgânicos. Geralmente os produtos da biodegradação são formas moleculares que tendem a ocorrer na natureza (Zagatto e Bertoletti 2006). A biodegradação já foi descrita para vários pesticidas, incluindo o carbofurano (Felsot 1989; Head *et al.* 1992; Megharaj *et al.* 1994; Hussain *et al.* 2007; Cáceres *et al.* 2008).

O carbofurano é um composto utilizado mundialmente pertencente à classe dos inseticidas, cupinídeos, acaricidas e nematocidas. Encontra-se no grupo químico metilcarbamato de benzofuranila e apresenta a fórmula molecular $C_{12}H_{15}NO_3$ (figura 1), podendo ser empregado em aplicações no solo nas culturas de algodão, amendoim, arroz, banana, batata, café, cana-de-açúcar, cenoura, feijão, fumo, milho, repolho, tomate e trigo (ANVISA). No Rio Grande do Sul, o arroz é comumente cultivado e ocupa, atualmente, cerca de 1,105 milhão de hectares, com uma produção total de 8 milhões de toneladas, representando uma produtividade média de 8.000 kg ha^{-1} (IRGA, 2010). Nesta cultura, o uso de agrotóxicos para controle de pragas é rotineiro, incluindo o carbofurano.

Este inseticida é facilmente lavado das folhas e do solo, podendo entrar em contato com os ecossistemas de água doce, através da dispersão dos produtos pulverizados, lixiviação, escoamento superficial, ou derramamentos acidentais, e apresenta riscos potenciais para a flora e fauna aquáticas. O carbofurano é relativamente solúvel em água e hidrolisado com facilidade em meio básico, formando dióxido de carbono, 7- hidroxicarbofurano e metilamina (Peixoto 2007). O principal metabólito do carbofurano, formado tanto por ação de plantas quanto micro-organismos é um produto de oxidação, o 3-hidroxicarbofurano que também pode sofrer outras transformações e ser eliminado por volatilização ou sofrer conjugações. No ambiente, a permanência do carbofurano é controlada por processos de degradação que, dependendo do meio (solo, planta ou água), pode ser química ou biológica. É altamente tóxico para peixes, pássaros e humanos, sendo a sua ingestão diária aceitável de até 0,002 mg/kg/dia (Moreira *et al.* 2004).

A toxicidade do carbofurano está principalmente ligada à inibição da atividade de acetilcolinesterase, enzima que degrada a acetilcolina, neurotransmissor em sinapses

colinérgicas. A inibição de acetilcolinesterase causa uma acumulação de acetilcolina nas fendas sinápticas, ocorrendo alterações no sistema nervoso (FMC 1976).

Portanto, para tentar evitar a contaminação ambiental e seus efeitos indesejáveis na biota causados pelo descontrole no uso dos agrotóxicos, criou-se a Legislação Federal brasileira para agrotóxicos, onde estes só poderão ser produzidos, manipulados, importados, exportados, comercializados e utilizados no território nacional se previamente registrados no órgão federal competente, atendidas as diretrizes e exigências dos órgãos federais responsáveis pelos setores de agricultura, saúde e meio ambiente. O Decreto Federal nº 4074/2002 (BRASIL, 2002) da Lei Federal 7802/1989 - reza que, parte integrante do registro de qualquer produto novo e para reavaliação dos já existentes no mercado, o Ministério da Saúde através da Agencia Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) deverá realizar uma avaliação toxicológica do produto, baseada na Portaria nº 03/MS/SNVS, de 16/01/1992 (BRASIL, 1992). Outro requisito é a avaliação de risco ambiental dos agrotóxicos, estabelecendo suas classificações quanto ao potencial de periculosidade ambiental. Cabe ao Ministério do Meio Ambiente, através do Instituto Brasileiro de Meio Ambiente e Recursos Renováveis (IBAMA) com o uso da Portaria nº 84, 15/10/1996 fazer esta análise (BRASIL, 1996). O registro do agrotóxico é então efetuado pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA).

Segundo Grützmacher 2008, o canal São Gonçalo e o Rio Piratini apresentam níveis de carbofurano acima do normal em determinadas épocas do ano, principalmente nos meses de janeiro e fevereiro que é o período em que ocorrem as aplicações deste agrotóxico nas lavouras de arroz. Águas localizadas em pontos com menores altitudes, como as próximas do Laranjal (Pelotas, RS), apresentam maiores quantidades de resíduos de agrotóxicos, isto porque o escoamento ocorre em direção a estas regiões mais baixas, concentrando a maior parte destes resíduos.

O controle de agrotóxicos poluentes é de grande importância, porque eles são tóxicos e recalcitrantes. Várias técnicas de descontaminação estão disponíveis para a remoção de

contaminantes, embora nem todos sejam eficientes o suficiente para destruir estes compostos. Os microorganismos desempenham um papel importante na desintoxicação de compostos xenobióticos, e podem degradar estes contaminantes para produtos naturais, principalmente CO₂ e H₂O. O uso de microorganismos para biorremediação de agrotóxicos de sítios contaminados pode revelar-se uma alternativa viável de descontaminação sem a necessidade de métodos químicos e físicos, porque uma grande variedade de microorganismos é conhecida por utilizar pesticidas como sua única fonte de energia de carbono (Jiang *et al.* 2007).

Muitos estudos são publicados na literatura sobre a degradação de pesticidas com enfoque em bactérias. Há vários relatos sobre biodegradação do carbofurano e seus metabólitos por células microbianas, incluindo cepas como *Achromonobacter*, *Flavobacterium*, *Sphingomonas*, *Arthrobacter*, *Pseudomonas* (Chaudhry e Ali 1988; Tomasek e Karns 1989; Ramanand *et al.* 1991; Chapalmandugu e Chaudhry 1992; Chaudhry *et al.* 2002), *Mucor ramanians* e *Actinomycetes* (Jiyoung *et al.* 2007). No entanto, quando este processo se refere a algas encontra-se uma grande carência de estudos que ajudem a compreender melhor a forma como estes organismos atuam no ecossistema, visto que o fitoplâncton é a base da cadeia alimentar e importante para manter o equilíbrio de ambos ambientes aquáticos e terrestres. Portanto, existe a necessidade de investigar não apenas a influencia do carbofurano sobre o fitoplâncton, mas também o comportamento destas microalgas em relação à degradação e metabolização deste pesticida.

2. OBJETIVO

O objetivo geral deste trabalho foi avaliar a capacidade de degradação, bem como a toxicidade do carbofurano para cinco espécies fitoplanctônicas dulcícolas subtropicais. Os objetivos específicos foram os seguintes:

- Determinar parâmetros de crescimento de cada microalga, como rendimento total, taxa de crescimento e período para duplicação da biomassa, em diferentes concentrações de carbofurano.
- Determinar parâmetros toxicológicos do carbofurano, como percentual de inibição, EC50 e sensibilidade para cada microalga.
- Avaliar o percentual de degradação do carbofurano durante o crescimento de cada microalga.

**3. ARTIGO A SER SUBMETIDO AO PERIÓDICO JOURNAL OF PHYCOLOGY
(Fator de Impacto, 2, 239)**

**AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE E DEGRADAÇÃO DO CARBOFURANO POR CINCO
ESPÉCIES FITOPLANCTÔNICAS DULCÍCOLAS SUBTROPICAIS.**

Bicho, M. S.¹; Silveira, S. B.²; Primel, E. G.³; Caldas, S. S.⁴; Giroldo, D.⁵

¹ Programa de Pós-graduação em Biologia dos Ambientes Aquáticos Continentais, Instituto de Ciências Biológicas,
Universidade Federal de Rio Grande, Av. Itália, Km 8, Rio Grande, RS, Brasil, 96201-900

mbicho_01@yahoo.com.br

² Programa de Pós-graduação em Biologia dos Ambientes Aquáticos Continentais, Instituto de Ciências Biológicas,
Universidade Federal de Rio Grande, Av. Itália, Km 8, Rio Grande, RS, Brasil, 96201-900

³ Laboratório de Análise de Compostos Orgânicos e Metais, Escola de Química e Alimentos, Universidade Federal de Rio
Grande, Av. Itália, Km 8, Rio Grande, RS, Brasil, 96201-900

⁴ Laboratório de Análise de Compostos Orgânicos e Metais, Escola de Química e Alimentos, Universidade Federal de Rio
Grande, Av. Itália, Km 8, Rio Grande, RS, Brasil, 96201-900

⁵ Laboratório de Botânica Criptogâmica, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Rio Grande, Av. Itália,
Km 8, Rio Grande, RS, Brasil, 96201-900 dmbgirol@furg.br

Abstract

Pesticides, such as insecticides have risen public concern on their uncontrolled use. Carbofuran is a broad spectra worldwide used insecticide, whose toxicity for the phytoplankton has been scarcely studied, as well as its potential degradation. This work aims to evaluate the carbofuran influence on the growth of five subtropical freshwater phytoplanktonic strains, as well as the degradation of this pesticide by microalgae. Experimental cultures of *Desmodesmus communis*, *Cosmarium depressum* var. *planctonicum*, *Pediastrum boryanum*, *Spondylosium pygmaeum* and *Xanthidium antilopaeum*, were prepared with six carbofuran concentrations (10; 100; 500; 1,000; 5,000 and 10,000 mg/L). Also two controls were prepared to measure the regular growth of each microalgae and the non-biological degradation processes. Cultures (triplicates) were maintained for approximately 13 days, in order to determine both growth and toxicological parameters. Besides, we evaluated the carbofuran concentration by mass spectrometry (LC-ESI-MS/MS) in the beginning and in the end of the experiment. We found significant differences in the growth of high concentration carbofuran exposed cultures for four strains, and only *P. boryanum* showed no growth inhibition. *D. communis* and *X. antilopaeum* showed growth enhancement in intermediary carbofuran concentrations, probably related to the metabolization of this pesticide, which has been only reported to bacteria before. All strains were able to degrade almost 100% of the added carbofuran, while the non-biological degradation was up to 50%. Carbofuran degradation was only demonstrated before by bacteria and fungi species. Our data showed for the first time carbofuran degradation by phytoplanktonic strains.

Keywords: insecticide, microalgae, cultivation, biodegradation, inhibition.

3.1. INTRODUÇÃO

As alterações dos ecossistemas de água doce por atividades humanas têm sido motivo de preocupação frequente. A necessidade de aumento na produtividade de sistemas agrícolas conduz à síntese de compostos químicos, sobretudo orgânicos, cujas configurações estruturais envolvem átomos ou grupos funcionais raramente ou nunca encontrados na natureza (Zagatto e Bertoletti 2006). Uma vez introduzidos no ambiente, tais compostos, denominados xenobióticos, podem se tornar poluentes caso produzam efeitos indesejáveis em consequência de sua concentração e toxicidade.

Os principais produtos utilizados comercialmente são compostos sintéticos com alta atividade biológica e geralmente tóxicos. O carbofurano é um inseticida do grupo químico metilcarbamato de benzofuranila empregado mundialmente e aplicado no Brasil em culturas de algodão, arroz, banana, fumo, milho, entre outros (ANVISA). Este inseticida é facilmente lavado das folhas e do solo, podendo entrar em contato com os ecossistemas de água doce, através da dispersão dos produtos pulverizados, lixiviação, escoamento superficial, ou derramamentos acidentais, e apresenta riscos potenciais para a flora e fauna aquáticas (Ma *et al.* 2006). No ambiente, a permanência do carbofurano é controlada por processos de degradação que, dependendo do meio (solo, planta ou água), pode ser química ou biológica. É altamente tóxico para peixes, pássaros e humanos, sendo a sua ingestão diária aceitável de até 0,002 mg/kg/dia (Moreira *et al.* 2004).

Sistemas subtropicais brasileiros de água doce, como o manancial da cidade de Rio Grande (canal São Gonçalo) apresentam níveis de carbofurano acima do normal em determinadas épocas do ano, principalmente nos meses de janeiro e fevereiro que é o período em que ocorrem as aplicações deste agrotóxico nas lavouras de arroz (Grützmacher 2008).

O controle de agrotóxicos é de grande importância, por isso diversas técnicas de descontaminação estão disponíveis para a remoção destes contaminantes, embora nem todos sejam eficientes o suficiente para destruir estes compostos. Os microorganismos desempenham

um papel importante na desintoxicação de compostos xenobióticos, e podem degradar estes contaminantes, principalmente em CO₂ e H₂O (Felsot 1989; Head *et al.* 1992; Megharaj *et al.* 1994; Hussain *et al.* 2007; Cáceres *et al.* 2008). O uso de microorganismos para biorremediação de agrotóxicos de sítios contaminados pode revelar-se uma alternativa viável de descontaminação sem a necessidade de métodos químicos e físicos, porque uma grande variedade de microorganismos é conhecida por utilizar pesticidas como sua única fonte de energia de carbono (Jiang *et al.* 2007).

Muitos estudos foram publicados na literatura sobre a degradação de pesticidas com enfoque em bactérias. Há vários relatos sobre biodegradação do carbofurano e seus metabólitos por células microbianas, incluindo cepas como *Achromonobacter*, *Flavobacterium*, *Sphingomonas*, *Arthrobacter*, *Pseudomonas* (Chaudhry e Ali 1988; Tomasek e Karns 1989; Chapalmandugu e Chaudhry 1992; Ramanand *et al.* 1991; Chaudhry *et al.* 2002), *Mucor ramanians* e *Actinomycetes* (Jiyoung *et al.* 2007). No entanto, quando este processo se refere a algas encontra-se uma grande carência de estudos que ajudem a compreender melhor a forma como estes organismos atuam no ecossistema. Desta forma, o presente estudo teve como objetivo avaliar a capacidade de degradação do inseticida carbofurano por cinco espécies de microalgas dulcícolas subtropicais, bem como a influência deste composto no crescimento das cepas.

