



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA FRONTEIRA SUL – UFFS
CAMPUS: LARANJEIRAS DO SUL – PR
ENGENHARIA DE AQUICULTURA**

MARIA ALICE NUNES

**MICROALGAS *Desmodesmus quadricauda* e *Monorraphydium* sp.
(Chlorophyta) ORIUNDAS DO RIO DO LEÃO, TESTADAS COMO
BIOINDICADORES NA DETECÇÃO DE GLIFOSATO**

**LARANJEIRAS DO SUL
2019**

MARIA ALICE NUNES

**MICROALGAS *Desmodesmus quadricauda* e *Monoraphidium* sp.
(Chlorophyta) ORIUNDAS DO RIO DO LEÃO, TESTADAS COMO
BIOINDICADORES NA DETECÇÃO DE GLIFOSATO**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao curso de Engenharia de Aquicultura da Universidade Federal da Fronteira Sul, como requisito para obtenção do título de Bacharel em Engenharia de Aquicultura.

Orientador: Prof^ª. Dr^ª. Josimeire Ap^a Leandrini.

**LARANJEIRAS DO SUL – PR
2019**

Bibliotecas da Universidade Federal da Fronteira Sul - UFFS

Nunes, Maria Alice

Microalgas *Desmodesmus quadricauda*, *Monoraphidium* sp. (Chlorophyta) oriundas do rio Leão, testadas como bioindicadores na detecção de glifosato. / Maria Alice Nunes. -- 2019.

53 f.

Orientador: Prof. Dra. Josimeire Aparecida Leandrini.
Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) -
Universidade Federal da Fronteira Sul, Curso de
Engenharia de Aquicultura, Laranjeiras do Sul, PR ,
2019.

1. Alga verde. 2. Cultivo. 3. Herbicidas. 4.
Morfologia. I. Leandrini, Josimeire Aparecida, orient.
II. Universidade Federal da Fronteira Sul. III. Título.

MARIA ALICE NUNES

**MICROALGAS *Desmodesmus quadricauda*, *Monoraphidium*
sp. (Chlorophyta) ORIUNDAS DO RIO DO LEÃO, TESTADAS
COMO BIOINDICADORES NA DETECÇÃO DE GLIFOSATO**

Trabalho de conclusão de curso de graduação apresentado como requisito para obtenção
de
grau de Bacharel em Engenharia de Aquicultura da Universidade Federal da Fronteira
Sul.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Josimeire Ap^ª Leandrini.
Professor na UFFS – Campus Laranjeiras do Sul – PR

Este trabalho de conclusão de curso foi defendido e aprovado pela banca em:

12 / 12 / 2019

BANCA EXAMINADORA

Amanda Keller Siqueira

Prof^ª. Dr^ª. Amanda Keller Siqueira - Unicentro

Jorge Garcia P

Prof. Dr. Jorge Erick Garcia Parra – UFFS

Josimio exp. L. D.

DEDICATÓRIA

“Dedico este trabalho a todos os mestres que iluminaram meu caminho com conhecimento e liberdade, à minha mãe Marilda, meu pai Antonio, às minhas irmãs, principalmente a minha avó Cilda e a todos que tiveram paciência e acreditaram no meu sonho de ser engenheira.”

AGRADECIMENTOS

A Deus por ter me dado saúde e força para superar as dificuldades.

Agradeço aos meus pais Marilda e Antonio, pelo apoio e ajuda durante a graduação no curso de Engenharia de Aquicultura.

As minhas irmãs Ana Paula Nunes e Ana Elize Nunes pelo apoio e incentivo.

À minha orientadora, prof^a Dr^a Josimeire Aparecida Leandrini, pelos ensinamentos valiosos, paciência e disponibilidade de tempo para a realização deste trabalho de conclusão de curso. E pela sua dedicação nesta instituição que é muito importante. Tenho a total certeza de que colhi bons frutos dentro desta instituição.

Aos professores Luisa Cazarolli e Paulo Henrique Mayer pelo companheirismo e por acreditar nas pessoas e na perspectiva da construção de um mundo melhor.

A meus amigos que sempre me apoiaram e me ajudaram na universidade.

Agradeço a Valmir Jose de Souza, amigo incansável e parceiro que o destino deu-me de presente pra ajudar enfrentar as longas noites e finais de semana de estudo.

Aos técnicos de laboratórios pelos auxílios no desenvolvimento deste trabalho, que sempre estavam dispostos a ajudar e passar seus conhecimentos.

A todos os meus colegas e professores, quero agradecê-los pela amizade, e ajuda. Com certeza nós aprendemos muitas coisas juntos, um auxiliando ao outro, crescendo juntos!

Agradeço ao grupo de Programa de Educação Tutorial (PET) - Conexões de Saberes Políticas Públicas e Agroecologia pelos anos de trabalho em grupo e aprendizados.

EPÍGRAFE

Se cheguei até aqui foi porque me apoiei em ombros de gigantes.

(Isaac Ne Wton)

RESUMO

As microalgas de água doce são organismos com ampla diversidade morfológica, funções e estratégias de sobrevivência. Chlorophyta, filogeneticamente está ligado às plantas terrestres e no ambiente aquático. É um dos principais produtores na cadeia trófica, e devido ao ciclo de rápido, podem ser utilizadas como bioindicadores de qualidade da água. Com o objetivo de testar algas como bioindicadores na detecção de glifosato, foram coletadas amostras de fitoplâncton e ficoperifiton na estação de coleta de água da Sanepar no rio Leão, município de Laranjeiras do Sul, Paraná. Após a coleta, as algas foram identificadas no Laboratório de Limnologia da Universidade Federal da Fronteira Sul campus Laranjeiras do Sul. Para o experimento foram utilizados dois táxons: *Desmodesmus quadricauda* (Tur.) Bréb. in Bréb. & God. e *Monorraphydium* sp. Após a coleta, as algas passaram por período de aclimação ao ambiente laboratorial, o qual foi confirmado quando as amostras apresentaram-se tonalidade verde escuro. Estas espécies foram submetidas a três tratamentos com glifosato o T1= 125µm/ml (máxima permitida pela legislação de 500µm/litro), T2= 62,5µm/ml, T3= 12,5µm/ml e um controle =0 (controle, sem adição de glifosato). Foram realizadas avaliações após 02, 04, 16, 24 e 96 horas após adição do glifosato nos tratamentos a fim de verificar qual o comportamento dos dois táxons quanto a taxa de crescimento (número de indivíduos) da população, atividade celular, morfologia do pirenóide e célula. Os dados de densidade demonstraram que no controle T4(sem glifosato) as duas espécies mantiveram suas taxas de crescimento, já os tratamentos T1, T2 e T3 diminuíram o número de indivíduos vivos. Contudo, somente 16h após a adição do glifosato detectou-se mortalidade das espécies. Entretanto, entre os tratamentos T1, T2 e T3 o comportamento das duas espécies foram semelhantes. Quanto a resposta das algas aos tratamentos, *Monorraphydium* sp. R espondeu melhor aos 3 tratamentos , ficando mais evidente as diferenças entre controle e os tratamentos, não só pela densidade apresentada como também pelo aspecto morfológico, o que indica o potencial de ser utilizada como uma espécie bioindicadora.

Palavras-chave: Alga verde; Indicador biológico, Herbicidas e Morfologia.

ABSTRAC

Water microalgae are organisms with a wide diversity of survival forms, functions and strategies. Chlorophyta, phylogenetically linked to terrestrial plants and the aquatic environment, are one of the main producers in the food chain, and due to the rapid cycle, can be used as bioindicators of water quality. Aiming to test algae as bioindicators in glyphosate detection, phytoplankton and ficoperifiton samples were collected at the Leão river water collection station, Laranjeiras do Sul, Paraná. After collection, the algae were minimally identified in the Limnology Laboratory of the Federal University of the Southern Frontier campus Laranjeiras do Sul. Two taxa *Desmodesmus quadricauda* (Tur.) Bréb were used for the experiment. In Bréb & God, *Monorraphyidium sp.* were considered acclimated when the sample showed a dark green. These species were submitted to four treatments: T1 = 125 µm / ml (maximum allowed by legislation of 500 µm / liter), T2 = 62.5 µm / ml, T3 = 12.5 µm / ml and T4 = 0 (control, without addition) of glyphosate. Counts were conducted after two, four, 16, 24 and 96 hours after addition of the glyphosate commercial order to verify the behavior of the two taxa as the growth rate (number of individuals) population, cell activity, Pyrenoid morphology and cell. Density data showed that in control (T4) both species maintained their growth rates, while T1, T2 and T3 treatments decreased the number of individuals. However, only in 16 hours after the addition of glyphosate was detected the mortality of the species. Anova was used to treat the data, and it was possible to verify that there was a significant difference between the control and treatments. However, between treatments T1, T2 and T3 the behavior of the two species were similar. Regarding algal responses to treatments, *Monorraphyidium sp.* responded better to treatments, becoming more evident the differences between control and treatments, not only by the density presented but also by the morphological aspect, which indicates the possibility to be a bioindicator.

Words-keys: Green seaweed; Cultivation, Herbicides and Morphology.

LISTA DE FIGURAS

Figura 01- Imagem de Satélite, mostrando a posição do canal de drenagem em toda a extensão do Rio Leão em relação ao Município de Laranjeiras do Sul, Pr.

Figura 02- Coleta de fitoplâncton e de material ficoperifiton (seixos) na estação de coleta de água da Sanepar no Rio Leão, Laranjeiras do Sul, Paraná, outubro de 2019.

Figura 03- Estrutura utilizada para o cultivo de microalgas no laboratório de Limnologia da Universidade Federal da Fronteira Sul.

Figura 04- Processo de verificação das amostras se está adequadas para o isolamento de microalgas por meio da técnica de capilar, A amostragem não qualificada para isolamento, B amostragem ideal para isolamento, realizada a técnica no Laboratório de Limnologia da Universidade Federal da Fronteira Sul.

Figura 05- Processo de isolamento de microalgas, visualização dos táxons escolhidos a partir de sua visualização em microscópio estereoscópio Binocular 20X no Laboratório de Limnologia da Universidade Federal da Fronteira Sul, outubro, 2019.

Figura 06 - A intensidade luminosa usada Lâmpada led (Grow 28w Plantas Cultivo Indoor Estufa Full Spec) letra A com a aplicação de iluminação artificial em ambientes (luminotécnica) letra B, realizado Laboratório de Limnologia da Universidade Federal da Fronteira Sul, outubro, 2019.

Figura 07- Rotulagem do glifosato substância utilizadas no experimento de microalgas como bioindicador no Laboratório de Limnologia da Universidade Federal da Fronteira Sul, novembro, 2019.

Figura 08- Demonstração da câmara de Neubauer, seus quadrantes de contagem.

Figura 09- Procedimento de adição do glifosato letra A, verificação dos quadrantes para contagem letra B e contagem na câmara letra C realizado no Laboratório de Limnologia da Universidade Federal da Fronteira Sul, novembro, 2019.

Figura 10- Frasco após adicionar o glifosato letra A, a substância apresentou uma característica lipofílica letra B, experimento ocorrido no Laboratório de Limnologia da Universidade Federal da Fronteira Sul, novembro, 2019.

Figura 11 - Densidade dos táxons *Monoraphydium sp.* e *Desmosdesmus quadricauda* (Indi. $\times 10^5 \mu\text{m/l}$), nos diferentes tratamentos (controle, preta), Tratamento um (T1) vermelho, Tratamento dois (T2) cinza e Tratamento 3 azul marinho), ao longo do experimento realizado no laboratório de limnologia da UFFS, campus Laranjeiras do Sul, 2019.

Figura 12 - Mortandade dos táxons *Monorraphyidium sp.* e *Desmosdesmus quadricauda* (Indi. $\times 10^5 \mu\text{m/l}$) nos diferentes tratamentos (controle (linha preta), Tratamento um (T1) vermelho, Tratamento dois (T2) cinza e Tratamento 3 azul marinho), ao longo do experimento realizado no laboratório de limnologia da UFFS, campus Laranjeiras do Sul, 2019.