3.2. MATERIAIS E MÉTODOS

3.2.1. Organismos e condições de cultivo

As microalgas utilizadas neste trabalho foram isoladas pela técnica da micro-manipulação ao microscópio a partir de amostras planctônicas coletadas de lagos subtropicais localizados no extremo sul do Brasil. As cepas estão sendo mantidas na Coleção de Culturas de Microalgas Continentais do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Rio Grande (CCMD-FURG).

Foram utilizadas neste trabalho cinco cepas da Divisão Chlorophyta (figura 2), sendo duas pertencentes à Classe Chlorophyceae, Ordem Chlorococcales (*Desmodesmus communis* e *Pediastrum boryanum*) e três pertencentes à Classe Zygnematophyceae, Ordem Desmidiiales (*Cosmarium depressum* var. *planctonicum*, *Xanthidium antilopaeum* e *Spondylosium pygmaeum*). Os experimentos e os inóculos foram mantidos em uma sala de incubação com irradiância controlada em aproximadamente $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, fotoperíodo ajustado com ciclos de 14:10 h claro:escuro e temperatura de $23 \pm 1^\circ\text{C}$.

3.2.2. Experimentos

Foram preparadas culturas experimentais, utilizando frascos Erlenmeyers de 250 mL, com 140 mL de meio WC/2 (Guillard e Lorenzen, 1972). Foi adicionado um volume de inóculo de cada cepa, de modo que a cultura assumisse uma densidade óptica final de 0,008 unidades arbitrárias, determinada por espectrofotometria em um comprimento de onda de 680 nm (Shimadzu, UV mini – 1240, Kyoto, Japão), padronizando a concentração celular em todos os experimentos (Ma *et al.* 2006). Seis concentrações de carbofurano foram testadas a partir do limite máximo permitido pela legislação brasileira (CONAMA, resolução n° 357, de 17 de março de 2005) para carbamatos totais em águas da classe I, até uma concentração próxima a regularmente utilizada em lavouras de diversas culturas, conforme estabelecido pelo fornecedor (10; 100; 500; 1.000; 5.000 e 10.000 $\mu\text{g/L}$). Para a adição de carbofurano foi utilizado o composto comercial FURADAN 350 SC. Também foram preparados dois controles com o objetivo de verificar o crescimento padrão das microalgas sem adição de carbofurano e determinar a degradação não biológica do carbofurano. Para o primeiro controle foram elaboradas culturas idênticas às experimentais, mas sem a adição de carbofurano. Para o segundo controle, foram elaborados meios de cultura com 140 mL de meio WC/2 com 10.000 $\mu\text{g/L}$ de carbofurano, sem adição do inóculo.. Todas as culturas foram elaboradas em triplicata, totalizando 24 culturas por experimento, e mantidas por aproximadamente 13 dias nas condições acima detalhadas com amostragens periódicas como descritas a seguir.

3.2.3. Amostragem

Alíquotas de 10 mL foram retiradas a cada 24 h durante os quatro primeiros dias e a cada 72 h até o final do experimento para monitorar o crescimento das microalgas. Uma fração de 5 mL foi fixada com lugol acético e mantida em geladeira para determinar a densidade celular por contagens diretas em microscópio, utilizando um hemocitômetro do tipo “improved Neubauer”. Os 5 mL restantes foram centrifugados em eppendorfs por 15 minutos a 15.000 RPM numa centrífuga Sigma 2K15 (Osterode am Harz, Alemanha). O sobrenadante foi reservado para descontaminação e posterior descarte, enquanto o precipitado foi utilizado para a análise de clorofila-a após extração em metanol absoluto por 24 h no escuro a -4 °C. A concentração final de clorofila-a foi determinada pela leitura em espectrofotômetro (Shimadzu, UV mini – 1240, Kyoto, Japão) nos comprimentos de onda de 665 e 750 nm, cujos valores foram transformados em microgramas de clorofila-a por litro de acordo com a equação descrita por Mackinney (1941).

Além disso, uma amostra de 20 mL de cada cultura foi retirada no início e no fim do experimento para a detecção do carbofurano. Esta amostra foi filtrada em filtros GF-3 (Macherey-Nagel, Düren, Alemanha), com 0,45 µm de poro, e o filtrado foi analisado imediatamente para determinar a concentração de carbofurano no meio de cultura. O filtro foi armazenado, congelado e posteriormente foram adicionados 10 ml de água. Aplicou-se um tratamento de ultrassom a uma potência de 750 W e frequência de 20 kHz com uma sonda modelo VC 750 (Sonics and Materials, Inc., EUA) para romper as células. A transmissão das ondas foi feita com o auxílio de um “probe” de titânio com dimensões de ½ e 254 mm e o tempo de ultrassom variou de acordo com a necessidade para romper as células de cada espécie. Foram aplicados mais dois ciclos de congelamento e descongelamento às amostras, que foram finalmente filtradas em filtros GF-3 (Macherey-Nagel, Düren, Alemanha) e o filtrado foi utilizado para determinar a concentração intracelular e adsorvida do composto.

As análises de carbofurano foram realizadas em um 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. O percentual de degradação do carbofurano foi calculado a partir da somatória da concentração final de carbofurano intra e extracelular em relação à concentração inicial do mesmo.

3.2.4. Análises estatísticas

Para analisar o comportamento de crescimento das cinco cepas, durante os 13 dias de cultivo, considerando as seis concentrações testadas e o controle, foi aplicada a análise de variância ANOVA bifatorial com teste *post-hoc* de Tukey HSD nos dados de densidade celular. Para verificar se o carbofurano influencia a velocidade de crescimento de cada cepa individualmente, foi aplicada uma análise de variância ANOVA “one-way” com teste *post-hoc* de Tukey HSD com as taxas de crescimento observadas nas seis concentrações a que cada cepa foi exposta. Para determinar a toxicidade após 96 horas e ao final do experimento foi aplicada uma análise de variância ANOVA “one-way” com teste *post-hoc* de Dunnett comparando a densidade celular do controle com as concentrações nos períodos acima descritos.

Os valores de EC50 (concentração que inibe 50% do crescimento efetivo) foram calculados após 13 dias de cultivo a partir de uma análise de regressão linear entre a concentração de carbofurano e a porcentagem de inibição do crescimento. Esta foi calculada a partir dos valores de densidade celular do controle em relação à densidade celular observada em cada concentração de carbofurano. A sensibilidade foi calculada a partir do valor de EC50, pois estes são inversamente proporcionais (Ma *et al.* 2006).

3.3. RESULTADOS

3.3.1. Crescimento celular

As Figuras 3 a 7 mostram respectivamente o crescimento de *Desmodesmus communis*, *Cosmarium depressum var. planctonicum*, *Xanthidium antilopaeum*, *Pediastrum boryanum* e *Spondylosium pygmaeum* monitorados pela densidade celular. Todas as cepas mostraram uma fase exponencial de crescimento iniciada a partir do 4º dia, estendendo-se até o final dos experimentos, com exceção de *X. antilopaeum*, que teve o crescimento exponencial iniciado após 13 dias de experimento. Por este motivo, esta cepa foi mantida até o 34º dia, até que o crescimento exponencial estivesse caracterizado, sendo que a densidade celular foi mais baixa nas concentrações de 5.000, 10.000 µg/L e também no controle, conforme mostrado na Figura 5 (ANOVA bifatorial, Tukey $p < 0,05$). As maiores densidades foram obtidas em *S. pygmaeum*, *D. communis* e *C. depressum var. planctonicum* respectivamente, enquanto as menores densidades ocorreram em *X. antilopaeum* e *P. boryanum*. Os resultados de densidade celular para todas as cepas apontaram que houve diferença significativa de crescimento entre as culturas expostas à maior concentração de carbofurano (10.000 µg/L) e o controle e outras concentrações, exceto *P. boryanum*, (ANOVA bifatorial, Tukey $p < 0,05$). A maior percepção ao carbofurano ocorreu em *D. communis* e *X. antilopaeum*, cujo crescimento foi inibido também na concentração de 5.000 µg/L, conforme observado na Figura 3 e 5 (ANOVA bifatorial, Tukey $p < 0,05$). Durante as contagens em microscópio óptico pode-se observar que nas concentrações 5.000 e 10.000µg/L, ocorreram deformações nas células, fato este não observado apenas em *P. boryanum*.

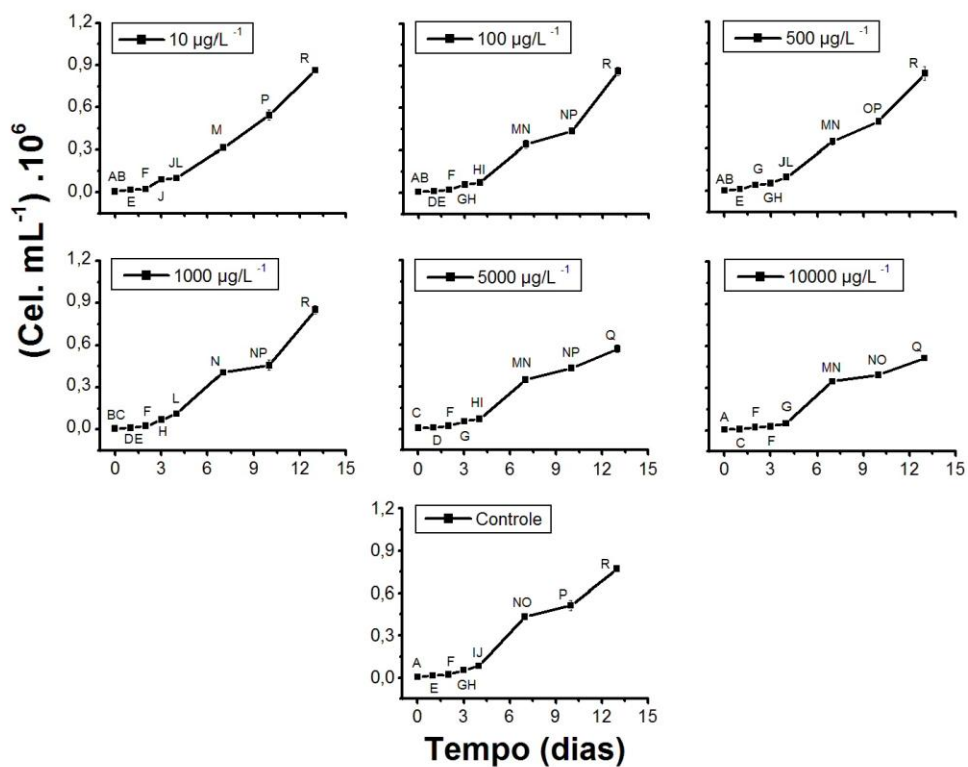


Figura 3: Densidade celular de *Desmodemus communis* em função do tempo de cultivo em seis diferentes concentrações de carbofurano e um controle sem adição do composto. As barras de erro representam o desvio padrão. As diferentes letras significam diferenças significativas de densidade celular (ANOVA bifatorial, Tukey $p < 0,05$).

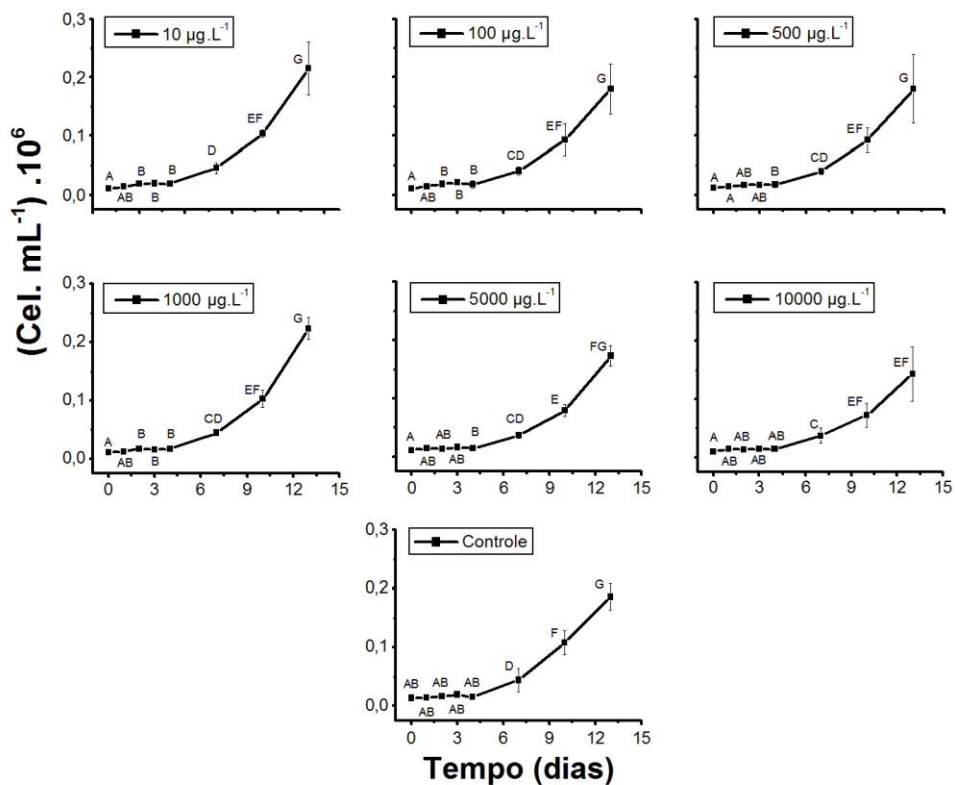


Figura 4: Densidade celular de *Cosmarium depressum* var. *planctonicum* em função do tempo de cultivo em seis diferentes concentrações de carbofurano e um controle sem adição do composto. As barras de erro representam o desvio padrão. As diferentes letras significam diferenças significativas de densidade celular (ANOVA bifatorial, Tukey $p < 0,05$).

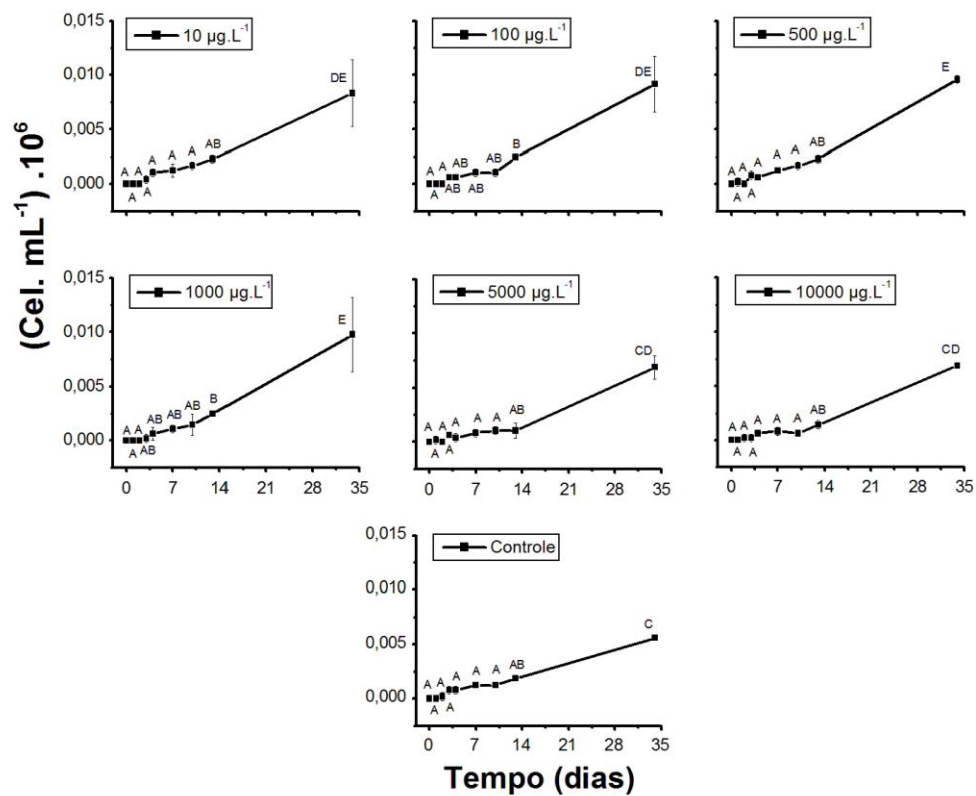


Figura 5: Densidade celular de *Xanthidium antilopaeum* em função do tempo de cultivo em seis diferentes concentrações de carbofurano e um controle sem adição do composto. As barras de erro representam o desvio padrão. As diferentes letras significam diferenças significativas de densidade celular (ANOVA bifatorial, Tukey $p < 0,05$).

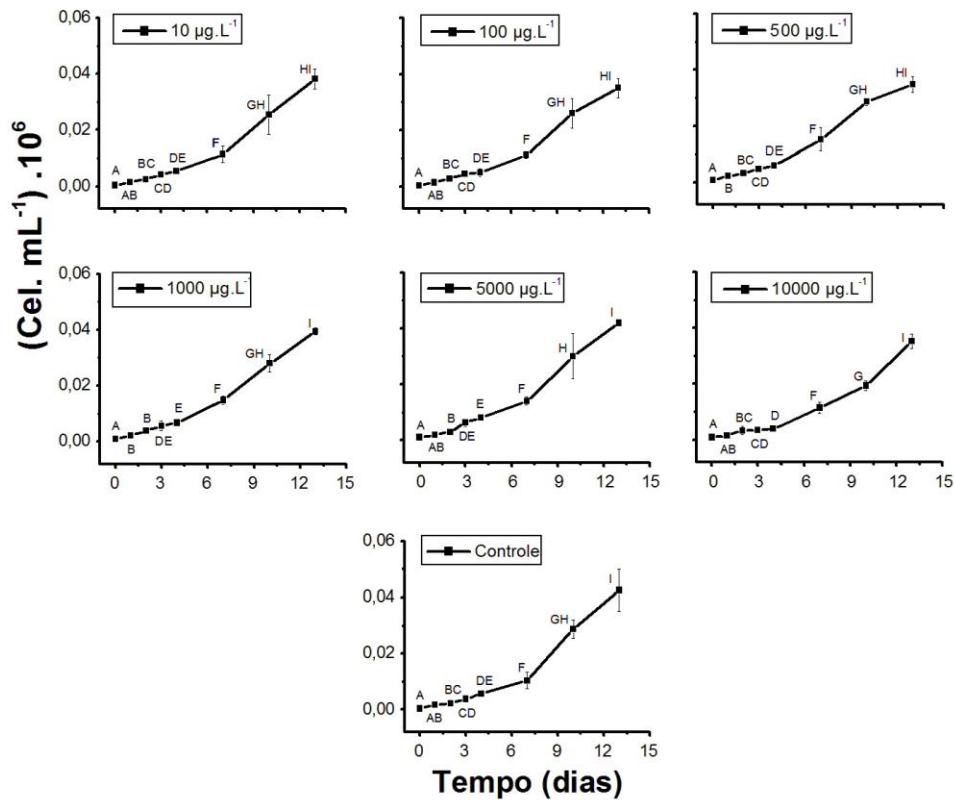


Figura 6: Densidade celular de *Pediastrum boryanum* em função do tempo de cultivo em seis diferentes concentrações de carbofurano e um controle sem adição do composto. As barras de erro representam o desvio padrão. As diferentes letras significam diferenças significativas de densidade celular (ANOVA bifatorial, Tukey $p < 0,05$).

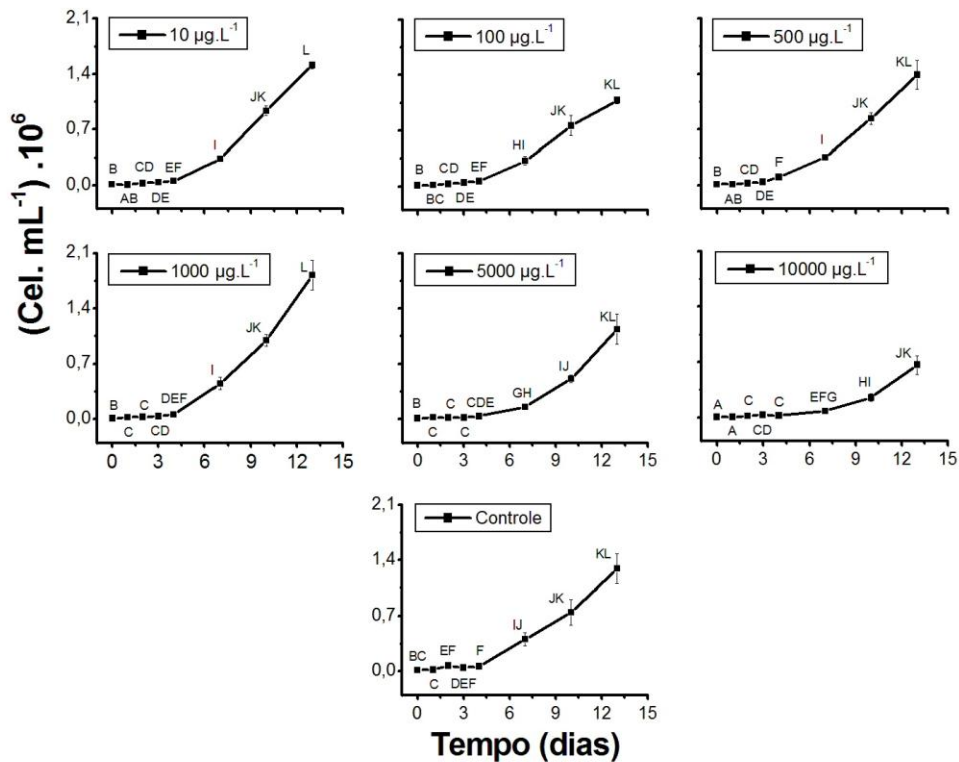


Figura 7: Densidade celular de *Spondylosium pygmaeum* em função do tempo de cultivo em seis diferentes concentrações de carbofurano e um controle sem adição do composto. As barras de erro representam o desvio padrão. As diferentes letras significam diferenças significativas de densidade celular (ANOVA bifatorial, Tukey $p < 0,05$).

As Figuras 8 a 12 mostram respectivamente o crescimento de *Desmodesmus communis*, *Cosmarium depressum* var. *planctonicum*, *Xanthidium antilopaeum*, *Pediastrum boryanum* e *Spondylosium pygmaeum*, monitorados pela clorofila-a. Quase todas as cepas apresentaram fase exponencial de crescimento a partir do 4º dia, com exceção de *X. antilopaeum* que iniciou esta fase no 13º dia, esta fase se estendeu até o final em quase todos os experimentos, fato este não ocorrido apenas em *D. communis* que a partir do 7º dia entrou na fase estacionária de crescimento. A análise mostrou que as maiores clorofilas foram obtidas em *S. pygmaeum* e *C. depressum* var. *planctonicum*, enquanto as menores clorofilas ocorreram em *D. communis*, *P. boryanum* e *X. antilopaeum*. Os resultados de clorofila-a para todas as cepas apontaram o mesmo padrão de crescimento encontrado em densidade celular. No entanto, a análise subestimou os

dados nos experimentos realizados com *D. communis* e *P. boryanum*, pois o método com metanol apresentou dificuldade para romper as células destas cepas.

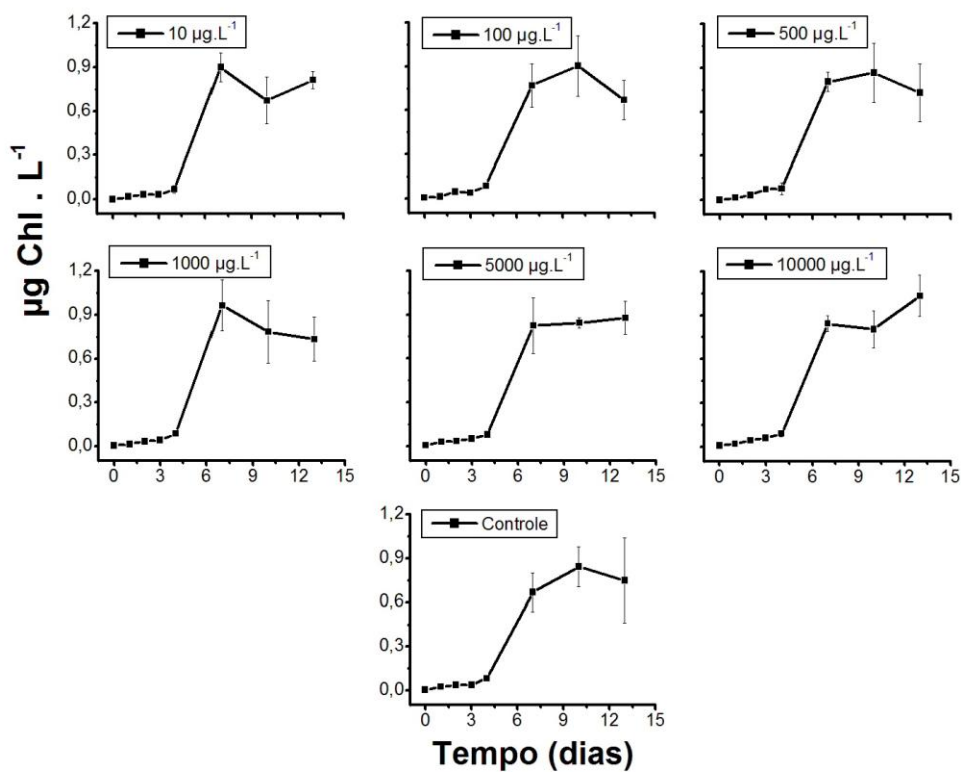


Figura 8: Concentração de clorofila-a ($\mu\text{g.L}^{-1}$) de *Desmodemus communis* em função do tempo de cultivo em seis diferentes concentrações de carbofurano e um controle sem adição do composto. As barras de erro representam o desvio padrão.

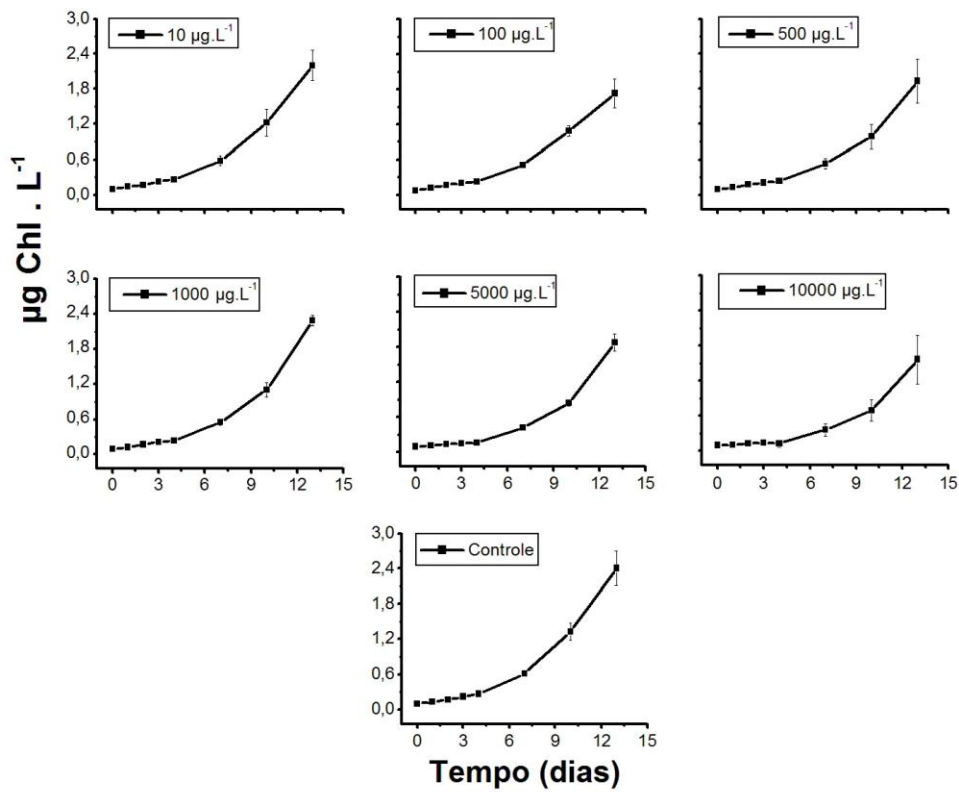


Figura 9: Concentração de clorofila-a ($\mu\text{g.L}^{-1}$) de *Cosmarium depressum var. planctonicum* em função do tempo de cultivo em seis diferentes concentrações de carbofurano e um controle sem adição do composto. As barras de erro representam o desvio padrão.