Figura 13 - Comportamento reprodutivo, letra (A) troca de material genético para reproduzir e espécie *Monorraphyidium sp.* (E1), letra (B) Células livres de *Desmosdesmus quadricauda* (E2), comum em cultivo devido a circula no Laboratório de Limnologia da Universidade Federal da Fronteira Sul, novembro de 2019.

Figura 14 - Morfologia da espécie *Desmosdesmus quadricauda* (E2), letra (A) formação mais arredondada juntamente com deslocamentos dos períodos, letra (B) malformação dos espinhos, letra (C) degradação dos cloroplastos de tons esverdeados para acinzentados e mortalidade letra (D) pesquisa com total e 96 horas no Laboratório de Limnologia da Universidade Federal da Fronteira Sul, novembro, 2019.

Figura 15 - *Monorraphyidium sp.* na câmara de Neubauer demonstrando um comportamento de agrupamento no Laboratório de Limnologia da Universidade Federal da Fronteira Sul, novembro, 2019.

Figura 16 - Análise morfológica na letra (A) degradação dos cloroplastos de tons esverdeados para acinzentados, letra (B) lesões na parede celular com degradação do conteúdo celular, letra (C) deformações na membrana e alteração no formato da célula, letra (D) aparecimento de melanomas na parede celular e por fim na letra (I) células mortas no Laboratório de Limnologia da Universidade Federal da Fronteira Sul, novembro, 2019.

Figura 17 - Densidade e Mortalidade dos táxons de *Monorraphyidium sp.*, *Desmosdesmus quadricauda* (Indi. $\times 10^5 \mu\text{m/l}$), nos diferentes tratamentos (controle (linha preta), Tratamento um (T1) vermelho, Tratamento dois (T2) cinza e Tratamento 3 azul marinho), ao longo do experimento realizado no laboratório de limnologia da UFFS, campus Laranjeiras do Sul, 2019.

LISTA DE TABELAS E QUADROS

Tabela 01- Preparo das soluções estoque para o meio de cultura ASM-1, modificado por Gorham; Mclachalan; Hammer (1964).

Tabela 02- Parâmetros gerais de manutenção do cultivo.

Tabela 03- Substância que foi utilizada para realizar o experimento.

Quadro 01- Possibilidades de Atributos a serem mensurados em diferentes níveis biológicos, ao se escolher um bioindicador em um ecossistema.

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	14
1.1.1.	Objetivo geral	16
1.1.2.	Objetivos específicos	16
2.	REFERENCIAL TEÓRICO	16
2.1.1.	Contexto da Legislação Federal de Agrotóxicos	16
2.1.2.	Comissão Técnica Nacional de Fitossanitários (CTNFito)	18
2.1.3.	Importância da Água	18
2.1.4.	Algas como Bioindicadores Ambientais	21
3.	METODOLOGIA	24
3.1.1.	Local	24
3.1.2.	Local da coleta das Microalgas	24
3.1.3.	Coletas de Microalgas	25
3.1.4.	Estrutura de Cultivo	26
3.1.5.	Cultivo	27
3.1.6.	Meio de Cultura ASM-1	29
3.1.7.	Temperatura	31
3.1.8.	Intensidade luminosa (Lux)	31
3.1.9.	pH dos cultivo	32
3.1.10.	Tratamento	32
3.1.11.	Substância utilizada nos tratamentos	33
3.1.12.	Contagem das Microalgas	34
3.1.13.	Fator de correção	36
3.1.14.	Análise estatística	36
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	37
5.	CONSIDERAÇÕES FINAIS	47
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	49

1. INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, os ecossistemas aquáticos têm sido alterados em diferentes escalas como consequência negativa de atividades antrópicas, por exemplo, agricultura, mineração, canalização, construção de represas, eutrofização artificial e outros. A utilização desordenada da água pelo homem aumentou e produziu um enorme conjunto de degradação ambiental (PINTO-COELHO et al.,2016). Essencial à vida e à sobrevivência de todos os organismos vivos incluindo o homem, a água é conhecida como solvente universal, como uma substância líquida e insípida, encontrada em grande abundância na natureza e transporta compostos orgânicos, gases, elementos e substâncias dissolvidas (TUNDISI, 2005; GRANZIERA, 2006; TUNDISI, 2008). Resultados de pesquisas científicas têm revelado que a contaminação da água se apresenta como um grave problema ambiental nas últimas décadas. Dados demonstram que os recursos hídricos de forma geral sofrem contaminação a partir de produtos usados na indústria, agricultura, além de resíduos domésticos e esgotos sem tratamento, seja no espaço rural, ou no urbano (CAMPONOVARA, 2006).

Nos últimos anos, o nível de glifosato nos ecossistemas aquáticos vem aumentando de forma alarmante como resultado da atividade antropogênica sobre o meio ambiente. Famoso, o herbicida glifosato (N-fosfometil-glicina) é um dos dez agrotóxicos mais consumidos no Brasil. Seu princípio ativo foi o mais utilizado em 2013, de acordo com o Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários (Agrofit). O glifosato é um ácido orgânico fraco formado por uma molécula de glicina e outra de fosfometil, sendo a sua forma mais frequente o sal de isopropilamina, usualmente associado com o surfactante polioxietilenoamina (POEA). O glifosato é o principal ingrediente ativo de diversos agrotóxicos usados em plantações e jardins. São 110 produtos com a substância comercializados no Brasil, produzidos por 29 empresas diferentes, segundo a agência. Em 2017, cerca de 170 mil toneladas de produtos com glifosato foram usadas no país (TAVARES 2005). Tal fato tem contribuído para a redução da qualidade ambiental, bem como para o comprometimento da saúde dos seres vivos que habitam esses ecossistemas. No entanto, é fundamental um olhar crítico e mitigador quanto à manutenção da quantidade e qualidade da água, recurso natural indispensável para todos os modos de vida no planeta. Desta forma, é de extrema importância o monitoramento dos recursos hídricos através de indicadores biológicos, físicos e químicos de qualidade da água, assim como a avaliação de resíduos de agrotóxicos (PANAMERICAN HEALTH ORGANIZATION, 2001).

As técnicas para a avaliação destes impactos utilizando bioindicadores vêm sendo bastante utilizadas, as quais são divididas em duas abordagens principais: aquelas associadas aos níveis de organização, tais como populações, comunidades e ecossistemas, aquelas relacionadas ao nível individual que trata de alterações comportamentais, malformações, mudanças nas taxas de crescimento, reprodução, alimentação, alterações bioquímica e fisiológica, neste último podem ser incluídas as alterações na integridade da membrana celular, no transporte de íons, no metabolismo celular e em atividades enzimáticas (JACOB Et All, 2002; ARIAS, Et All, 2006). De acordo com Arias, *et al* (2006) “..Indicadores em diferentes níveis de organização biológica fornecem informações complementares, necessárias para a análise de risco ecológico.”

A utilização de bioindicadores (monitoramento) ou monitoramento biológico torna-se uma ferramenta relevante, já que é baseada em reações visíveis do organismo indicador e as substâncias presentes na água. Este método é chamado de indicação (monitoramento) sensitiva. Para o biomonitoramento podemos selecionar espécies que acumulem a substância a ser monitorada, medindo a concentração da substância no organismo, ou verificar o comportamento do mesmo a exposição da substância. Este procedimento é chamado de indicação acumulativa. Sua principal aplicação, no entanto, é medir os impactos das atividades humanas nos ecossistemas (HOLT et, al 2010). As algas, por apresentar ciclo de vida curto respondem rapidamente às variações ambientais, são organismos capazes de ocupar todos os meios que lhes ofereçam luz e umidade suficientes, temporárias ou permanentes, o que as torna um ótimo bioindicador (VIDOTTI; ROLLEMBERG, 2004).

O termo algas não possui valor taxonômico, visto que os organismos não compartilham um ancestral em comum (grupo polifilético) e estão dispersos em vários ramos da árvore da vida. Devido a esta característica, as algas são muito diferentes entre si quanto à morfologia e fisiologia. Podem ser unicelulares, coloniais, filamentosas, pseudofilamentosas, parenquimatosas, pseudoparenquimatosas ou cenocíticas. São amplamente distribuídas, ocorrem em todos os tipos de ambientes aquáticos e até mesmo em superfícies úmidas associadas com plantas, fungos e solo (BICUDO & MENEZES, 2017).

Neste contexto, a escolha de microalgas como bioindicadoras de qualidade de água se deu pelo conjunto de características biológicas já observadas e comprovadas cientificamente, tais como: ciclo de vida curto, ampla ocorrência natural, facilidade de coleta de material biológico e fácil reprodução em laboratório. Desta forma, optou-se por coletar, separar e reproduzir espécies de algas encontradas no rio Leão na estação de coleta da Sanepar.

1.1. OBJETIVOS

1.1.1. Objetivo geral

Avaliar a resposta das microalgas *Desmodesmus quadricauda* e *Monoraphidium* sp. como bioindicadoras em presença de glifosato.

1.1.2. Objetivos específicos

- Coletar e isolar microalgas do Rio Leão
- Identificar e selecionar
- observar os efeitos do Glifosato, em 3 concentrações sobre as algas selecionadas: números de indivíduos, morte e alterações morfológicas.

2. - REFERENCIAL TEÓRICO

2.1.1. Contexto da Legislação Federal de Agrotóxicos

O Brasil é o maior consumidor de agrotóxicos do mundo, isso se deve a isenção de impostos que, no caso da alíquota de ICMS (Imposto sobre Circulação de Mercadorias e Serviços) a redução chega a 60%, concedida através do convênio 100/97. A última normativa, em outubro de 2015, estendeu a validade do convênio até o final de abril de 2017. Em alguns estados, como o Ceará, a isenção fiscal chega a 100%.

Segundo Carneiro (2015), o Brasil vem consumindo 20% do agrotóxico que é comercializado mundialmente. Entre 2000 e 2014, dados apontam que o país saiu de um consumo de cerca de 170 mil toneladas para 500 mil, um acréscimo de 194% em quinze anos. Em 2017, as indústrias de agrotóxicos movimentaram cerca de R\$ 30 bilhões, e pelas contas feitas pelas organizações Terra de Direitos e FIAN Brasil, junto com a Campanha Permanente Contra os Agrotóxicos e pela Vida, e a Associação Brasileira de Agroecologia (ABA), o país deixou de arrecadar pelo menos R\$ 1,3 bilhão com as isenções concedidas a esses produtos, (DO DOSSIÊ, 2017). Também não entram na conta os incalculáveis danos ambientais, a perda da biodiversidade como o extermínio de insetos polinizadores, entre eles abelhas, e a contaminação do solo e das águas, que por sua vez trará doenças e mais prejuízos financeiros para todos.

A lei federal que regulamenta a utilização de agrotóxicos, chamada Lei de Agrotóxico nº 7.802/1989 artigo 8, inciso I, refere :

Art. 8º: “A propaganda comercial de agrotóxicos, componentes e afins, em qualquer meio de comunicação, conterà, obrigatoriamente, clara advertência sobre os riscos do produto à saúde dos homens, animais e ao meio ambiente, e observará o seguinte:

I - estimulará os compradores e usuários a ler atentamente o rótulo e, se for o caso, o folheto, ou a pedir que alguém os leia para eles, se não souberem ler;

II - não conterá nenhuma representação visual de práticas potencialmente perigosas, tais como a manipulação ou aplicação sem equipamento protetor, o uso em proximidade de alimentos ou em presença de crianças;

III - obedecerá ao disposto no inciso II do § 2º do art. 7º desta Lei.

O Inciso II do § 2º do artigo 7º da Lei 7.802/89 define: (I - não dificultem a visibilidade e a compreensão dos dados obrigatórios; II - não contenham: a) afirmações ou imagens que possam induzir o usuário a erro quanto à natureza, composição, segurança e eficácia do produto, e sua adequação ao uso; b) comparações falsas ou equívocas com outros produtos; c) indicações que contradigam as informações obrigatórias; d) declarações de propriedade relativas à inocuidade, tais como "seguro", "não venenoso", "não tóxico"; com ou sem uma frase complementar, como: "quando utilizado segundo as instruções"; e) afirmações de que o produto é recomendado por qualquer órgão do governo.