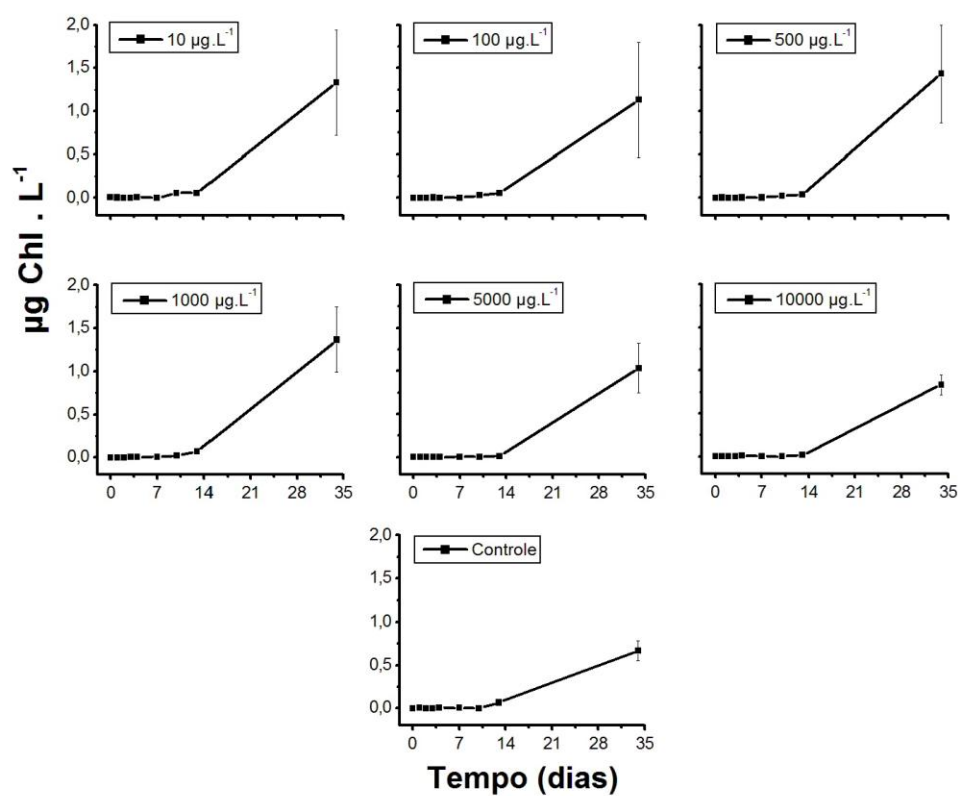


Figura 10: Concentração de clorofila-a ($\mu\text{g.L}^{-1}$) de *Xanthidium antilopaeum* em função do tempo de cultivo em seis diferentes concentrações de carbofurano e um controle sem adição do composto. As barras de erro representam o desvio padrão.

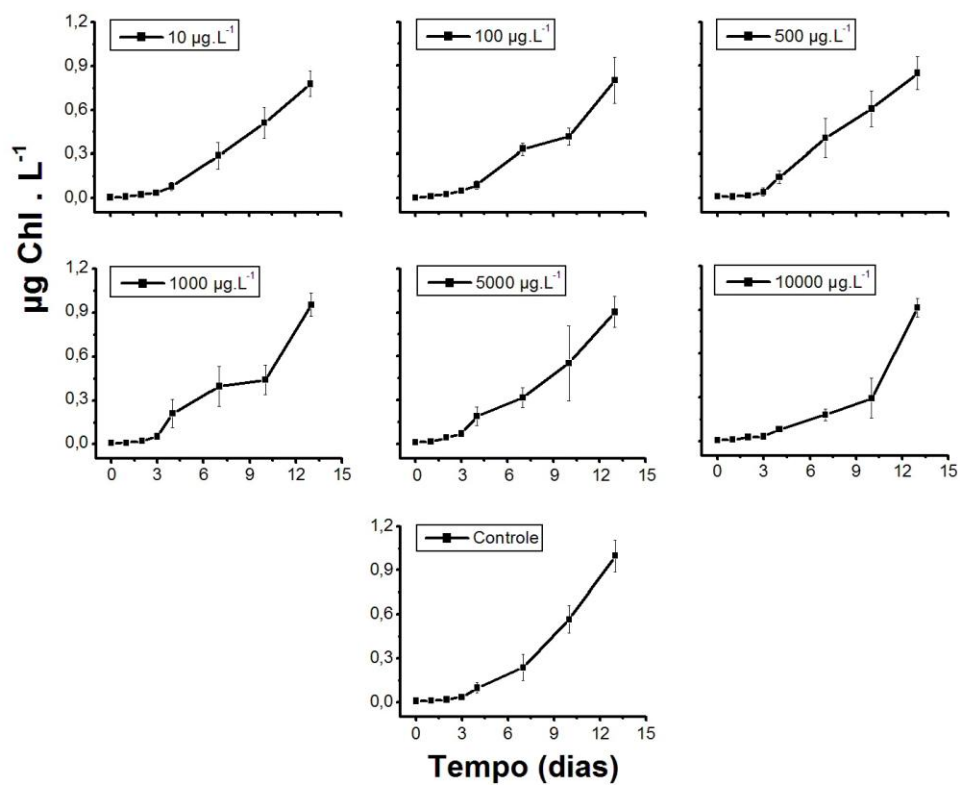


Figura 11: Concentração de clorofila-a ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) de *Pediastrum boryanum* em função do tempo de cultivo em seis diferentes concentrações de carbofurano e um controle sem adição do composto.

As barras de erro representam o desvio padrão.

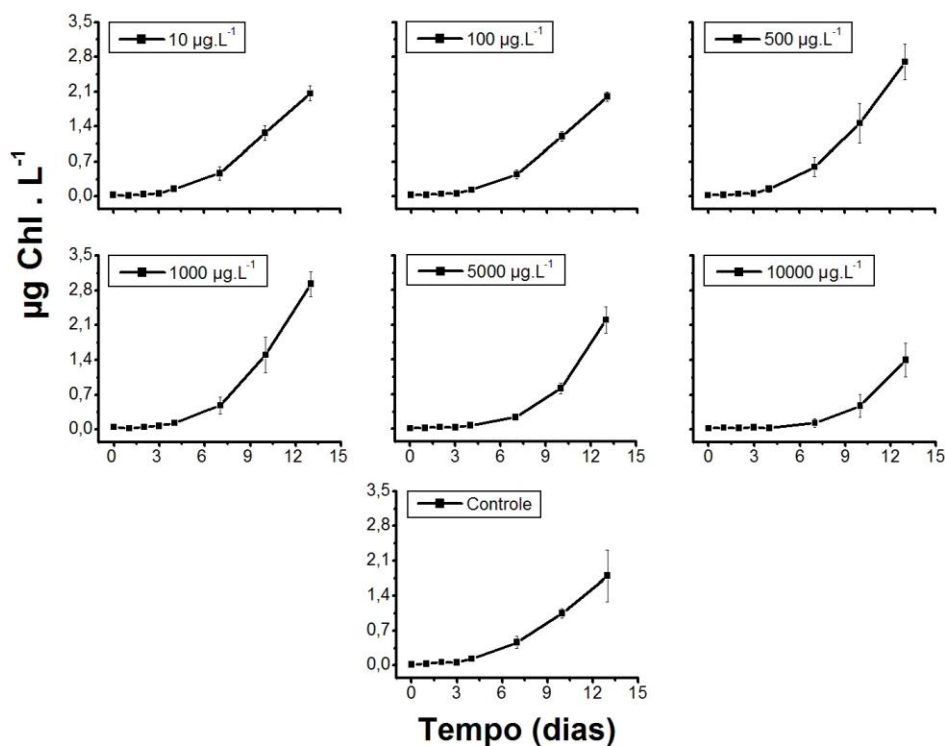


Figura 12: Concentração de clorofila-a ($\mu\text{g.L}^{-1}$) de *Spondylosium pygmaeum* em função do tempo de cultivo em seis diferentes concentrações de carbendazim e um controle sem adição do composto. As barras de erro representam o desvio padrão.

A Tabela 1 mostra respectivamente a taxa intrínseca de crescimento (r), taxa de crescimento convertida para duplicações por dia (k) e o tempo para biomassa ser duplicada (G), calculadas para a densidade celular. A taxa intrínseca de crescimento e a taxa de crescimento convertida para duplicações por dia foram maiores nas culturas com *Spondylosium pygmaeum*, *Desmodesmus communis* e *Cosmarium depressum var. planctonicum* respectivamente, enquanto os menores valores ocorreram em *Xanthidium antilopaeum* e *Pediastrum boryanum*. Consequentemente o tempo para a biomassa ser duplicada foi maior em *X. antilopaeum* e *P. boryanum* e menor em *S. pygmaeum*, *D. communis* e *C. depressum var. planctonicum*. As taxas mostram que não houve diferença significativa na velocidade de crescimento entre as concentrações e o controle em cada experimento, mas apresentaram diferenças entre a concentração de 10.000 $\mu\text{g/L}$ e as concentrações de 500, 1.000 e 5.000 $\mu\text{g/L}$ para *S. pygmaeum* (ANOVA “one-way”, Tukey $p < 0,05$).

Tabela 1: Taxa intrínseca de crescimento (R), taxa de crescimento convertida para duplicação por dia (K) e tempo para biomassa ser duplicada (G) das cinco cepas em seis diferentes concentrações de carbofurano e um controle sem adição do composto. Os intervalos indicam o desvio padrão. As diferentes letras significam diferenças significativas nas taxas de crescimento (ANOVA “one-way”, *post-hoc* Tukey $p < 0,05$).

	R	K	G
<i>Desmodesmus communis</i>			
10	0,21±0,025	0,31±0,04	3,2±0,36
100	0,18±0,036	0,25±0,05	3,9±0,85
500	0,18±0,01	0,25±0,02	3,8±0,25
1000	0,23±0,043	0,33±0,06	3,1±0,53
5000	0,19±0,040	0,28±0,05	3,7±0,82
10000	0,19±0,011	0,28±0,02	3,5±0,17
Controle	0,16±0,03	0,23±0,04	4,4±0,85
<i>Cosmarium depressum var. planctonicum</i>			
10	0,2±0,026	0,28±0,024	3,5±0,53
100	0,15±0,026	0,21±0,022	4,6±0,77
500	0,17±0,034	0,24±0,026	4,1±0,98
1000	0,21±0,01	0,30±0,009	3,3±0,2
5000	0,17±0,011	0,25±0,01	3,9±0,29
10000	0,14±0,035	0,20±0,029	5,0±1,2
Controle	0,22±0,03	0,31±0,026	3,1±0,40
<i>Xanthidium antilopaeum</i>			
10	0,053±0,025	0,09±0,028	15,2±7,3
100	0,046±0,029	0,063±0,040	18,3±8,3
500	0,056±0,025	0,08±0,036	14,4±7,6
1000	0,053±0,015	0,07±0	13,7±3,7
5000	0,043±0,011	0,06±0,017	16,9±5,3
10000	0,036±0,006	0,053±0,011	19,2±3,3
Controle	0,023±0,006	0,033±0,006	30,8±6,6
<i>Pediastrum boryanum</i>			
10	0,068±0,008	0,1±0,01	10,2±1,19
100	0,070±0,014	0,1±0,017	10,1±1,90
500	0,076±0,010	0,11±0,017	9,2±1,15
1000	0,085±0,007	0,12±0,01	8,2±0,75
5000	0,078±0,009	0,11±0,01	9,0±1,11
10000	0,080±0,006	0,12±0,006	8,7±0,66
Controle	0,088±0,010	0,12±0,015	7,9±0,95
<i>Spondylosium pygmaeum</i>			
10	0,2±0,01	0,28±0,015	^{ab} 3,5±0,15
100	0,19±0,01	0,26±0,006	^{ab} 3,6±0,15
500	0,26±0,030	0,38±0,046	^b 2,7±0,30
1000	0,28±0,025	0,40±0,040	^b 2,5±0,25
5000	0,22±0,026	0,31±0,041	^b 3,2±0,38
10000	0,14±0,029	0,19±0,040	^a 5,2±0,98
Controle	0,17±0,046	0,25±0,069	^{ab} 4,3±1,3

A Tabela 2 mostra a inibição e o estímulo ao crescimento na presença de carbofurano após 96 horas (4 dias) e 13 dias para as cinco cepas testadas nas seis concentrações e 34 dias apenas para *Xanthidium antilopaeum*. Ocorreu redução significativa na densidade celular observada na concentração de 10.000 µg/L em relação ao controle após 96 horas em *Desmodesmus communis* e *Spondylosium pygmaeum*. Por outro lado, o 13º dia apresentou redução significativa em relação ao controle na concentração de 10.000 µg/L para *S. pygmaeum*, *Cosmarium depressum var. planctonicum* e *D. communis*, sendo que este apresentou inibição também na concentração de 5.000 µg/L (ANOVA “one-way”, Dunnett p<0,05). A análise também mostrou que algumas culturas apresentaram crescimento significativamente maior que o controle. Após 96 horas, *D. communis* e *Pediastrum boryanum* já mostraram maior crescimento em 10, 500 e 1000 µg/L para o primeiro e 5000 µg/L para o segundo. No entanto, após 13 dias *D. communis* e *S. pygmaeum* apresentaram crescimento significativamente maior que o controle nas concentrações de 10, 100, 500 e 1000 µg/L para o primeiro e 1000 µg/L para o segundo. Por outro lado, *X. antilopaeum* depois de 34 dias mostrou maior crescimento nas concentrações de 10, 100, 500 e 1.000 µg/L (ANOVA “one-way”, Dunnett p<0,05).