Essa lei, artigo 2, inciso I, define: o termo “Agrotóxico”, utilizado na atual legislação, deixa de existir para em 2019 surgir uma nova nomenclatura: “defensivo fitossanitário”, “defensivo agrícola” ou “pesticida” modificado pelo projeto de lei 6299/2002 (SANTOS, 2019). O projeto estabelece níveis “aceitáveis” de uso de agrotóxicos cancerígenos, embora não existam limites seguros.

Segundo o Artigo 3º, § 6º, alínea “c” da Lei 7.802/8 é proibida os agrotóxicos que “revelem características teratogênicas (anormalidade do desenvolvimento biológico), carcinogênicas ou mutagênicas (dano na molécula do DNA), de acordo com os resultados atualizados de experiências da comunidade científica”. De acordo Artigo (3º, § 6º); “Fica proibido o registro de agrotóxicos, seus componentes e afins:

- a) Para os quais o Brasil não disponha de métodos para desativação de seus componentes, de modo a impedir que os seus resíduos remanescentes provoquem riscos ao meio ambiente e à saúde pública;
- b) Para os quais não haja antídoto ou tratamento eficaz no Brasil;
- c) Que revelem características teratogênicas, carcinogênicas ou mutagênicas, de acordo com os resultados atualizados de experiências da comunidade científica;
- d) Que provoquem distúrbios hormonais, danos ao aparelho reprodutor, de acordo com procedimentos e experiências atualizadas na comunidade científica;

E) que se revelem mais perigosos para o homem do que os testes de laboratório, com animais, tenham podido demonstrar, segundo critérios técnicos e científicos atualizados;

F) “cujas características causem danos ao meio ambiente”.

2.1.2. Comissão Técnica Nacional de Fitossanitários (CTNFito)

O governo brasileiro está alterando a legislação que regulamenta a liberação dos agrotóxicos por meio de um Projeto de Lei (PL) que define o Ministério da Agricultura como o responsável por registrar novos agrotóxicos no País, tirando da Anvisa (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) e do Ibama (Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis) o poder de veto que atualmente esses órgãos têm. Ou seja, o governo deixa de considerar os impactos à saúde e ao meio ambiente com essa mudança, assim altera o artigo 4º da Lei 7.802/89 (BRASIL, 2019).

Atualmente, a portaria 2.914/MS/2011 que regulamenta a portabilidade das águas brasileiras, permite a presença de 27 agrotóxicos em águas para consumo, aplicando para cada um deles um Limite Máximo de Resíduos (LMR) específico. No entanto, o Diário Oficial da União, no Ato nº 24, autorizou mais 31 ingrediente ativos, totalizando 152 agrotóxicos liberados somente no decorrer do primeiro semestre do ano de 2019.

2.1.3. Importância da Água

A água é fundamental para a manutenção da vida no planeta. Água escreve a história, cria culturas e hábitos, determina a ocupação de territórios e determina o futuro de gerações. Portanto, falar da relevância dos conhecimentos sobre a água, em suas diversas dimensões, é falar da sobrevivência da espécie humana, da conservação e do equilíbrio da biodiversidade e das relações de dependência entre seres vivos e ambientes naturais (BACCI e PATACA, 2008). A qualidade da água é resultante de fenômenos naturais, como a percolação, o escoamento superficial e infiltração no solo, que modificam suas características, incorporando impurezas do solo em sua composição e também muitas vezes a retirada de outras presentes na água. As ações antrópicas relacionadas, principalmente ao desmatamento desordenado, despejos de efluentes sem o devido tratamento, atividades relacionadas ao uso e ocupação do solo desordenado, cargas pontuais domésticas e industriais, e de cargas difusas de origem urbana e rural, também determinam as substâncias presente na água (SPERLING, 2005; MODESTO et al, 2013; LOPES e ALBUQUERQUE, 2018). Tais intervenções podem levar

a prejuízos como mudanças drásticas na dinâmica e estrutura da biota aquática e redução da saúde do ecossistema seja ela profunda ou suave (NAIME et al; 2012).

Ha Portaria MS nº 2.914/2011, desde seus primórdios, dispõe sobre os procedimentos de controle e vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de portabilidade e além de apresentar a amostragem de agrotóxicos deve considerar a avaliação dos seus usos na bacia hidrográfica, no manancial de contribuição, bem como a sazonalidade das culturas.

Para verificar a qualidade água são avaliados diversos parâmetros, indicadores da sua qualidade. As características físicas, químicas e biológicas da água estão associadas a uma série de processos que ocorrem no corpo hídrico e em sua bacia de drenagem.

Vale salientar que quando se detecta contaminação é necessário que se estipule um plano de monitoramento. Este deve considerar as especificidades locais e, por conseguinte, priorizar os municípios com maior probabilidade de ocorrência de agrotóxicos na água de consumo humano, devendo ser observado os seguintes passos (SPADOTTO, et al; 2004): levantamento dos agrotóxicos com uso mais difundido no estado e da periodicidade de aplicação dessas substâncias; definição dos agrotóxicos prioritários a serem analisados, de acordo com o levantamento realizado e com o disposto no padrão de portabilidade; levantamento da capacidade analítica disponível; definição do número de amostras a serem coletadas; definição da frequência de amostragem, considerando a periodicidade de uso de agrotóxicos e a sazonalidade das culturas (período de chuvas ou início da seca); e definição dos pontos de coleta e, se necessário, municípios prioritários.

A contaminação das águas pode ser de caráter físico, químico e biológico, podendo manifestar-se de diferentes formas, como poluição orgânica, térmica, produtos tóxicos gerados por indústria e agroquímicos de natureza diversa (ROSA 2017). Pode-se dizer que a poluição origina-se principalmente de efluentes domésticos, efluentes industriais e da exploração agrícola, associada principalmente, ao tipo de uso e ocupação do solo, levando a vários processos alteradores da qualidade do meio ambiente, afetando a biota aquática (HOLMES, 1996; VARIS, 1996; HESPANHOL 2009).

Os agrotóxicos são considerados os contaminantes mais comuns em águas superficiais e subterrâneas (DORES et al; 2008), fato este corroborado pelos estudos de monitoramento de resíduos de agrotóxicos, os quais têm aumentado ano a ano, e sinalizando que resíduos de agroquímicos estão presentes nos alimentos (ANVISA, 2013), na atmosfera (MOREIRA et al., 2012) e nas precipitações (chuvas) (NOGUEIRA et al., 2012). As maiores

rotas de dispersão dos pesticidas para o sistema aquático são o escoamento superficial, através da erosão e lixiviação de solos e da drenagem, processo de deriva de pulverizações aéreas e pelo descarte e lavagem irregular das embalagens. O tipo de planta cultivada e a topografia do terreno ou importância decisiva na maioria dos processos de contaminação (PRIMEL et al., 2005; SOARES, 2011; BRITTO et al., 2011).

A aplicação de pesticidas está inserida em diversos modelos de produção. Além disso, aumento no tamanho da área cultivada também resultou em aumento no nível de contaminação. Segundo Soares & Porto (2007), em cada 10.000 ha de lavoura constituída aumenta as chances de contaminação da água e do solo em 6%. A elevada aplicação desses agentes, sem o emprego das devidas medidas de biossegurança, vem contribuindo para a degradação ambiental e para o aumento da incidência de intoxicação ocupacional, tornando-se um dos principais problemas para o meio aquático (KORBES, 2009; DELLAMATRICE e MONTEIRO, 2014).

A presença de agentes químicos nos vários ecossistemas representa sempre um risco aos seres vivos, não existindo, praticamente, o que se poderia chamar de “risco zero” quando ocorre a exposição a estas substâncias (SILVA 2009). As comunidades biológicas que existem em um corpo d’água são o resultado da integração de processos físicos, químicos e biológicos complexos e inter-relacionados ao longo do tempo (MOTTA MARQUES, 1998).

Substâncias muito comum de se encontrar na água, o glifosato e o ácido aminometilfosfônico, herbicidas mais consumidos no Brasil (venda/173.150,5 ton/2017) e no Paraná, são utilizados na agricultura, no controle de plantas daninhas aquáticas emergentes em águas superficiais ou margens de corpos d’água (SALOMON & THOMPSON, 2003; DOMINGUES, 2019). Ao verificar os dados na Agência de Defesa Agropecuária do Paraná (ADAPAR) de consumo dos anos de 2014 a 2017, a média de consumo no Paraná de agrotóxicos de 239,8 toneladas/ano e o consumo médio de 6,4 kg por hectare.

O glifosato foi o princípio ativo mais consumido nos anos de 2015 e 2016. Em 2014 o consumo foi de 15,44% do total de agrotóxico consumidos no Brasil em 2016 de 30,47%. Já em 2017 quantidades de glifosato consumida foi de 27.590 toneladas. De acordo com dados da Secretaria de Saúde do Paraná, 2018, “Vigilância Da Saúde De Populações Expostas a Agrotóxicos no Paraná”, o glifosato foi o agrotóxico que mais causou intoxicações relacionadas ao trabalho, seguido dos organofosforado, (ANVISA, 2018). Nos casos mais graves, os agrotóxicos podem desencadear a morte de várias espécies de plantas e animais aquáticos, influenciando toda a comunidade aquática. Algumas espécies não morrem por

causa do contato com os agrotóxicos, mas acabam acumulando-os em seu corpo. Esse acúmulo faz com que o produto seja passado através da cadeia alimentar prejudicando, assim, outras espécies (SANTOS, 2019). Segundo CAMPOS (2013), ecossistemas aquáticos são sistemas abertos, dessecativos, dotados de uma estrutura particular e que cumpre certa função ecológica. Já nos rios a descarga de poluentes geralmente não é detectada no local de lançamento, manifestando-se em pontos distantes daqueles da origem, em função da correnteza ou mesmo pelo fato de fluírem para as comunidades de seu curso inferior.

2.1.4. Algas como Bioindicadores Ambientais

As análises químicas de qualidade da água podem proporcionar respostas de grande precisão, porém limita-se puramente ao monitoramento da presença de substâncias químicas, além, o um considerável custo em cada análise. Ainda, sua utilização pode apresentar limitações como: a impossibilidade de análise de todos os químicos, dado o custo e a tecnologia necessária, nem todos os químicos potencialmente tóxicos são conhecidos; o conhecimento das concentrações na água nem sempre revela uma biodisponibilidade para a biota; os químicos podem reagir de forma sinérgica e/ou antagônica com outros químicos ou fatores ambientais; no momento em que um químico tóxico for detectável, substancial impacto biológico provavelmente já ocorreu; medidas de variáveis da qualidade de água (oxigênio, pH, nutrientes) são limitadas no seu uso como premonitórios, no entanto são essenciais para a diagnose das causas da mudança na biota (BRASIL, 2006).

Em contraste, o exame biológico proporciona a identificação de correlações entre fatores bióticos e abióticos evidenciando, desta forma, mudanças ecológicas de caráter significativo e tendo menor custo agregado (VANACOR, 2005).

Os bioindicadores apresentam vantagens como: atestar o impacto da poluição sobre um ecossistema; fornecer informações sobre as causas e fatores observados; demonstrar a distribuição espacial e temporal do impacto; fornecer dados sobre um potencial risco para a flora, fauna e população humana. Todavia, não são capazes de substituir outros métodos, como estimativa da taxa de emissão ou medidas de concentrações ambientais do poluente (KLUMPP, 2001).

Deve-se, portanto, considerar alguns pressupostos em relação ao bioindicador utilizado, tais como: o conhecimento da dinâmica espaço-temporal do organismo ou da comunidade analisada; o conhecimento de suas relações inter e intraespecíficas; os fatores limitantes; a tolerância dos organismos (KAPUSTA, 2016). Outro fato importante é

determinar o que se quer observar, ou seja, ver a que grau de complexidade se quer chegar com a análise (Quadro 01), ver custos e possibilidades para isto.

Quadro 01: Possibilidades de atributos a serem mensurados em diferentes níveis biológicos, ao se escolher um bioindicador em um ecossistema.