Tabela 2: Inibição e estímulo ao crescimento após 4, 13 e 34* dias de exposição ao carbofurano, representadas pela diferença significativa entre o controle e as concentrações testadas para as cinco espécies (ANOVA “one-way”, *post-hoc* de Dunnett com $p < 0,05$). As setas \downarrow \uparrow indicam diferenças significativas na densidade celular entre o controle e as concentrações, sendo que \downarrow demonstra menor (inibição) e \uparrow maior (estímulo) crescimento em relação ao controle. * Apenas para *Xanthidium antilopaeum*.

	10	100	500	1.000	5.000	10.000
<i>Desmodesmus communis</i>						
04	$\uparrow < 0,05$	0,14	$\uparrow < 0,05$	$\uparrow < 0,05$	0,11	$\downarrow < 0,05$
13	$\uparrow < 0,05$	$\uparrow < 0,05$	$\uparrow < 0,05$	$\uparrow < 0,05$	$\downarrow < 0,05$	$\downarrow < 0,05$
<i>Cosmarium depressum var. planctonicum</i>						
04	0,59	0,06	0,06	0,98	0,99	0,36
13	0,05	0,99	0,77	0,37	0,19	$\downarrow < 0,05$
<i>Xanthidium antilopaeum</i>						
04	0,93	0,93	0,93	0,93	0,48	0,93
13	0,55	0,20	0,55	0,20	0,55	0,55
34*	$\uparrow < 0,05$	$\uparrow < 0,05$	$\uparrow < 0,05$	$\uparrow < 0,05$	0,08	0,08
<i>Pediastrum boryanum</i>						
04	0,99	0,79	0,97	0,49	$\uparrow < 0,05$	0,06
13	0,57	0,11	0,10	0,85	0,99	0,13
<i>Spondylosium pygmaeum</i>						
04	0,99	0,99	0,14	0,99	0,13	$\downarrow < 0,05$
13	0,46	0,39	0,95	$\uparrow < 0,05$	0,63	$\downarrow < 0,05$

A Tabela 3 mostra que o carbofurano apresentou valores de EC50 semelhante entre *Desmodesmus communis*, *Cosmarium depressum var. planctonicum* e *Spondylosium pygmaeum*, sendo este último com o menor valor (11.896,3 $\mu\text{g/L}$) e o primeiro com o maior valor (13.631,7 $\mu\text{g/L}$). No entanto, *Xanthidium antilopaeum* apresentou EC50 um pouco mais elevado (19.024,6 $\mu\text{g/L}$), enquanto *Pediastrum boryanum* obteve EC50 igual a zero. Estes resultados também foram encontrados para a análise de sensibilidade, onde *S. pygmaeum*, *D. communis* e *C. depressum var. planctonicum* são as cepas mais sensíveis e *X. antilopaeum* a menos sensível e *P. boryanum* não apresentou sensibilidade (Figura 13).

Tabela 3: Toxicidade do carbofurano sobre as cinco cepas, calculada a partir do valor de EC50 após 13 dias de cultivo.

Cepa	Coefficiente de correlação	Nível de significância	EC 50 ($\mu\text{g/L}$ de carbofurano)
<i>Desmodesmus communis</i>	0,9644	0,0019	13.631,7
<i>Cosmarium depressum</i> <i>var. planctonicum</i>	0,9837	0,000395	12.955,7
<i>Xanthidium antilopaeum</i>	0,9147	0,0106	19.024,6
<i>Pediastrum boryanum</i>	0,0864	0,870	0
<i>Spondylosium pygmaeum</i>	0,8964	0,0155	11.896,3

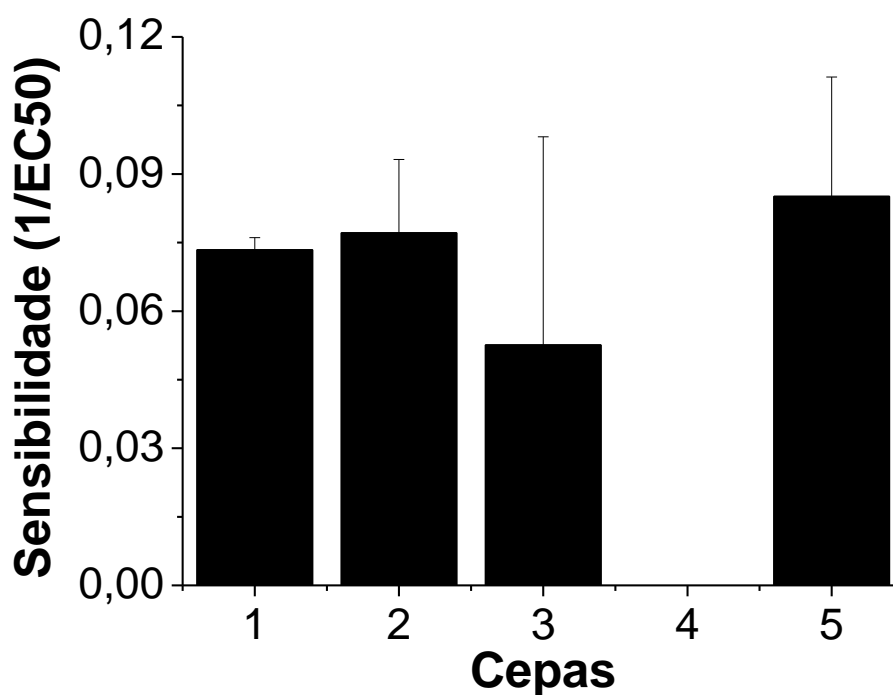


Figura 13: Sensibilidade de *Desmodesmus communis* (1), *Cosmarium depressum* var. *planctonicum* (2), *Xanthidium antilopaeum* (3), *Pediastrum boryanum* (4) e *Spondylosium pygmaeum* (5) ao carbofurano. As barras de erro representam o desvio padrão.

3.3.2. Degradação do carbofurano

A Figura 14 apresenta a percentagem de degradação do carbofurano realizada por *Desmodesmus communis*, *Cosmarium depressum var. planctonicum*, *Xanthidium antilopaeum*, *Pediastrum boryanum* e *Spondylosium pygmaeum*. As concentrações de 100, 500, 1.000, 5.000 e 10.000 µg/L apresentaram entre 99 e 100% de degradação nos experimentos realizados com *C. depressum var. planctonicum*, *D. communis* e *S. pygmaeum*, no entanto a concentração de 10 µg/L teve uma variação entre 84 e 98% de degradação para estas mesmas cepas. No experimento com *P. boryanum* todas as concentrações de carbofurano apresentaram 100% de degradação. As menores percentagens de degradação ocorreram em *X. antilopaeum* principalmente até o 13º dia de experimento quando as concentrações de 10 (75%), 100 (57%), 500 (59%), 1.000 (54%), 5.000 (9,4%) e 10.000 (8,1%) µg/L foram reduzindo a percentagem de degradação com o aumento da concentração do composto. Contudo, no final do experimento com *X. antilopaeum* (34 dias) a percentagem de degradação aumentou variando entre 90 e 99% em todas as concentrações.

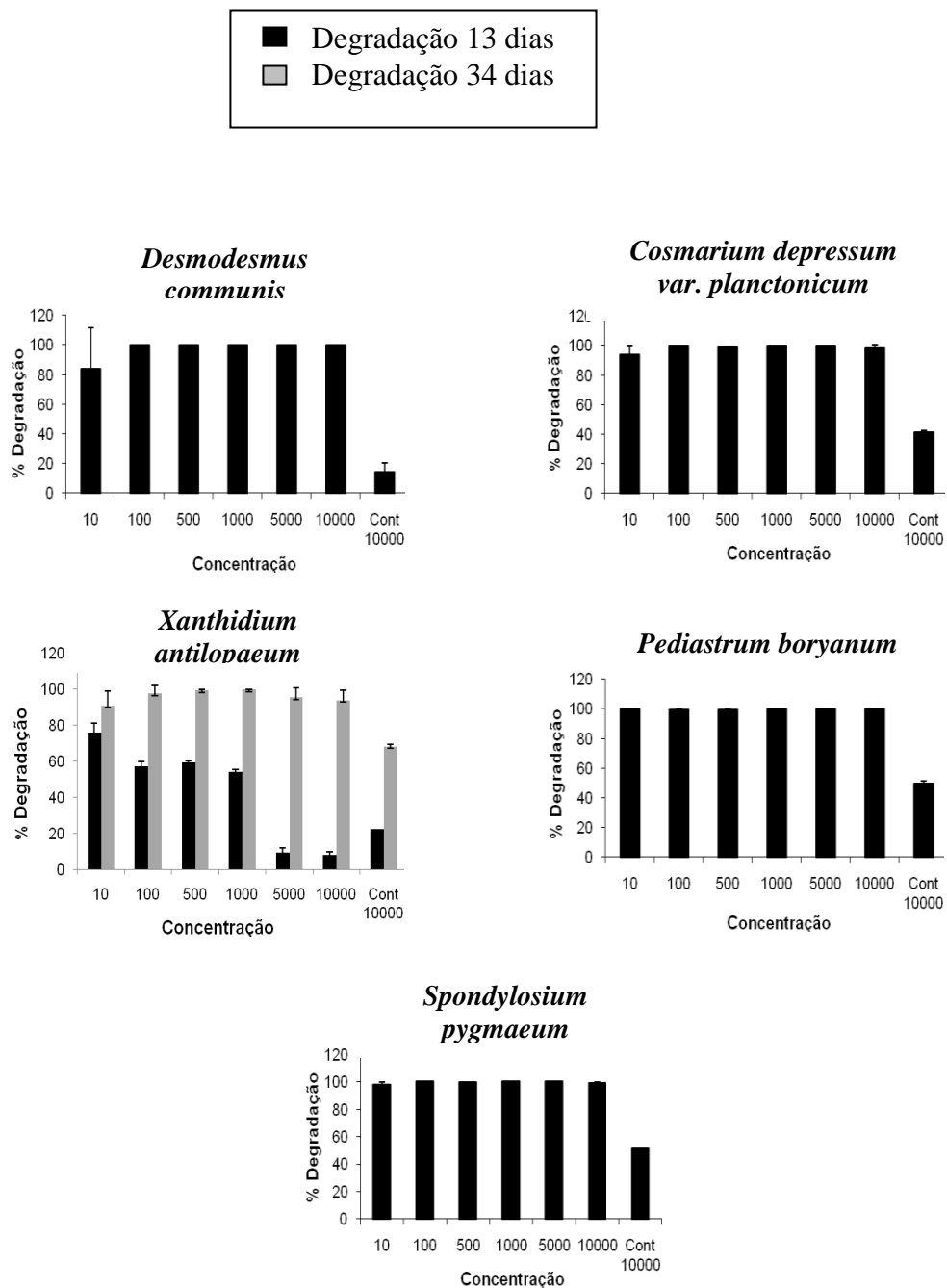


Figura 14: Percentagem de degradação do carbofurano realizada por *Desmodesmus communis*, *Cosmarium depressum var. planctonicum*, *Xanthidium antilopaeum*, *Pediastrum boryanum* e *Spondylosium pygmaeum* em seis diferentes concentrações de carbofurano e um controle com adição do composto e sem adição da cepa. As barras de erro representam o desvio padrão.

3.4. DISCUSSÃO

A contaminação de ecossistemas aquáticos por pesticidas oriundos da agricultura é um problema não apenas ambiental, mas também de saúde pública. Este processo vem sendo relatado há anos (Carpenter *et al.* 1998; Arbuckle e Downing 2001; Galbraith e Burns 2007; Abrantes *et al.* 2010) e tem contribuído para mudanças significativas nas propriedades físico-químicas e na qualidade da água. Entre os pesticidas encontrados com maior frequência em águas naturais do Rio Grande do Sul (Grützmacher *et al.* 2008) se encontra o carbofurano, um inseticida que ao se acumular nestes ambientes desestrutura toda a comunidade aquática e causa efeitos toxicológicos indesejáveis para muitos organismos (Singh *et al.* 2003; Hernandez-Moreno *et al.* 2011).

Diversos trabalhos vêm sendo realizados com carbofurano, mostrando além dos efeitos toxicológicos a partir dos valores de LC50 e EC50 (Fisher *et al.* 1999; Singh *et al.* 2003; Hernandez-Moreno *et al.* 2011) também os efeitos fisiológicos causados por este composto (Singh e Sharma 1998; Begum 2008). Ma *et al.* (2006) mostrou os efeitos toxicológicos causado por inseticidas carbamatos em oito espécies de cianobacterias e algas verdes, sendo que o carbofurano apresentou a segunda maior toxicidade entre os inseticidas testados. Azizullah *et al.* (2011) em um trabalho realizado com *Euglena gracilis* mostrou que o carbofurano pode influenciar na motilidade e orientação do organismo.