Diretos			Indiretos/Metabolismo	Indiretos	
Bioquímico	Fisiológico	Histológico/ morfológico	Indivíduo	População	Comunidade
Metabólitos biliares	Enzima transaminase	Necrose	Crescimento	Abundância	Riqueza de espécies
Integridade de DNA	Triglicerídeos	Agregados macrófagos	Acúmulo de gordura	Distribuição etária	Índice de diversidade
Enzimas antioxidantes	Função imunológica	Lesões	Fator de condição	razão sexual	Espécies sensíveis
	Hormônios esteróides	Carcinomas	Comportamental, distribuição diferencial	Parâmetros bioenergéticos	Estrutura trófica

Fonte: <https://www.esd.ornl.gov/programs/bioindicators/biologicalresponsestostress.htm>, acessado em: 29 de novembro/2019 Adaptados, NUNES, 2019.

O biomonitoramento pode ser definido pelo uso de organismos vivos ou das avaliações respostas de organismos vivos determinar a qualidade do ambiente, dividido em duas categorias biensaio e bioavaliação. Os bioensaios são baseados em experimentos em laboratórios, chamados comumente de testes de toxicidade. Já para bioavaliação a pesquisa é realizada no campo (MAGALHARS et al; 2008).

Nos testes de bioensaios de toxicidade, a escolha de um bom material biológico é determinante para a obtenção de resultados consistentes. Este deve ser bastante sensível, de fácil obtenção e manuseio, além de apresentar respostas claras, estar disponível ao longo de todo o ano e ter importância ecológica e, por essas características, as microalgas se tornam uma alternativa eficaz do meio aquático (BASSFELD et al; 2011).

As microalgas são os produtores primários e fazem parte da primeira alimentação de muitos organismos presentes no ambiente aquático. Responsáveis principalmente pela fotossíntese, produzindo oxigênio. Apresentam ampla diversidade de formas, funções e estratégias de sobrevivência. São organismos que variam entre unicelulares isoladas ou agregadas, pluricelulares, colônias; que reúnem organismos eucariotos e procariotos, que apresentam além de clorofila, outros pigmentos assimiladores, o que determina sua coloração

diversa (BICUDO, 2010). Bicudo e Menezes (2006) denominam o termo “alga” e englobam uma grande discussão:

O termo “alga” foi proposto oficialmente como uma categoria taxonômica em 1753, por Lineu, no clássico *Species plantarum*. Após seu nascimento, o termo alga foi usado para determinar uma enorme variedade de organismos e sua interpretação tem sido tão discutida que hoje não se pode mais lhe atribuir um significado preciso. Alga é um termo de uso popular, como palmeira ou grama, utilizado para designar um verdadeiro universo de organismos tão diferentes quanto sua morfologia, reprodução, fisiologia e ecologia, o que torna praticamente impossível sua definição [...]. A natureza essencialmente negativa da caracterização das algas é decorrente da enorme variação de estrutura, formas de reprodução, históricos de vida, processos fisiológicos e de ambientes em que vivem os organismos reunidos sob tal denominação (BICUDO E MENEES, 2006 pg).

As algas verdes são fotossintetizantes, pertencem ao grupo de algas mais relacionado com as plantas terrestres e possuem grande importância ecológica, uma vez que são constituintes do fitoplâncton e um dos principais produtores na cadeia trófica, além de também serem utilizadas como bioindicadoras da qualidade da água. Chlorophyceae é uma das classes de algas verdes conhecida por sua grande variedade de morfologia vegetativa e grande representatividade quanto ao número de táxons em corpos aquáticos tropicais. Os gêneros *Desmodesmus* sp. e *Monoraphidium* sp. São os maior abundância no Brasil em águas doce (CONCEIÇÃO, 2016).

Na natureza, a microalga *Desmodesmus quadricauda* é encontrada na forma agregada formando cenóbios. Em cultivos pode ser encontrada de forma unicelular, caracteristicamente planctônica de água doce, pertencendo ao grupo Chlorophyta. (PAN et al., 2011) (SAMORI et al., 2013).

Além disso, este organismo é muito utilizado como bioindicador para detecção de nutrientes e substâncias tóxicas detergentes, efluentes industriais e herbicidas (LOBO et al. 2002 et al. 2002; RICHMOND, 2004). *Monoraphidium* sp. se caracteriza por células em geral solitárias, raramente reunidas, por curto intervalo de tempo, em pares ou tétrades resultantes do processo de reprodução. Quando a célula afina gradualmente para as extremidades, os pólos são agudos e quando o faz repentinamente, os pólos podem ser mais ou menos arredondados. O único cloroplastídio é parietal, localiza-se lateralmente na célula e tem a forma de uma lâmina que reveste internamente toda a parede celular. Com a idade, este plastídio se afasta dos pólos e da região mediana da célula. Mesmo nas células jovens, existe

uma reentrância lateral mediana do plasmídeo, em que se aloja o núcleo da célula (KOMÁREK et al; 1983; RAMOS et al; 2015; SILVA ;2015).

3. METODOLOGIA

3.1.1. Local

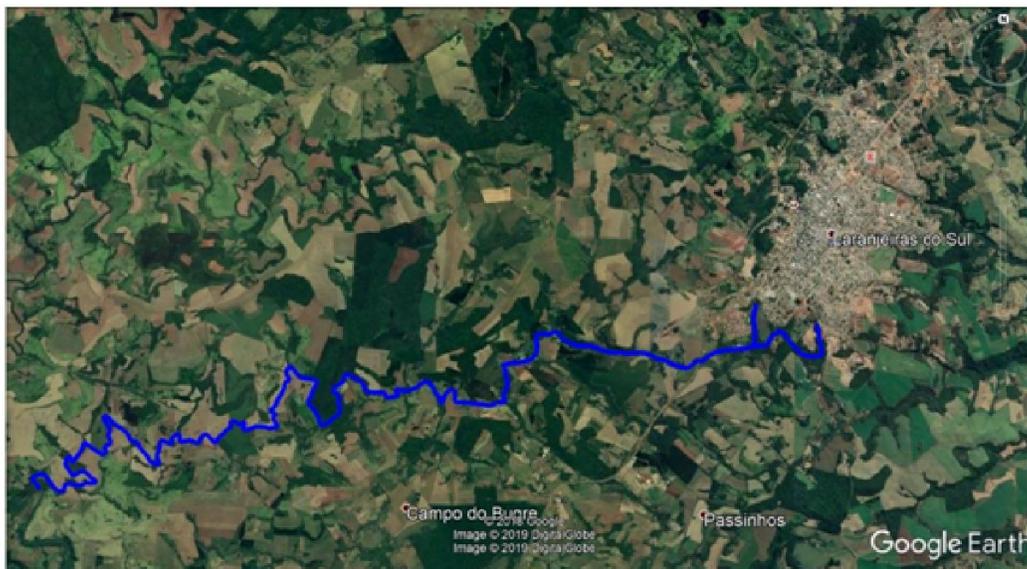
O experimento para a avaliação do uso potencial microalgas como bioindicadores para a detecção de diferentes concentrações de glifosato foi conduzido no Laboratório de Limnologia da Universidade Federal da Fronteira Sul – UFFS, *campus* Laranjeiras do Sul, no período de 21 de outubro a 26 de novembro de 2019.

3.1.2. Local da coleta das Microalgas

A coleta de microalgas a ser utilizada no experimento foi realizada no Rio Leão, situado no Centro Oeste do Estado do Paraná. De acordo com o CONAMA nº 357/05 o rio Leão é classe 2, pertencente à Bacia do rio Iguaçu, com área estimada de 62 Km² e deságua no rio Xagu. Também abrangendo parte da região Centro-Sul do Estado (VESTENA, 2004).

Ao longo de suas margens (Figura 01) deveria haver um limite mínimo de vegetação ripária, ou área de proteção permanente. Contudo, verifica-se que não há preservação, sendo possível observar que ao longo de sua extensão a atividade econômica predominante é de origem agropecuária, caracterizada pelo uso intensivo do solo. A ocupação marginal, na maioria das vezes ocorre de forma imprópria ou indevida, já que ocorre em áreas de preservação permanente, declivosas e em solos hidromórficos e rasos. Este tipo de exploração das margens em geral tem contribuído para a ocorrência de problemas ambientais, como erosão, assoreamento, comprometimento da qualidade da água, entre outros.

Figura 1- Imagem de satélite mostrando a posição do canal de drenagem em toda a extensão do Rio Leão em relação ao Município de Laranjeiras do Sul, PR.



Fonte: Google Earth, com dados modificados por NUNES, 2019.

Em áreas de atividade agrícola, vale salientar, que a principal preocupação deveria ser a contaminação dos recursos hídricos com resíduos de agrotóxicos, sendo que o principal mecanismo seria avaliar o impacto nestes locais através do monitoramento da qualidade das águas, através de políticas voltadas à saúde e o meio ambiente (GAMA; OLIVEIRA; CAVALCANTE, 2013). Observando-se a (Figura 01) que apresenta predominância de áreas agrícolas e poucos remanescentes florestais de preservação das suas margens.

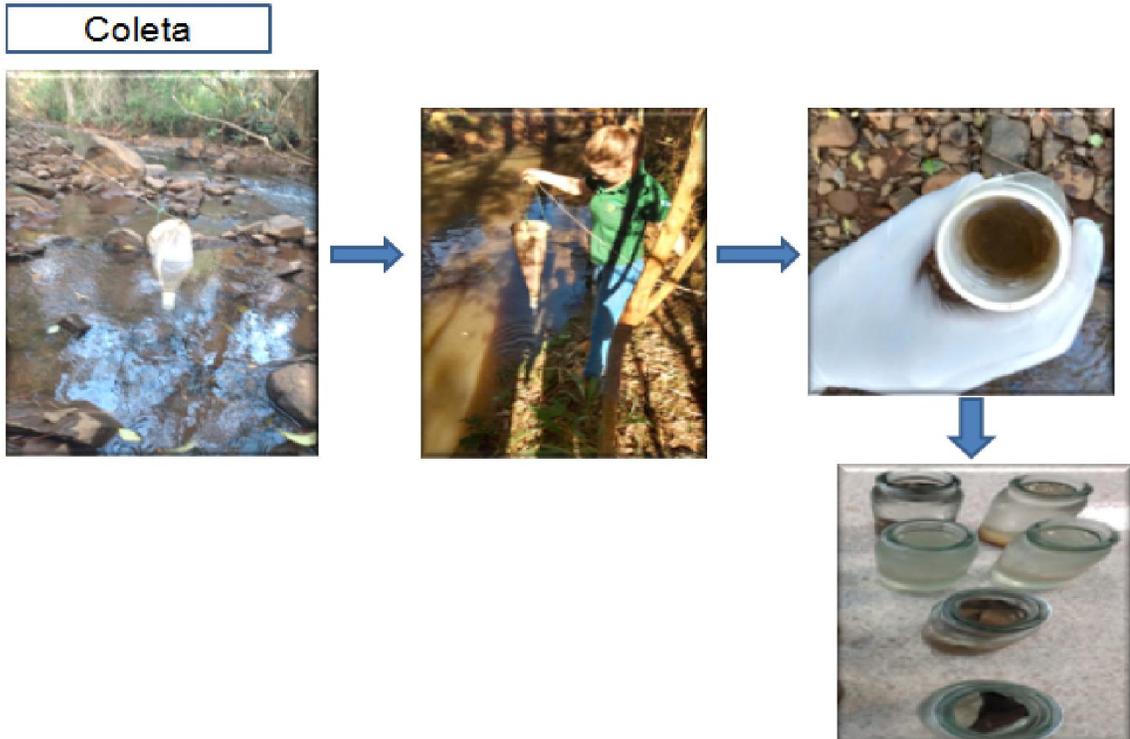
3.1.3. Coletas de Microalgas

Para garantir a integridade e qualidade das amostras utilizaram-se as normas do Guia Nacional de Coleta e Preservação de Amostras de Água, Sedimento, Comunidades Aquáticas e Efluentes Líquidos (2011), disponível no site da Agência Nacional de Águas (ANA).