O presente estudo mostrou que o inseticida carbofurano não apresentou toxicidade para *Pediastrum boryanum*, cuja sensibilidade a este composto foi igual à zero. Por outro lado, as outras quatro espécies fitoplanctônicas apresentaram toxicidade semelhante, nas concentrações mais elevadas. A toxicidade do carbofurano em animais esta relacionada à inibição da enzima acetilcolinesterase, causando efeitos neurológicos nestes organismos (FMC 1976). No entanto, a atuação do carbofurano para inibição do crescimento nas microalgas ainda é um processo desconhecido, podendo também estar relacionado a um processo de controle enzimático.

Tanto a ANOVA bifatorial com *post-hoc* de Tukey, como a ANOVA “one way” com *post-hoc* de Dunnett evidenciaram um crescimento maior na presença de carbofurano para *Xanthidium antilopaeum* com 34 dias de cultivo e *Desmodesmus communis* com 13 dias, sugerindo a metabolização e utilização deste composto para o crescimento. A utilização de carbofurano em favor do crescimento já foi relatada para algumas espécies de bactérias que o utilizaram como única fonte de carbono (Jiang *et al.* 2007), mas esta é a primeira ocorrência deste comportamento em microalgas.

A degradação do carbofurano foi um processo realizado por todas as microalgas estudadas e ocorreu em todas as concentrações, *Pediastrum boryanum* foi a cepa que apresentou maior degradação do composto em todas as concentrações, mas as outras microalgas também apresentaram degradação de aproximadamente 100%. No experimento realizado com *Xanthidium antilopaeum*, a degradação foi baixa até o 13º dia de cultivo, pois o crescimento durante este período não havia atingido a fase exponencial. Porém, quando a cepa atingiu níveis maiores de densidade celular, a degradação também alcançou aproximadamente 100%, mostrando que o percentual de degradação possivelmente está correlacionado com a densidade celular das microalgas.

A biodegradação de pesticidas é um processo natural que envolve a oxidação do composto original para formar dióxido de carbono e água, este processo proporciona carbono e energia para o crescimento microbiano (Singh 2008). Embora o processo de degradação de outros pesticidas, como fenamifos e methyl parathion, já tenha sido descrito para o fitoplâncton (Megharaj *et al.* 1994; Cáceres *et al.* 2008), o presente trabalho demonstra de forma inédita a possível degradação do carbofurano pelo fitoplâncton. Apesar de estudos anteriores já terem demonstrado efeitos toxicológicos do carbofurano em microalgas (Ma *et al.* 2006; Azizullah *et al.* 2011), nenhum deles abordou a capacidade de degradação deste composto por estes organismos. Por outro lado, a degradação de carbofurano por fungos e bactérias já foi

demonstrada por diversos autores (Chaudhry e Ali 1988; Tomasek e Karns 1989; Chapalmandugu e Chaudhry 1992; Arias *et al.* 2005; Jiyoungh *et al.* 2007; Kadakol *et al.* 2010).

A degradação do carbofurano pode ser química ou biológica, sendo que a utilização de organismos neste processo pode ser mais barata e evitar impactos ambientais causados pela utilização de produtos na tentativa de descontaminação de ambientes. O presente estudo demonstra que algumas microalgas podem também biodegradar o carbofurano, embora a via de degradação não esteja totalmente elucidada. O completo conhecimento dos produtos gerados pela degradação e a sua respectiva toxicidade, bem como o controle enzimático do processo, permitirá definir o potencial biotecnológico do fitoplâncton em relação ao carbofurano. A principal via metabólica de biodegradação do carbofurano conhecida até o momento envolve oxidação do composto, formando o 3-hidroxicarbofurano que também pode sofrer outras transformações (Peixoto 2007).

Diversos trabalhos realizados com organismos da Ordem Desmidiata identificam estes organismos como excelentes bioindicadores de ambientes oligotróficos, devido a sua baixa tolerância a contaminação (Coesel 2001; Spijkerman *et al.* 2004; Ngearnpat e Peerapornpisal 2007). Por outro lado, a Ordem Chlorococcales é frequentemente encontrada em ambientes eutrofizados (Debenay *et al.* 2003). De forma geral, os dados obtidos por este trabalho não identificaram maior sensibilidade ao carbofurano pelas desmídias testadas. A tolerância apresentada pelas Desmidiata nos dados obtidos por este estudo pode estar relacionada tanto com a capacidade de degradação do composto, como a presença de uma espessa cápsula típica dos organismos testados (sendo que esta representa 46, 25 e 12,5% do diâmetro de *Cosmarium depressum* var. *planctonicum*, *Xanthidium antilopaeum* e *Spondylosium pygmaeum*, respectivamente). A cápsula destes organismos é composta por polissacarídeos complexos (EPS) excretados pela cepa e apresenta diversas funções ecológicas (Reynolds 2006). Os níveis extracelulares iniciais de carbofurano no experimento realizado com *Cosmarium depressum* var. *planctonicum* foram mais baixos que a concentração esperada e detectada nos controles sem

microalga e nos experimentos realizados com as demais cepas (dados não mostrados). Por outro lado, os níveis celulares iniciais de carbofurano foram proporcionalmente mais elevados em *C. depressum var. planctonicum* que nas demais cepas, sugerindo que parte do pesticida tenha sido imediatamente complexado ou adsorvido à cápsula, uma vez que as amostras foram retiradas logo após a inoculação e homogeneização das culturas. É importante ressaltar que, ao final do experimento, a degradação tanto do carbofurano extracelular, como do adsorvido às células, foi de aproximadamente 100%. Portanto, fica clara a necessidade de estudos futuros para aprofundar o conhecimento sobre a caracterização dos polissacarídeos que compõe a cápsula desta espécie, bem como determinar a dinâmica e mecanismos de funcionamento deste processo, visando encontrar subsídios para futuras aplicações biotecnológicas.

3.5. CONCLUSÃO

A partir deste trabalho pode-se concluir que o carbofurano não apresentou toxicidade para *Pediastrum boryanum*, mas inibiu o crescimento das demais microalgas. Por outro lado, foi observado pela primeira vez um maior crescimento de microalgas na presença de carbofurano, possivelmente relacionada à metabolização do mesmo. Além disso, os dados obtidos neste trabalho demonstraram também de forma inédita que as microalgas *Desmodesmus communis*, *Pediastrum boryanum*, *Cosmarium depressum var. planctonicum*, *Xanthidium antilopaeum* e *Spondylosium pygmaeum* foram capazes de degradar o carbofurano e a degradação está possivelmente relacionada ao aumento da densidade celular.

3.6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRANTES, N.; PEREIRA, R. E GONÇALVES, F. 2010. Occurrence of Pesticides in Water, Sediments, and Fish Tissues in a Lake Surrounded by Agricultural Lands: Concerning Risks to Humans and Ecological Receptors. *Water Air Soil Pollution*. 212:77–88.

ANVISA. 2010. Agrotóxicos e Toxicologia: Programa de análise de resíduos de agrotóxicos em alimentos: relatório anual. Monitoramento de resíduos de agrotóxicos nos Alimentos. Disponível em <http://www.anvisa.gov.br>. Acesso em: 05 de maio 2010.

ARBUCKLE, K. E. E DOWNING, J. A. 2001. The influence of watershed land use on lake N:P in a predominantly agricultural landscape. *Limnology and Oceanography*. 46:970–975.

ARIAS, M.; GARCÍA-RÍO, L.; MEJUTO, J. C.; RODRÍGUEZ-DAFONTE, P. E SIMAL-GÁNDARA, J. 2005. Influence of Micelles on the Basic Degradation of Carbofuran. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 53:7172-7178.

AZIZULLAH A.; RICHTER, P. E HÄDER DP. 2011. Comparative toxicity of the pesticides carbofuran and malathion to the freshwater flagellate *Euglena gracilis*. *Ecotoxicology*. 20:1442–1454.

BEGUM, G. 2008. Assessment of Biochemical Markers of Carbofuran Toxicity and Recovery Response in Tissues of the Freshwater Teleost, *Clarias Batrachus* (Linn). *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. 81:480–484.

BRASIL. Lei nº 7802, de 11 julho de 1989. Lei Federal sobre Agrotóxicos. Dispõe sobre a pesquisa, a experimentação, a produção, a embalagem e rotulagem, o transporte, armazenamento, a comercialização, a propaganda comercial, a utilização, a importação, a exportação, o destino final dos resíduos das embalagens, o registro, a classificação, o controle, a inspeção e a fiscalização de agrotóxicos, seus componentes e afins, e dá outras providências. Brasília: DOU Diário Oficial da União. Publicado no D.O.U. de 12 de julho de 1989.

_____. Decreto Federal nº 4074, de 04 de janeiro de 2002. Regulamenta a Lei no 7.802, de 11 de julho de 1989. Brasília: DOU Diário Oficial da União. Publicado no D.O.U. de 08 de janeiro de 2002.

_____. Portaria nº 03/MS/SNVS, de 16 de janeiro de 1992. Ratifica os termos das diretrizes e orientações referentes à autorização de registros, renovação de registro e extensão de uso de produtos agrotóxicos e afins. Brasília: DOU Diário Oficial da União. Publicado no D.O.U. de 04 de fevereiro de 1992.

_____. Portaria Normativa IBAMA nº 84, de 15 de outubro de 1996. Estabelece procedimentos a serem adotados junto ao Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis - IBAMA, para efeito de registro e avaliação do potencial de periculosidade ambiental - (ppa) de agrotóxicos, seus componentes e afins. Brasília: DOU Diário Oficial da União. Publicado no D.O.U. de 18 de outubro de 1996.

CÁCARES, T. P.; MEGHARAJ, M. E NAIDU, R. 2008. Biodegradation of the pesticide fenamiphos by ten different species of algae and cyanobacteria. *Current Microbiology*. 57:643-646.

CARPENTER, S. R.; CARACO, N. F.; CORRELL, D. L.; HOWARTH, R. W.; SHARPLEY, A. N. E SMITH, V. H. 1998. Nonpoint pollution of surface waters with phosphorus and nitrogen. *Ecological Applications*. 8:559–568.

- CHAPALMANDUGU, S. E CHAUDHRY, GR. 1992. Microbial and biotechnological aspects of metabolism of carbamates and organophosphates. *Critical Reviews in Biotechnology*. 12:357–389.
- CHAUDHRY, GR. E ALI, AN. 1988. Bacterial metabolism of carbofuran. *Applied and Environmental Microbiology*. 54:1414–1419.
- CHAUDHRY, GR.; MATEEN, A.; KASKAR, B.; SARDESSAI, M.; BLODA MA; BHATTI, R. E WALIA, SK. 2002. Induction of carbofuran oxidation to 4- hydroxycarbofuran by *Pseudomonas* sp. 50432. *FEMS Microbiology Letters*. 214:171–176.
- COESEL PFM. 2001. A method for quantifying conservation value in lentic freshwater habitats using desmids as indicator organisms. *Biodiversity and Conservation*. 10:177–178.
- CONAMA - CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE, resolução n° 357, de 17 de março de 2005.
- DEBENAYA J. P.; CARBONELB, P.; MORZADEC-KERFOURNC, M.-T.; CAZAUBOND, A.; DENÈFLEE, M. E LÉZINE, A.-M. 2003. Multi-bioindicator study of a small estuary in Vendée (France). *Estuarine, Coastal and Shelf Science*. 58:843–860.
- ESTEVES, F. A. 1998. *Fundamentos de Limnologia*. Interciência, 602 pp.
- FELSOT, A. S. 1989. Enhanced biodegradation of insecticides in soil: Implications for Agroecosystems. *Annual Reviews Entomology*. 34:453-476.
- FISHER, S. J.; GALINAT, G. F. E BROWN, M. L. 1999. Acute Toxicity of Carbofuran to Adult and Juvenile Flathead Chubs. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. 63:385-391.
- FMC. 1976. Furadan insecticide-nematicide. Carbofuran Data Summary, 95 pp.
- GALBRAITH, L. M. E BURNS, C. W. 2007. Linking land-use, water body type and water quality in southern New Zealand. *Landscape Ecology*. 22:231–241.
- GRÜTZMACHER, D. D.; GRÜTZMACHER, A. D.; AGOSTINETTO, D.; LOECK, A. E.; ROMAN, R.; PEIXOTO, S. C. E ZANELLA, R. 2008. Monitoramento de agrotóxicos em dois mananciais hídricos no sul do Brasil. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*. 12(6):632–637.
- GUILLARD, R. R. L. E LORENZEN, C. J. 1972. Yellow-green algae with chlorophyllide c. *Journal of Phycology*. 8(1):10-14.
- HEAD, IM.; CAIN, RB. E SUETT, DL. 1992. Characterization of carbofuran degrading bacterium and investigation of the role of plasmids in catabolism of the insecticide carbofuran. *Archives Microbiology*. 158:302–308.
- HERNANDEZ-MORENO, D.; GUILHERMINO, L.; GRAVATO, C.; SOLER, F. E PEREZ-LOPEZ, M. 2011. Acute toxicity of the pesticides carbofuran and deltamethrin on sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Toxicology Letters*, Doi: 10.1016/j.toxlet.2011.05.788.
- HUSSAIN, S.; ARSHAD, M.; SALEEM, M. E KHALID, A. 2007. Biodegradation of α and β endosulfan by soil bacteria. *Biodegradation*. 18:731–740.

IRGA – Instituto Rio-Grandense de Arroz. 2010. Área cultivada de arroz. <http://www.irga.rs.gov.br>, setembro, 2010.