A coleta foi realizada no mês de outubro de 2019, no período da manhã. Para coleta do fitoplâncton foi utilizado rede de plâncton 25 μ m, numa profundidade de 20 a 30 cm, deixada contra correnteza, na horizontal, durante 20 minutos, com o objetivo de coletar material da zona pelágica (Figura 02). Para amostragem da comunidade ficoperifítica, foram coletados seixos, e estes foram colocados em frascos para posterior remoção da comunidade ficoperifítica em laboratório. As amostras de fitoplâncton e de perifíton foram transportadas até o laboratório, onde o material perifítico foi removido com o auxílio de uma espátula e escova de dente e retornado ao frasco sem adição de fixador. Ambas as amostras foram

analisadas no laboratório de botânica em Microscópio Olympus CX21 LED, nos aumentos de 400X e 1000X, a fim de verificar organismos que pudessem ser isolados e depois serem cultivados em laboratório.

Figura 2- Coleta de fitoplâncton e de material ficoperifiton (seixos) na estação de coleta de água da Sanepar no Rio Leão, Laranjeiras do Sul, PR.



Fonte: NUNES, 2019.

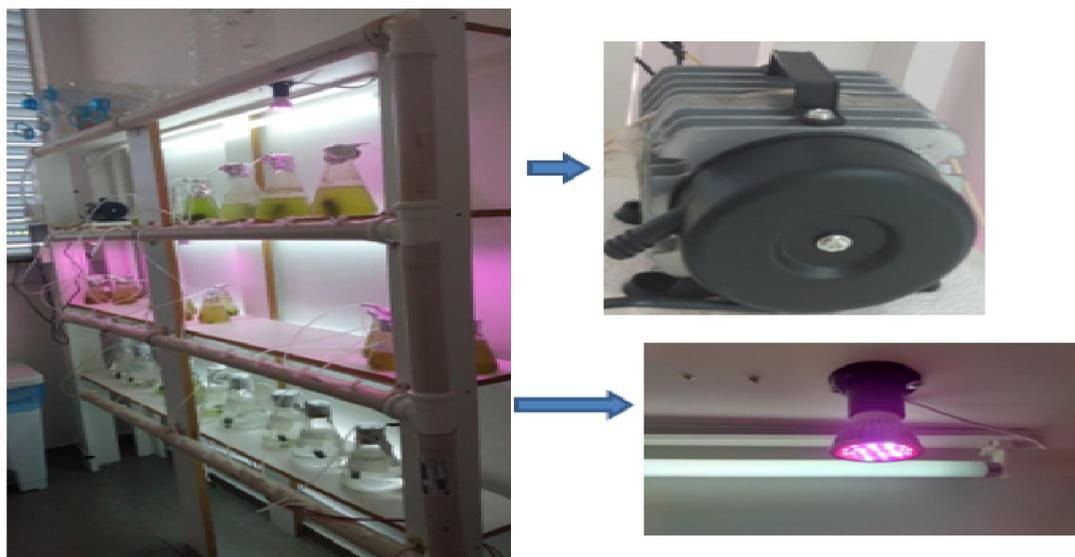
Logo após observação para identificar os organismos, as amostras foram levadas ao laboratório de limnologia da Universidade Federal da Fronteira Sul, *campus* Laranjeiras do Sul, PR, onde foi adicionado meio de cultura. A multiplicação das algas neste momento passou a ser importante para facilitar o processo de isolamento das espécies escolhidas.

3.1.4. Estrutura de Cultivo

O Laboratório de Limnologia é composto por uma infraestrutura para cultivo de microalgas composta por estante em madeira, com as dimensões de 2 metros de comprimento por 2,3 metros de altura e 0,3 metros de profundidade, dividida em quatro prateleiras e cada prateleira possui uma lâmpada fluorescente de 35w e na segunda prateleira possui mais 4 lâmpadas de led (Grow 28w Plantas Cultivo Indoor Estufa Full Spec). Este sistema é parte de um conjunto composto por compressor eletromagnético (Aco 004 0,080m³/m 220v 68w Resun Aquario) interligado por uma mangueira em um sistema de 5 canos de pvc de 40mm

com 1,5 m de comprimento, acoplados na tubulação, 2 tubos T, 2 joelhos mais 4 kap soldável e 30 tubos de oxigênio de aquário 10 pca, formando um sistema fechado com capacidade de 25 l/min de oxigenação (Figura 03). O ambiente é controlado e climatizado com ar condicionado mantido na temperatura de 22°C, de acordo com o conforto térmico determinado para as espécies.

Figura 3- Estrutura utilizada para o cultivo de microalgas no laboratório de Limnologia da Universidade Federal da Fronteira Sul, PR.



Fonte: NUNES, 2019.

3.1.5. Cultivo

Após a coleta, as amostras de água foram depositadas em Erlenmeyers de 1000 ml onde foi adicionado o meio de cultura, relaizado em laboratorio (ASM-1) para que houvesse multiplicação das espécies de algas. Posteriormente, as amostras foram incubadas definitivamente na estrutura de experimentação (estrutura de cultivo), com oxigenação e luz por um período de 2 semanas.

Com a mudança da coloração transparente para um tom esverdeado nos Erlenmeyers (Figura 04), foi possível inferir que as algas teriam se replicado em altas taxas, criando uma condição ideal para retirar os organismos de interesse para o estudo e na sequência serem testados como bioindicadores conforme protocolo (ABNT-NBR 12648/2004).

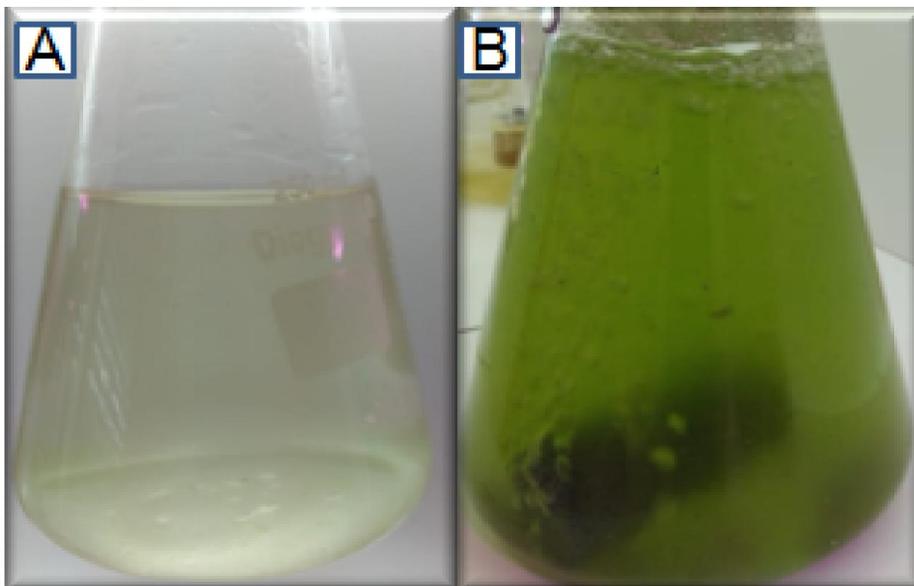
Para separação das espécies foi aplicada a técnica de isolamento por capilaridade (coleta com capilar de vidro, para espécies maiores de 30 μ) (Figura 05). Com alíquotas das amostras foram preparadas lâminas com três gotas de meio de cultivo. O material foi levado

para lupa e, com auxílio do capilar, foram coletadas as espécies (100 indivíduos de cada espécie) consideradas com potencial para bioindicadores (ABNT, 2004).

Para a escolha da(s) alga(s) a ser isolada foram elencados dois critérios: - apresentar grande número de indivíduos na coleta do rio; e apresentar como substância de reserva amido ou algum tipo de estrutura celular que fosse possível de identificar mudanças ou variações. De acordo com estes dois critérios foram selecionados quatro espécies: *Pediastrum simplex*, *Closterium* sp., *Desmodesmus quadricauda*, *Monorraphyidium* sp.

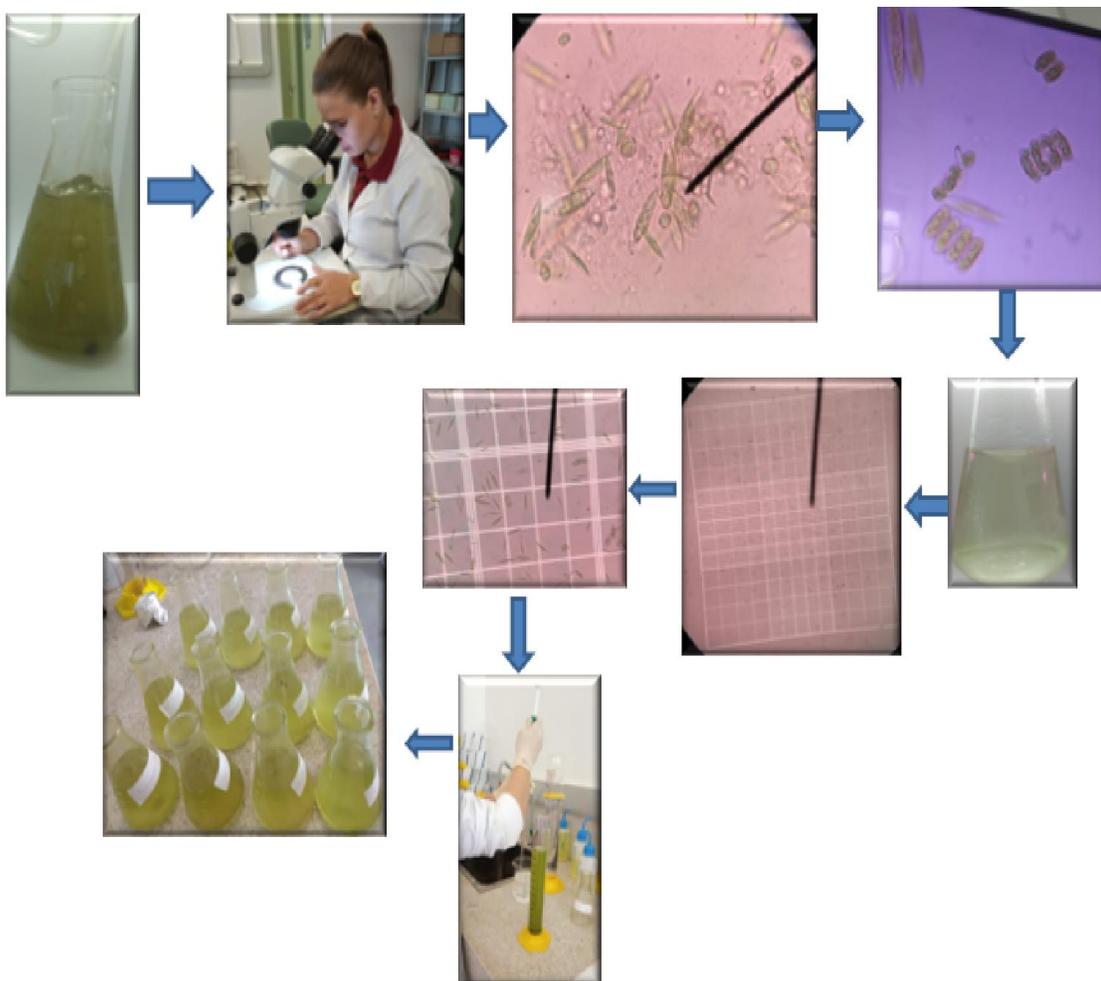
Destas outras espécies, após realização de cultivo em meio ASM-1, *Desmodesmus quadricauda* e *Monorraphyidium* sp. Foram as que melhor se adaptaram as condições laboratoriais, desenvolvendo-se adequadamente e possibilitando a realização da segunda parte do experimento.

Figura 4- Processo de verificação e adequação das amostras para o isolamento de microalgas por meio da técnica de capilar. [A]: amostragem não qualificada para isolamento, [B] amostragem ideal para isolamento, a técnica foi realizada no Laboratório de Limnologia PR.



Fonte: NUNES, 2019.

Figura 5- Processo de isolamento de microalgas com identificação dos táxons escolhidos a partir de sua visualização em aumento (20x) no Laboratório de Limnologia da Universidade Federal da Fronteira Sul.



Fonte: NUNES, 2019.

3.1.6. Meio de Cultura ASM-1

Os meios de cultura são utilizados com a finalidade de isolar e cultivar organismos em laboratório. No presente trabalho foi utilizado o meio de cultura artificial Seawater Medium Modifad ASM-1 (Tabela 01), indicado para Chlorophyta.