JIANG, J.; ZHANG, R.; LI, R.; GU, J.D. E LI, S. 2007. Simultaneous biodegradation of methyl parathion and carbofuran by a genetically engineered microorganism constructed by mini-Tn5 transposon. *Biodegradation*. 18:403–412.

JIYOUNG, S.; JUNHO, J.; SANG-DON, K.; SUIL, K.; JAEHONG, H. E HOR-GIL, H. 2007. Fungal biodegradation of carbofuran and carbofuranphenol by the fungus *Mucor ramannianus*: identification of metabolites. *Water Science and Technology*. 55:163–167.

KADAKOL, J. C.; KAMANAVALLI, C. M. E SHOUCHE, Y. 2010. Biodegradation of Carbofuran phenol by free and immobilized cells of *Klebsiella pneumoniae* ATCC13883T. *World Journal Microbiology Biotechnology*, Doi: 10.1007/s11274-010-0422-7.

MA, J.; LU, N.; QIN, W.; XU, R.; WANG, Y. E CHEN, X. 2006. Differential responses of eight cyanobacterial and green algal species, to carbamate insecticides. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 63:268–274.

MACKINNEY, G. 1941. Absorption of light by chlorophyll solutions. *Journal of Biological Chemistry*. 140:315-322.

MEGHARAJ, M.; MADHAVI, DR.SREENIVASULU, C.; UMAMAHESWARI, A. E VENKATESWARLU, K. 1994. Biodegradation of methyl parathion by soil isolates of microalgae and cyanobacteria. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. 53:292-297.

MOREIRA, M. R. S.; MUCCI, J. L. N. E ABAKERLI, R. B. 2004. Monitoramento dos resíduos de carbofurano em área de produção de arroz irrigado. *Arquivos do Instituto Biológico, São Paulo*, 71(2):221-226.

NGEARNPAT, N. E PEERAPORNPIBAL, Y. 2007. Application of desmid diversity in assessing the water quality of 12 freshwater resources in Thailand. *Journal Applied Phycology*. 19:667–674.

PEIXOTO, S. C. 2007. Estudo da estabilidade a campo dos pesticidas Carbofurano e Quinclorac em água de lavoura de arroz irrigado empregando SPE E HPLC-DAD. Dissertação de mestrado, Santa Maria, RS, Brasil.

RAMANAND, K.; SHARMILA, M.; SINGH, N. E SETHUNATHAN, N. 1991. Metabolism of carbamate insecticides by resting cells and cell-free preparations of a soil bacterium, *Arthrobacter* sp. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. 46:380–386.

REYNOLDS, C. S. 2006. *The Ecology of Phytoplankton*. Cambridge University Press, Cambridge, 535 pp.

SHAROV, A. N. 2008. Phytoplankton as an Indicator in Estimating Long-Term Changes in the Water Quality of Large. *Lakes Water Resources*. 35(6):668–673.

SINGH, R. K. E SHARMA, B. 1998. Carbofuran–induced biochemical changes in *Clarias batrachus*. *Pesticide*. 53:285-290.

SINGH, R. K.; SINGH, R. L. E SHARMA, B. 2003. Acute Toxicity of Carbofuran to a Freshwater Teleost, *Clarias batrachus*. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology. 70:1259–1263.

SINGH, D. K. 2008. Biodegradation and bioremediation of pesticide in soil: concept, method and recent developments. Indian Journal of Microbiology. 48:35–40.

SPIJKERMAN, E.; GARCIA-MENDOZA, E.; MATTHIJS, H.C.P.; VAN HUNNIK, E. E COESEL, PFM. 2004. Negative effects of P-buffering and pH on photosynthetic activity of planktonic desmid species. Photosynthetica. 42(1):49-57.

TOMASEK, PH. E KARNIS, J. 1989. Cloning of a carbofuran hydrolase gene from *Achromonobacter* sp. strain WM111 and its expression in gram-negative bacteria. Journal of Bacteriology. 171:4038-4044.

VAN DE HOEK, C.; MANN, D. G. E JAHNS, H. M. 1995. Algae: an introduction to phycology. Cambridge University Press, Cambridge, 623 pp.

ZAGATTO E BERTOLETTI. 2006. Ecotoxicologia aquática - Princípios e Aplicações. Rima, 89-90-94-464 pp.

3.7. ANEXOS

3.7.1. Normas do Periódico *Journal of Phycology*

Author Guidelines

SUBMISSION OF MANUSCRIPTS Submission of manuscripts to the *Journal of Phycology* is through our online manuscript submission and review system, ScholarOne Manuscripts, a ScholarOne product that is provided by Wiley-Blackwell. To submit your manuscript, please go to <http://mc.manuscriptcentral.com/jpy>.

The online submission is a step-by-step process; full instructions are provided, and additional support is available online. Authors will be able to track the progress of their manuscripts and will be notified when referee and editor comments are available online. Use of ScholarOne Manuscripts will facilitate the transfer of manuscripts between associate editors and reviewers.

EDITORIAL POLICY The *Journal of Phycology* publishes all aspects of basic and applied research on algae to provide a common medium for the ecologist, physiologist, cell biologist, molecular biologist, morphologist, taxonomist, geneticist, and biochemist, among others. Papers are accepted on the basis of their original and meritorious data and ideas and potential impact on the field. Preliminary notes and progress papers are unacceptable. Manuscripts may be submitted in the form of research articles or research notes. Manuscripts describing new techniques are welcome; they should include data that illustrate the usefulness of the technique. Reviews and minireviews are generally solicited, but interested authors are encouraged to contact the editor. Comments may be submitted that describe methods or equipment, that discuss papers previously published in the *Journal*, or that discuss other topics of interest to our readers. Comments will be reviewed. Manuscripts submitted must not have been published, accepted for publication, or be under consideration elsewhere. Authors should make appropriate depositions of materials to accession services (e.g., culture collections, herbaria, GenBank, etc.) to permit future work by the scientific community.

All manuscripts must be typed in a 12-point font and must be DOUBLE-SPACED THROUGHOUT, including the literature list, tables, table headings, figure legends, and so forth. Times New Roman font is preferred; do not use a *sans serif* font such as Arial, Helvetica, or Geneva. Each page of the manuscript should be numbered, including the title page. It is also suggested that you number the lines of your manuscript to facilitate the review/editing process. Do not justify right margins or use boldface for headings. Type all headings flush left; italicize subheadings. The Abstract and Results should be written in past tense, except in the case of descriptions of new species. For those species specifically studied in the research, Latin names of algal species should have the taxonomic author(s) of the name listed when first used. To find the taxonomic author(s), check the Algaebase Web site (<http://www.algaebase.org>); the accepted form of the author's name should be used by accessing the International Plant Names Index (<http://www.ipni.org/index.html>). New taxa must be established in accordance with the latest International Code of Botanical Nomenclature.

Authors must mail a signed Copyright Agreement Form (CAF) to the editorial office (Journal of Phycology Editorial Office, Department of Biological Sciences, Science Hall 2, Room 129, California State University San Marcos, 333 South Twin Oaks Valley Road, San Marcos, CA 92096-0001, USA) at the time of manuscript submission. (The editorial office must have the original signed hard copy on file for legal purposes.) The CAF can be downloaded from ScholarOne Manuscripts or by contacting the editorial office (jphycol@csusm.edu). Permission to cite another scientist's unpublished work must be verified by e-mail/letter communication by that individual to the editorial office at the time the manuscript is submitted.

research articles—The following sequence should be used.

1. *Title page*—This page gives the concise title, including class or division (phylum) designation when a genus or species name is included. Do not include taxonomic authors of scientific names in the title. Use full name (including first name for aid in bibliographic work) of the author(s) and complete address with ZIP or postal code. Place a superscripted number one (¹) after the last word of the title to correspond to a footnote that will indicate date of submission and acceptance. Also indicate the author to contact regarding correspondence by a superscripted number two (²); include an e-mail address, phone, and fax number for the corresponding author. Please ensure that the e-mail address is valid, as this will be the address to which article proofs are sent, as well as reader communication after publication of the article. Include a condensed running title of no more than 35 letters and spaces.

2. *Abstract*—This is a concise abstract (no more than 250 words) of the investigation with the objectives, results, and conclusions included. Include scientific names of key organisms (with taxonomic authors for those species studied in the research). New taxa described in the manuscript must be mentioned. Do not repeat information in the title or make reference to the literature. At the end of the Abstract, list 5 to 10 Key index words (arranged alphabetically) for aid in indexing. Include a section of Abbreviations after the Key index words. List the abbreviation, followed by what it means written out in full (e.g., GFP, green fluorescent protein). Common abbreviations (e.g., DNA) do not need to be listed; a list of abbreviations that do not need to be spelled out appears at the end of these instructions. The Abstract, Key index words, and Abbreviations should be in roman type (not italicized), except for scientific names.

3. *Introduction*—This is a brief description of the purpose of the investigation and of pertinent background literature specific to the research project. It should not be a general review of the field. It should take into consideration those who are not experts in the particular area.

4. *Materials and Methods*—Describe the methodology used in the study in sufficient detail to permit the study to be replicated by another scientist. Whenever possible, give sources of materials in detail. If cultures are used, indicate the strain or clone number and the availability. If study sites are mentioned, provide the latitudes/longitudes. For materials and supplies (including software), indicate the source (company name, city, state, country) on first reference. This manufacturer and location information should be provided for all brand-name products. For example, DAPI (Sigma Inc., St. Louis, MO, USA). In addition, list the model number for equipment used, as appropriate. Use metric units (*Système International d'Unités*, SI) and SI style (e.g., $\text{mmol photons} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$).

5. *Results*—Only results of the study should be included here. Rationale for undertaking certain aspects of the investigation, methods, techniques, and so forth, must be excluded. Cite each figure and table in the text in order of presentation (e.g., Fig. 1 before Fig. 2, Table 9 before

Table 10). When tables or figures are presented, cite only the significant results in the text. Do not duplicate the presentation of data in both a figure and a table. Tables of specimens studied should be placed in supplementary materials. Photographs should only be included if necessary to illustrate results. Include statistical analyses or other indicators to enable assessment of the variance of replicates of the experiments.

6. *Discussion*—The significant results and their importance to the study and to the discipline in general should be discussed. Reference to illustrative material should be minimal and should be provided only when necessary to emphasize a specific interpretation. Repetition of the Introduction should be minimized. The Results and Discussion may be combined, in which case a Conclusions section might be advantageous.

7. *Acknowledgments*—This section is to be used as necessary to acknowledge an institutional paper number and financial and other assistance.

8. *References*—Citations in the text are in chronological, then alphabetical order (e.g., Scott and Fischer 1992, Mannos et al. 2006, Mowbry 2008). References in the reference list must be arranged alphabetically. Arrange multiple references by the same author(s) chronologically. The author is responsible for verifying the accuracy of unpublished citations. Double-space all references and check them against the originals for accuracy. Type references flush left (i.e., without hanging indents) with an extra space between citations; they will be formatted properly at the press. Journal titles should be abbreviated following the BIOSIS SERIAL SOURCES, which is published each December and is available in most libraries (or go to <http://www.library.uq.edu.au/faqs/endnote/biosciences.txt>). If in doubt about any journal abbreviation, include the full title. The style to be used for references is as follows:

Journal articles:

Harrison, W. G. 1973. Nitrate reductase activity during a dinoflagellate bloom. *Limnol. Oceanogr.* 18:457–65.

Mann, H., Mann, S. & Fyfe, W. S. 1987. Aragonite crystals in *Spirogyra* sp. (Chlorophyta). *J. Phycol.* 23:506–9.

Contribution to a book:

Droop, M. R. 1974. Heterotrophy of carbon. In Stewart, W. D. P. & Pierce, C. E. [Eds.] *Algal Physiology and Biochemistry*. Blackwell, Oxford, UK, pp. 530–59.

Book:

Smith, G. M. 1950. *The Fresh-Water Algae of the United States*. 2nd ed. McGraw-Hill Book Co., New York, 719 pp.

Thesis:

Sanderson, B. L. 1998. Factors regulating water clarity in northern Wisconsin lakes. Ph.D. dissertation, University of Wisconsin, Madison, 227 pp.

Online sources/software:

Verbruggen, H. 2008. *TreeGradients*. Available at: <http://www.phycoweb.net> (last accessed 12 October 2008).

Swofford, D. L. 2003. *PAUP*: Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and Other Methods), Version 4*. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.

References that pertain only to supplementary materials are not included in the manuscript References section but should be submitted with the supplementary material to which they correspond.

9. *Tables*—Tables should be created using the Table function in Word (rather than using tabs). Place a descriptive title at the top of each table. Start each table on a new page. The title and table contents must be typed double-spaced throughout in 12-point font. Number tables with Arabic numerals (e.g., Table 2). Keep footnotes to a minimum, and use superscripted letters (^a, ^b, ^c) for footnotes rather than symbols or numbers. As vertical lines cannot be typeset, any table requiring such is considered a figure. Complex tables will be set at the author's expense, unless they are submitted as a camera-ready figure that can be treated as a line drawing.

10. *Figures*—For submission of your final manuscript, we must receive your artwork in digital format. Each figure should be submitted as a separate TIFF, PDF, or EPS file created at a resolution of 300 dpi or higher at final size. (Combination images, or images that contain both vector and bitmap graphics, could be supplied at a higher resolution to prevent image quality loss in the bitmap graphics, such as in the symbol keys. The recommended figure size for combination images is 600 dpi at final size.) Images must be provided as either one column (3¼" or 8.2 cm) or two column (6¾" or 17.5 cm) width and no more than 8 inches (18–20 cm) in height.