Tabela 01: Preparo das soluções estoque para o meio de cultura ASM-1, modificado por Gorham; Mclachalan; Hammer (1964).

Soluções Estoque	Nutrientes	Quantidade (g)
Sol. A	NaNO ₃	8,5000
	MgSO ₄ + 7H ₂ O	2,4500
	MgCl ₂ + 6H ₂ O	2,0500
	CaCl ₂ + 2H ₂ O	1,4500
Sol. B	KH ₂ PO ₄	8,7000
	Na ₂ HPO ₄ + 12H ₂ O	17,8000
Sol. C	H ₃ BO ₃	28,4000
	MnCl ₂ + 4H ₂ O	13,9000
	FeCl ₂ + 6H ₂ O	10,8000
	ZnCl ₂	3,3500
	CoCl ₂ + 6H ₂ O	0,1900
	CuCl ₂ + 2H ₂ O	0,0140
Sol. D	EDTA titriplex	18,6000

Fonte: Gorham; Mclachalan; Hammer (1964).

Para a preparação do meio de cultura ASM-1 é necessário que haja a preparação das soluções A, B, C e D, onde os compostos são diluídos em 1.000 mL de água deionizada e armazenados na geladeira em frascos de vidro âmbar, chamado de solução estoque. Para preparação de um litro meio de cultivo foram utilizados 20 ml da solução A, 5 ml da solução B e 0,4 ml da solução C e D, para o uso faz-se necessário que o meio de seja homogeneizado e seu pH ajustado em $7,2 \pm 0,4$ (pHmetro modelo PH- 1900 marca). Em seguida o meio de cultivo é autoclavado a 121 °C por 15 min, após atingir a temperatura do ambiente o meio está pronto para que se faça a inoculação das microalgas.

Além de meio de cultivo adequado, foram utilizadas condições gerais de manutenção dos organismos no laboratório. Para o crescimento das microalgas alguns parâmetros (Tabela 02) foram estabelecidos com a genialidade de manter os cultivos de maneira controlada e padronizadas mantidos de maneira controlada nos cultivos.

Tabela 02: Parâmetros gerais de manutenção do cultivo.

- Temperatura 18 – 27°C;
- Intensidade luminosa (Lux) 1000 – 10000;
- Fotoperíodo (horas) 24h00;
- pH 7-9.

Fonte: NUNES, 2019.

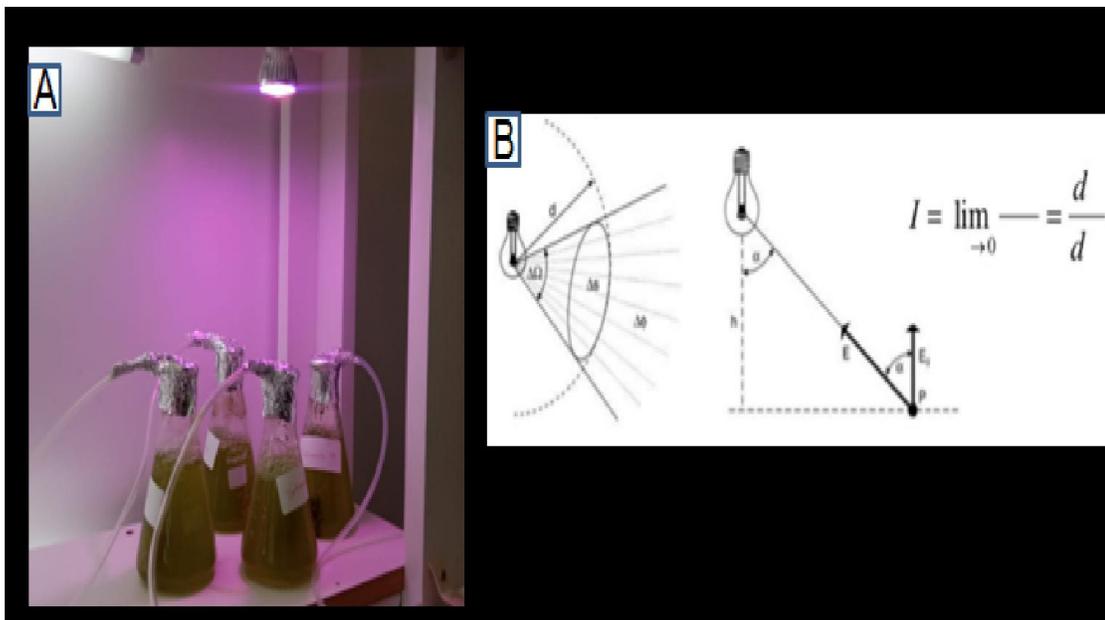
3.1.7. Temperatura

A temperatura ambiente é 22 C°, com ar condicionado, pois para algumas espécies a elevação da temperatura pode diminuir a quantidade de ácidos graxos insaturados e aumentar a quantidade de ácidos graxos saturados tornando o organismo mais resistente metabolicamente (THOMPSON; GUO; RENAUD et al., 2004).

3.1.8. Intensidade luminosa (Lux)

A fonte luminosa utilizada foi de lâmpada led (Grow 28w Plantas Cultivo Indoor Estufa Full Spec) que é energeticamente eficiente e também oferece todo o espectro de luz que as algas requerem para todo seu ciclo de vida. Seu funcionamento é muito mais frio que as lâmpadas incandescentes e também possuem grande penetração de luz (LAZZARINI, 2017). Na estrutura de cultivo foram colocados os Erlenmeyers com ostratamentos (T1, T2, T3 e controle) em formato de triângulo (Figura 06, letra A) com a finalidade de aperfeiçoar a capacidade da amplitude de iluminação da lâmpada led instalada no centro, segundo o estudo da aplicação de iluminação artificial em ambientes (luminotécnica) o que explica o fundamento de intensidade luminosa. Segundo RIGATTI (2003) a intensidade luminosa, de uma fonte em determinada direção, é o limite da razão do fluxo luminoso no interior de um ângulo sólido (dentro de uma esfera) cujo eixo é a direção considerada para esse ângulo quando tende para zero (Figura 06, letra B).

Figura 6 - Esquema de luminosidade utilizado com Lâmpada led (Grow 28w Plantas Cultivo Indoor Estufa Full Spec) letra A com a aplicação de iluminação artificial em ambientes (luminotécnica) letra B calculo de dimensão de luz.



Fonte: RIGATTI, 2003; NUNES, 2019.

Nesse aspecto, o formato em triângulo para os frascos possibilita a melhor difusão da luz entre os frascos para realização de fotossíntese. Desta forma o sistema permaneceu ligado por um período por dia até o final do experimento de 2 semanas.

3.1.9. pH dos cultivos

O pH influencia diretamente no crescimento das microalgas já que o consumo das formas inorgânicas do carbono faz com que o pH se eleve (LOPES, 2007). Sendo assim, o pH foi controlado em estado básico (7 a 9) para facilitar o desenvolvimento das espécies. A análise foi feita com auxílio de um peagômetro.

Deve-se ficar atento para o fato de que os diferentes grupos de microalgas possuem necessidades específicas de crescimento e que todos os parâmetros descritos aqui são para as espécies escolhidas.

3.1.10. Tratamento

No experimento foram testadas duas espécies de microalgas *Desmodesmus quadricauda* e *Monoraphidium* sp. oriundas do rio Leão como bioindicadores de presença de glifosato. Estas espécies foram submetidas a quatro tratamentos com T1= 125/ $\mu\text{m/ml}$, T2= 62,5/ $\mu\text{m/ml}$, T3= 12,5/ $\mu\text{m/ml}$ com glifosato controle=0 sem a substancia, onde a máxima concentração (T1) foi àquela liberada pela legislação brasileira de 500/ μm por litro e o controle (T4), sem adição de glifosato. As concentrações de substância glifosato e o tempo de

tratamento escolhidos foram baseados na legislação e em estudos anteriores utilizando microalgas (XAVIER et al; 2013; MARTÍNEZ, 2011; SANTOS, 2019 ; BRASIL, 2019).

Os tratamentos contendo microalgas foram homogeneizados e divididos em quatro Erlenmeyers de 250 ml, para que minimamente cada frasco tivesse o mesmo número de organismos das duas espécies. Logo após, os mesmos foram mantidos na estrutura de cultivo por 10 dias, para o pleno desenvolvimento das microalgas nas respectivas amostras.

Após os 10 dias de incubação foi realizada a primeira contagem e observação das amostras. Para iniciar o experimento propriamente dito foram estabelecidos alguns critérios de observação minúscula. Considerando que as algas são organismos muito distintos com relação à morfologia (formas), tipo de reprodução (ciclo de vida), fisiologia e ecologia e assim como as plantas, são organismos fotossintetizantes capazes de produzir o próprio alimento (glicose) a partir de substâncias químicas simples, como dióxido de carbono e água em presença de luminosidade (BICUDO 2006). Neste contexto, foram elencados atributos em relação a estes organismos tais como: morfologia (forma) da alga, comportamento e distribuição, indivíduos mortos na comunidade (para este parâmetro foi considerado que se alga tivesse menos que 50% de seu cloroplasto estavam mortas), sanidade da amostra e verificar se houve outras anomalias na microalga como deformações redução da pigmentação em seu cloroplasto entre outras.

3.1.11. Substância utilizada nos tratamentos

Para este experimento foi utilizado o glifosato (Tabela 03), adquirido com o agricultor, município de Nova Laranjeiras. O produto é utilizado para controle de ervas daninhas no preparo do solo, em pré-plantio de diversas culturas e jardinagem de sua unidade de produção. A rotulagem é explícita na indicação de classificação de toxicidade do produto para o meio ambiente (Figura 07).

O glifosato é um ácido, mas é aplicado nas lavouras na forma de sal (sal de isopropilamina, amônio, potássio). As formulações de glifosato são geralmente comercializadas como concentrados solúveis em água e granulado (LIMA, 2018).

O glifosato utilizado no experimento foi diluído segundo a concentração permitida pela legislação brasileira, sendo assim, os cálculos foram para um volume de 250 ml.

Tabela 03: Substância que foi utilizada para realizar o experimento.

Pergunta	Resposta
Nome comum do(s) ingrediente(s) ativo(s):	Glifosato, sal de isopropilamina.
Nome químico:	Sal de isopropilamina de N (fosfometil) glicina
Classe química:	Herbicida sistêmico, de ação total, para aplicação em pós emergência, derivado da glicina.
Concentração	500µg/l.
Estado físico	Líquido.
Solubilidade:	Solúvel em água
Grupo químico:	Sal
Classificação toxicológica:	IV Pouco Tóxico.
Status para uso no Estado:	Liberado.

Fonte: NUNES, 2019.

Figura 7- Rotulagem do glifosato, substância utilizada no experimento de microalgas como bioindicadores realizada no Laboratório de Limnologia da Universidade Federal da Fronteira Sul, novembro, 2019.



Fonte: NUNES 2019.

3.1.12. Contagem das Microalgas

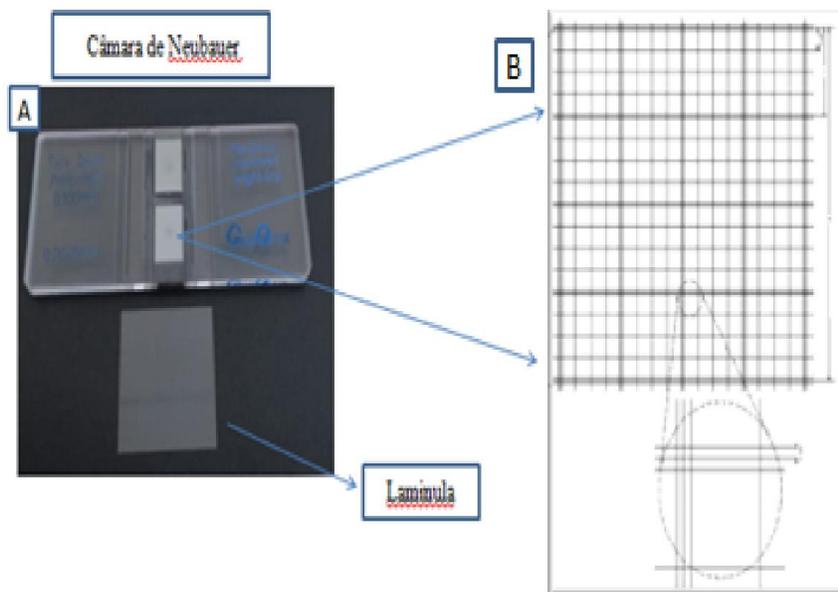
Para verificação do crescimento das microalgas até a obtenção de uma concentração de 10×10^2 células, foram feitas contagens diárias em 0,1 ml de amostra, em câmara de

Neubauer. A câmara de contagem é um instrumento de precisão confeccionado em vidro óptico especial. Esse instrumento é utilizado para a contagem de células sob microscópio.