A note on resampling: If your image size is less than 300 dpi at final size, you must re-create the figure. You cannot increase the resolution of a lower resolution figure by simply resaving it at 300 dpi—this will not result in a higher-quality image, and the result may be pixilated or grainy images and poor text quality. More details on submitting artwork can be found on the Web site at: http://authorservices.wiley.com/prep_illust.asp.

All terms, abbreviations, and symbols should correspond to those used in the text of the paper. It is preferable to include a symbol key on line drawings. Component figures (panels) within a plate should be labeled with letters, not numbers (e.g., a, b, c, not 1, 2, 3).

a. *Drawings, graphs*—Labeling on line drawings must be large enough to be read easily after reduction; many line drawings are reduced to one-column width. Use the reducing function on a photocopy machine to check that the labeling is of sufficient size. The outer line on bars or boxes should be adequately sized for reduction (at least 1-point font). Italicize names of species in line art. For drawings, place a measured mark (scale line) on the drawing to facilitate determination of magnification. Do not use two shades of grays in histograms. Line art will be reproduced from electronic files. Axis labels should be of uniform font and size and should not be bolded. Use an initial capital letter for the first word of each label (e.g., Relative carbon content). If units are included in the label, use SI style (e.g., mg·L⁻¹). Numerals should include a comma in the thousands place (e.g., 1,200).

b. *Photographs*—Individual photographs forming a plate should be of equal contrast to facilitate printing. Each photograph must be squared accurately, and a thin white line should be inserted between them. A measured mark for scale determination must be included. Scale length may be indicated directly above the scale or in the legend.

c. *Color*—The charge for color in print is \$700 per figure. Authors who do not have funding for color may apply to the editor for a waiver, which will only be granted should there be a scientific need for color, as established during peer review.

d. *Legends*—Legends must be *typed double-spaced in paragraph form* and placed together on a separate sheet in the manuscript document you submit. Do not repeat details included in the text, but give enough explanation for adequate interpretation. See recent issues of the Journal for format.

11. *Supplementary Tables and Figures*—Wiley-Blackwell is able to host online approved supplementary material that authors submit with their paper. Supplementary material must be important, ancillary information that is relevant to the parent article but which does not or cannot appear in the printed edition of the journal. More information about guidelines for supplementary material can be found at the Web site: <http://authorservices.wiley.com/bauthor/suppmat.asp>. Supplementary materials should be submitted as files separate from the main manuscript document. Each supplementary item should be submitted as a separate file. Tables, figures, or data appendices should be numbered S1, S2, etc. (i.e., Table S1, S2, etc.; Figure S1, S2, etc.; Appendix S1, S2, etc.). For supplementary figures, unlike the main manuscript figures, the figure and legend should appear together. The editorial office may suggest that additional figures or tables be moved to supplementary materials (e.g., list of specimens analyzed). References that pertain only to supplementary materials are not included in the main manuscript References section but should be submitted with the supplementary material to which they correspond.

research notes and reviews—Research notes occupying one to three printed pages are acceptable. Use the same general format as that of research articles, except for the headings, which must be removed (with the exception of the Abstract). Minireviews occupy three to eight printed pages and are in commentary style; use only one set of headings (i.e., no subheadings) and include a brief abstract. Reviews occupy up to 20 printed pages and can include several levels of headings. *Note: estimate three typed pages of text for every printed journal page.*

COVER SUBMISSIONS Particularly good photographs that pertain to a paper being submitted will be considered for use on the cover. Submit the image file(s) at 300 dpi or better resolution, in either TIFF or EPS format, with the final copy of the manuscript—preferably scalable to a 12.7 × 17.8 cm (5 × 7 inch) format. Include a brief legend for the inside front cover (sent as a separate Word document).

REVIEW OF MANUSCRIPTS AND SUBMISSION OF REVISED MANUSCRIPTS Every article submitted is reviewed by the editor and an associate editor for scientific merit and potential impact on the field, plus conformity to the editorial policy and to the style of the Journal. Papers meeting these requirements are then anonymously peer-reviewed by at least two referees and an associate editor, the editor, or a member of the editorial board. The decision regarding acceptance or rejection of a manuscript is the responsibility of the associate editors and the editor, with the editor assuming final responsibility. The associate editor will usually correspond with the designated author during the review process. It is the corresponding author's responsibility to communicate to the other authors any changes made to the manuscript in revision and to ensure that all authors are aware of the contents of the paper. A manuscript that has been rejected may be resubmitted in six months only if the author(s) are able to present new

data that address the concerns of the reviewers. Manuscripts returned to authors for revision following review must be resubmitted within six months of the date the revision was requested. Most manuscripts are published within four months of acceptance. Please go to ScholarOne Manuscripts (<http://mc.manuscriptcentral.com/jpy>) for instructions on submitting your revised paper online (only papers that were originally submitted online may be submitted online as revised manuscripts).

AUTHOR SERVICES

Online production tracking is now available for your article through Wiley-Blackwell's Author Services. Author Services enables authors to track their article—once it has been accepted—through the production process to publication online and in print. Authors can check the status of their articles online and choose to receive automated e-mails at key stages of production. It is important to ensure that a complete e-mail address is provided when submitting the manuscript. Visit <http://authorservices.wiley.com/bauthor/default.asp> for more details on online production tracking and for a wealth of resources including FAQs and tips on article preparation, submission, and more.

OPEN ACCESS

Wiley-Blackwell provides an open access option called OnlineOpen. OnlineOpen is available to authors of primary research articles who wish to make their article available to non-subscribers on publication, or whose funding agency requires grantees to archive the final version of their article. With OnlineOpen, the author, the author's funding agency, or the author's institution pays a fee to ensure that the article is made available to non-subscribers upon publication via Wiley Online Library, as well as deposited in the funding agency's preferred archive. For the full list of terms and conditions, see http://wileyonlinelibrary.com/onlineopen#OnlineOpen_Terms

Any authors wishing to send their paper OnlineOpen will be required to complete the payment form available from our website at:

<https://onlinelibrary.wiley.com/onlineOpenOrder>

Prior to acceptance there is no requirement to inform an Editorial Office that you intend to publish your paper OnlineOpen if you do not wish to. All OnlineOpen articles are treated in the same way as any other article. They go through the journal's standard peer-review process and will be accepted or rejected based on their own merit.

PROOFS AND OFFPRINTS Instructions for electronically downloading page proofs will be sent to the corresponding author directly by Wiley-Blackwell, along with supporting documents, including instructions for reviewing your proofs, a page and color charge form, and information about ordering hard copy offprints. Please note: If you wish to order hardcopy offprints, you must place an order before the article has gone to press. Hardcopy offprints are only available for purchase prepublication of an article. The page proof corrections must be returned to the editorial office immediately (within 48 hours, excluding weekends and holidays), and the page charge form should be returned to the publisher (as indicated on the form).

PDF OFFPRINTS

Free access to the final PDF offprint or your article will be available via Wiley-Blackwell's Author Services. Please register to access your article PDF offprint and enjoy the many other benefits the service offers. Visit <http://authorservices.wiley.com/bauthor/> to register.

terms of use—Authors who receive a postpublication PDF offprint from the Psychological Society of America may distribute the file for personal or professional use; however, the file may not be posted to the author's Web site for uncontrolled downloading until six months have elapsed since publication. Offprints shall include the complete citation information.

PAGE CHARGES To pay some of the costs of publishing the *Journal of Phycology*, the Journal assesses page charges for each paper published, except solicited reviews. Payment of page charges is not a condition for the acceptance of a manuscript for publication. Papers in which a PSA member is the first author or corresponding author are exempt from black-and-white page charges. Visit the PSA Web site at <http://www.psaalgae.org> for membership information. Nonmember author(s) will be assessed page charges for each paper accepted for publication. Rates (2010) are \$50 per printed page for black-and-white pages, and \$700 per color figure.

EARLYVIEW

The *Journal of Phycology* is covered by Wiley-Blackwell's EarlyView service. EarlyView articles are complete, full-text articles published online in advance of their publication in a printed issue. Articles are therefore available as soon as they are ready, rather than having to wait for the next scheduled print issue. EarlyView articles are complete and final. They have been fully reviewed, revised, and edited for publication, and the authors' final corrections have been incorporated. Because they are in final form, no changes can be made after online publication. The nature of EarlyView articles means that they do not yet have volume, issue, or page numbers, so EarlyView articles cannot be cited in the traditional way. They are therefore given a Digital Object Identifier (DOI), which allows the article to be cited and tracked before it is allocated to an issue. After print publication, the DOI remains valid and can continue to be used to cite and access the article. Manuscripts in an issue will be published at <http://www3.interscience.wiley.com/journal/118502413/home>. Abstracts are accessible online to the public; individual members and subscribing libraries can view the full contents of the Journal through a password system. See subscription information at <http://www.jphycol.org/join.asp> for details.

COPYRIGHT PERMISSION Please contact the editor for permission to reproduce any portion of an article that has been published in the Journal. Copyright is held by the Psychological Society of America.

ABBREVIATIONS TO BE USED WITHOUT FULL SPELLING:

ADP	adenosine 5'-diphosphate
AFDM	ash-free dry mass
ATP	adenosine 5'-triphosphate
B.P.	before present
b.p.	boiling point
BSA	bovine serum albumin
cAMP or cyclic AMP	adenosine 3',5'-cyclic monophosphate
cDNA	complementary deoxyribonucleic acid
chl	chlorophyll
DMSO	dimethyl sulfoxide
DNA	deoxyribonucleic acid
DNase	deoxyribonuclease

EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
EGTA	ethylene glycol-bis(2-aminoethyl ether) N,N,N',N'-tetraacetic acid
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
EM	electron microscopy
FAD (FADH ₂)	flavin adenine dinucleotide (reduced form)
GTP	guanosine triphosphate
HAB	harmful algal bloom
HPLC	high-performance liquid chromatography
LM	light microscopy
LSU	large subunit
mRNA	messenger ribonucleic acid
MTOC	microtubule-organizing center
NAD ⁺ (NADH)	nicotinamide adenine dinucleotide (reduced form)
NADP ⁺ (NADPH)	nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (reduced form)
NMR	nuclear magnetic resonance
P _i	inorganic phosphate
PBS	phosphate-buffered saline
PAGE	polyacrylamide gel electrophoresis
PAR	photosynthetically active radiation
PCR	polymerase chain reaction
PSI	photosystem I
PSII	photosystem II
rDNA	ribosomal deoxyribonucleic acid
RFLP	restriction fragment length polymorphism
RIA	radioimmunoassay
RNA	ribonucleic acid
RNase	ribonuclease
rRNA	ribosomal ribonucleic acid
RUBISCO	ribulose-1,5 biphosphate carboxylase oxygenase
SCUBA	self-contained underwater breathing apparatus
SDS	sodium dodecyl sulfate
SEM	scanning electron microscopy
SSU	small subunit
TEM	transmission electron microscopy
TLC	thin-layer chromatography
Tris	tris(hydroxymethyl)aminomethane
tRNA	transfer ribonucleic acid
UV	ultraviolet

The journal to which you are submitting your manuscript employs a plagiarism detection system. By submitting your manuscript to this journal you accept that your manuscript may be screened against previously published works.

3.7.2 Figuras da estrutura molecular e cepas

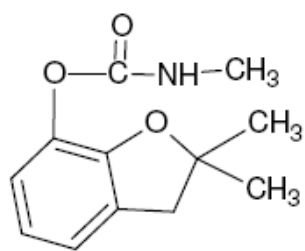
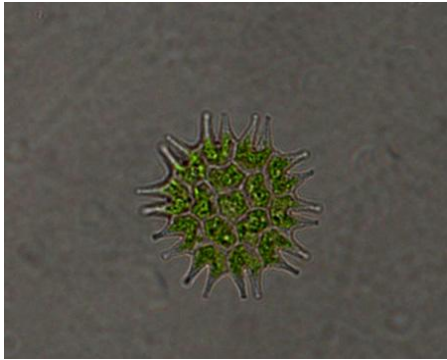


Figura 1: fórmula estrutural do carbofurano.

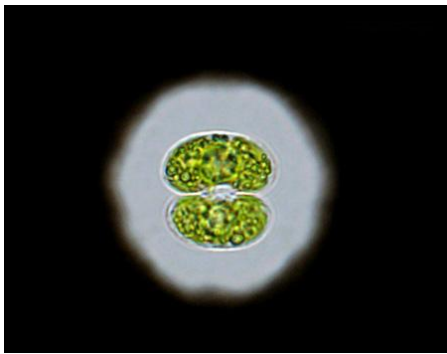
Pediastrum borvanum



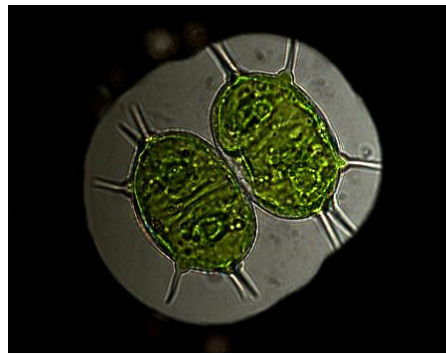
Desmodesmus communis



Cosmarium depressum
var. planctonicum



Xanthidium antilopaeum



Spondylosium pygmaeum

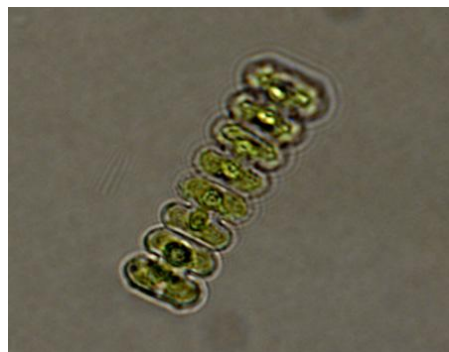


Figura 2: fotos das cinco cepas utilizadas nos experimentos.