A câmara que funciona como um sistema de contagem é formada por uma área, de 16 mm², que contém 16 áreas menores, de 1 mm². Cada uma dessas áreas menores é subdividida em 16 mini-áreas (256 mini-áreas) com 0,25 mm de lado e área de 0,0625 mm². A contagem das células é realizada nos quadrantes localizados na área central da câmara (Figura 08 letra A e B). Todas as áreas têm uma borda tripla de cada lado.

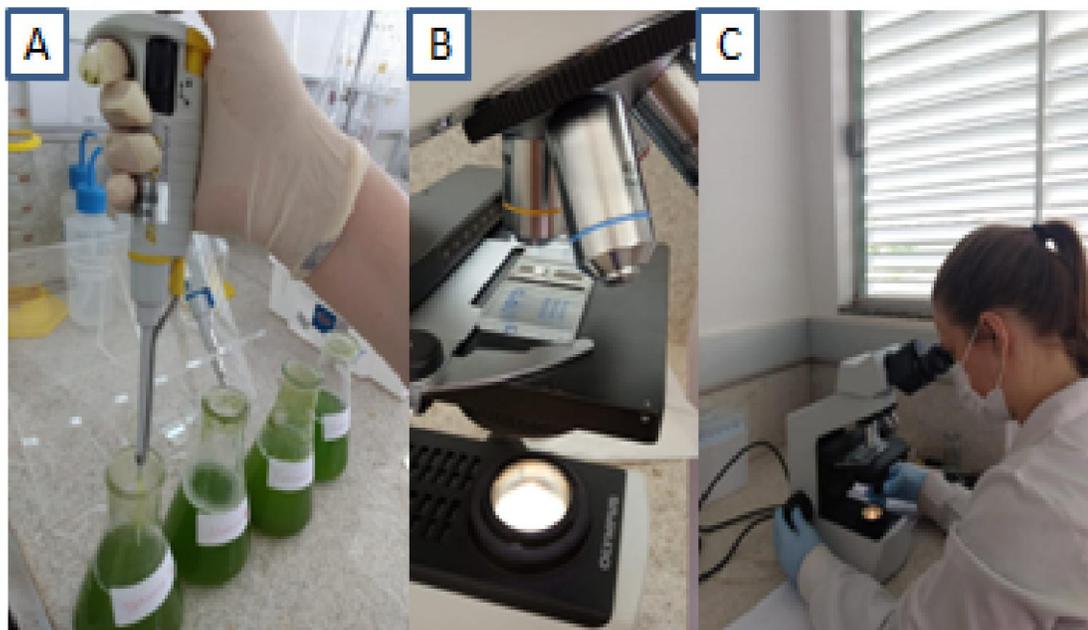
O procedimento de diluição para a contagem foi realizado por pipetagem: 1 mL da amostra original em um tubo de ensaio contendo 9 mL do meio de cultivo estéril (diluição 1/10). Dessa primeira diluição, pipetou-se 1 mL em outro tubo de ensaio contendo 9 mL de meio de cultivo (diluição 1/100) e assim por diante até poder realizar a contagem. Com o processo de diluição, obteve a concentração de 10×10^2 células. O procedimento foi realizado para os adicionando o glifosato nos tratamentos (T1, T2 e T3) com 4 frascos de repetições cada. A contagem foi realizada no período de 0, 2, 4, 16, 24 e 96 horas de exposição na substância, obtendo as quantidades de células vivas e mortas (Figura 09).

Figura 8- Demonstração da câmara de Neubauer e seus quadrantes de contagem.



Fonte: NUNES 2019.

Figura 9 - Procedimento de adição de glifosato [A], verificação dos quadrantes para contagem [B] e contagem na câmara [C], procedimentos realizados no Laboratório de Limnologia da Universidade Federal da Fronteira Sul, novembro, 2019.



Fonte: NUNES, 2019.

3.1.13. Fator de correção

Para calcular o algarismo de células/ml no experimento, multiplicou-se para reparar o valor adquirido por 10.000, uma vez que:

$$1 \text{ ml} = 1 \text{ cc} = 1 \text{ cc} = 10 \times 10 \times 10 \text{ mm} = 1.000 \text{ mm}^3$$

Na câmara de Neubauer obteve-se o algarismo de contagem celular por $0,1 \text{ mm}^3$, por isso deve-se multiplicar por 10, então a fórmula (Células/ml = x coeficiente de diluição x 10.000). Dessa maneira, obtém-se o número total de células, resultando na quantidade de células para cada 1ml (CUNHA, 2014).

3.1.14. Análise estatística

Para organização, tabulação e elaboração dos gráficos foi utilizado o programa LibreOffice Cal. Para as análises dos dados foi utilizado o programa BioStat. A normalidade dos dados foi obtida pelo teste de Anova, homocedasticidade foi verificada através do Teste de Bartlett e a comparação das médias foi feita através Kruskal walis 5% de probabilidade.

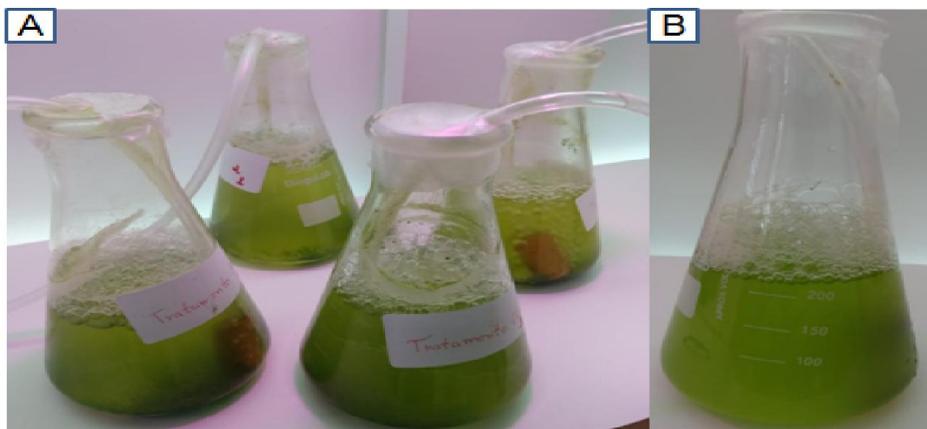
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Trabalhos que visam contribuir na identificação de organismos que sirvam como indicadores de qualidade de água são essenciais. Na coleta realizada no rio Leão em outubro de 2019, foram identificadas várias espécies de microalgas, dentre elas foram escolhidos quatro táxons: *Pediastrum simplex*, *Closterium* sp., *Desmodesmus quadricauda* e *Monorraphydium* sp., que pertencem a classe Chlorophyceae, precursora dos vegetais terrestres, em função do grande número de indivíduos, fator que permitiu a separação de 100 indivíduos para aclimatação e cultivo e realização do experimento. Somente os dois últimos táxons se desenvolveram em quantidade suficiente para iniciar o experimento de exposição ao glifosato.

No dia 22 de novembro foram feitas as contagens, pois os Erlenmeyer onde estavam os táxons em meio de cultura haviam mudado de a cor clara para cor verde escuro. Os táxons apresentaram em média *Desmodesmus quadricauda* uma densidade de $95,70 \text{ ind.} \times 10^5 \text{ ind.} \mu\text{m/l}$ e *Monorraphydium* sp. $51,18 \cdot 10^5 \text{ ind.} \mu\text{m/l}$, o que foi considerado como número viável e suficiente de células para realização do experimento.

No dia seguinte as amostras foram homogeneizadas e adicionadas às alíquotas de glifosato. Nas observações pós adição de glifosato, verificou-se que os Erlenmeyer com glifosato os tratamentos apresentavam uma camada com característica lipofílica (espuma) (Figura 10). Este fato pode ser explicado, que os herbicidas em geral para penetrar no tecido celular das plantas, atravessam diferentes camadas: a cutícula, a parede celular e a membrana plasmática, conforme observados por Hartzler (2018) em seu experimento.

Figura 10 - A Erlenmeyers contendo solução de algas e glifosato, a substância apresentou uma característica de lipídio letra B, experimento ocorrido no Laboratório de Limnologia da Universidade Federal da Fronteira Sul, novembro, 2019.



Fonte: NUNES, 2019.

Nas plantas com filídios, folhas e nos colmos a cutícula é cerosa, de forma que compostos que apresenta afinidade por água (hidrofílicos) terão dificuldade em passar por essa camada. No herbicida glifosato, os surfactantes adicionados apresentam comportamento lipofílico, fazendo com que consigam rapidamente penetrar na primeira barreira (DUNCAN, 2018; HARTZLER, 2018). As algas, não apresentam cutícula, talvez este fato tenha retardado a ação do produto, o que resultou na formação de aglomerado (figura 10 B) amorfo que depois de 96 horas apresentava coloração transparente.

Independentemente do percurso que um herbicida toma, em um dado momento ele precisa alternar o comportamento lipofílico para hidrofílico. Isto é fundamental, haja visto que um herbicida solúvel em água associar-se-ia com porções hidrofílicas da folha e não entraria nas regiões lipofílicas, enquanto os herbicidas solúveis em óleo preferencialmente associar-se-iam com regiões lipofílicas (STAGNARI, 2007; HARTZLER, 2018).

A redução da lipofilicidade da molécula impede que esta faça o caminho de volta, ou seja, saia da célula. Dessa forma, os herbicidas com comportamento de ácido fraco tendem a ser aprisionadas e a acumular-se nas células, reação denominada “armadilha iônicas”. Alguns autores relataram que surfactantes não iônicos interagem com a membrana da bicamada lipídica com as proteínas da membrana, levando a um transporte de oxigênio reduzido através esta membrana (MOTTIER et al; 2017).

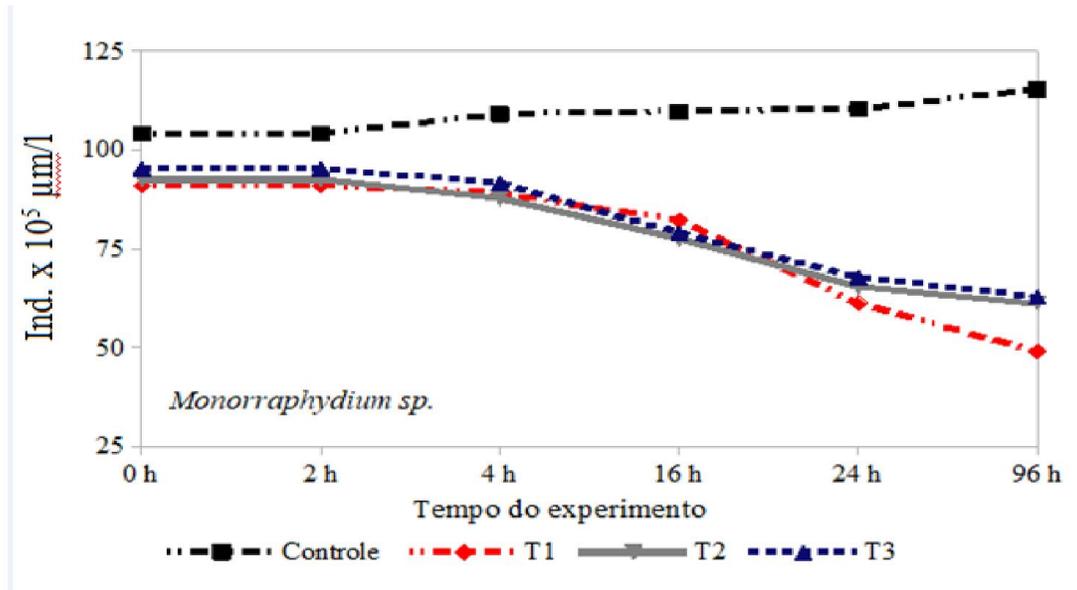
Outro fator importante a se destacar, é que a passagem de uma molécula herbicida com comportamento de ácido fraco pela membrana celular é afetada pelo pH da solução, em razão do efeito do pH sobre a ionização da molécula, que afeta a solubilidade da mesma. Na prática, ocorre que na parte externa da célula, a molécula do herbicida com comportamento de ácido fraco, por ter o pH em torno de 5,5 tende a acumular prótons (protonar-se), tornando-se hidrofóbica (alta lipofilicidade), o que lhe confere a capacidade de movimentar-se através da membrana celular. Após a entrada da molécula na célula, esta perde prótons (em virtude de o pH estar próximo de 7,5, assim a molécula desprotona-se), tornando-se mais hidrofílica ou solúvel em água, reduzindo grandemente a lipofilicidade, ou seja, reduzindo sua capacidade de movimentar-se através da membrana celular.

O pH influencia diretamente o crescimento das microalgas já que o consumo das formas inorgânicas do carbono faz com que o pH se eleve (LOPES, 2007). Destaque feito por Rossi (2013) aponta que as maiores concentrações de microalgas foram obtidas com o pH entre 9,2 e 11,2 e as menores concentrações observadas foram em pH 6,2. Neste estudo o pH

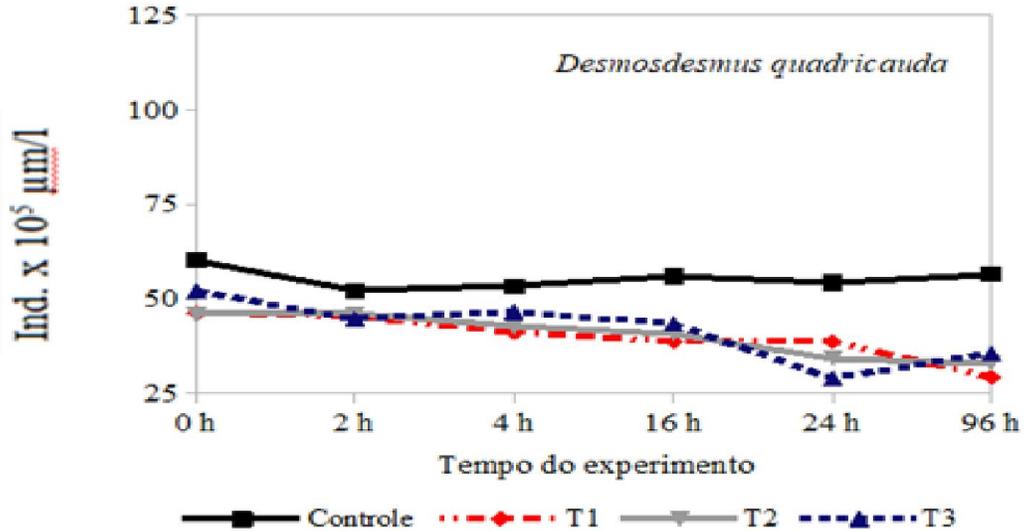
foi ajustado inicialmente 8 tendo um desenvolvimento dos tratamentos até o período de acionamento do glifosato.

Foram realizadas contagens 02, 04, 16, 24 e 96 horas após adição do glifosato a fim de verificar qual o comportamento dos dois táxons quanto à taxa de crescimento (número de indivíduos) da população, atividade celular, entre outros parâmetros que poderiam contribuir para o seu desenvolvimento. Os dados de densidade demonstraram que o controle para as duas espécies mantiveram o crescimento ao longo do experimento (Figura 11). Já os tratamentos T1, T2 e T3 houve a as densidades para ambas as espécies.

Figura 11-Densidade dos táxons *Monorraphydium sp.* e *Desmosdesmus quadricauda* (Indi. x10⁵µm/l), nos diferentes tratamentos, (T1) vermelho, Tratamento dois (T2) cinza e (T3) azul marinho, e ao longo do controle preto o experimento.



Fonte: NUNES, 2019.

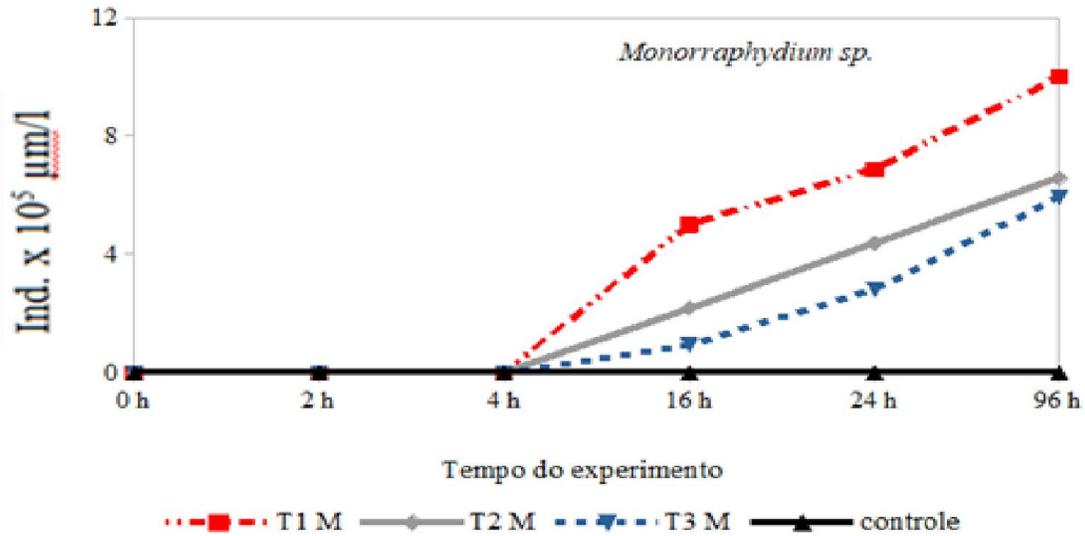


Fonte: NUNES, 2019.

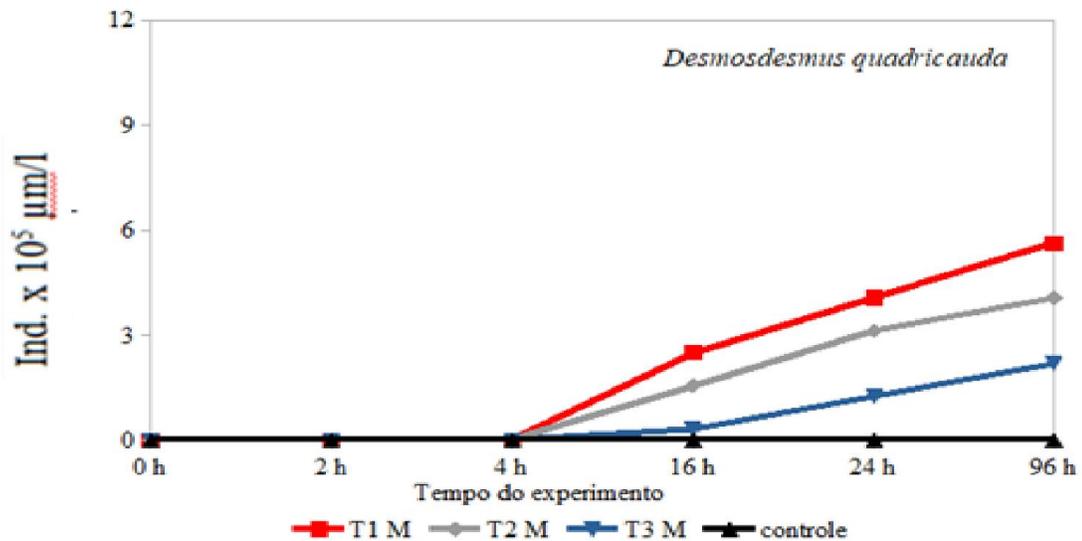
Para melhor interpretar os dados foi realizada uma análise de variância (Anova), onde os tratamentos foram considerados como blocos. Com esta análise foi possível verificar que ocorreu diferença entre os tratamentos e o controle. Quando avaliados os tratamentos T1, T2 e T3 foi verificado que os mesmos apresentaram comportamento semelhante nas duas espécies, o fator tempo não foi testado, contudo constatado que a partir das 16 horas ocorreu aumento na taxa de mortalidade (Figura 13 e 14).

Os dados avaliados não são paramétricos, então foi realizada uma análise de variância associada (Anova), com o teste Kruskal Wallis, onde T3 apresentou menor diferença entre os tratamentos. Este fato é justificável, uma vez que é o tratamento com menor dosagem de glisofato. Contudo, percebe-se nos gráficos que há uma tendência, a resposta dada pela alga *Monorraphyidium* sp. e *Desmosdesmus quadricauda* em maior ou menor intensidade independe da concentração. Para espécie *Monorraphyidium* sp a partir de 24 h há uma interferência maior, aumenta a mortalidade e os danos celulares (Figura 12), ao passo que para a *Desmosdesmus quadricauda* este fator não é tão visível.

Figura 12-Mortandade dos táxons *Monoraphydium* sp. e *Desmosdesmus quadricauda* (Indi. x10⁵µm/l) nos diferentes tratamentos (controle (linha preta), Tratamento um (T1) vermelho, Tratamento dois (T2) cinza e Tratamento 3 azul marinho), ao longo do experimento.



Fonte: NUNES, 2019.



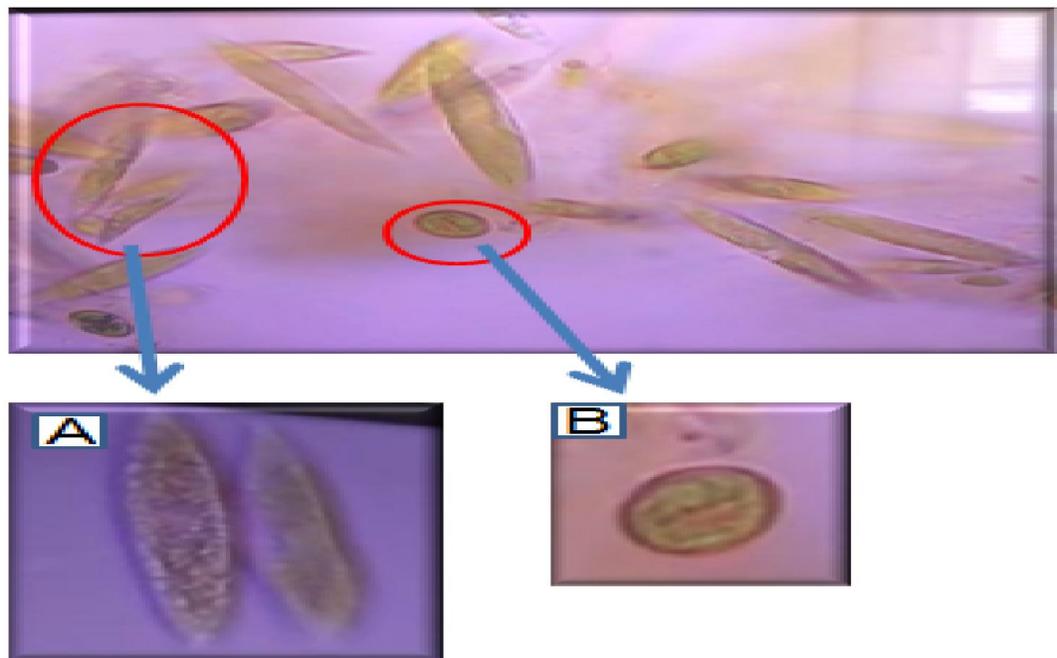
Fonte: NUNES, 2019.

Na análise morfológica e comportamental das microalgas durante o experimento, os dois organismos selecionados, nos quatro frascos tiveram comportamento similar. Após quatro horas da aplicação do glifosato foi observada modificação no comportamento de movimentação, para maior lentidão e alguns indivíduos estagnados, este comportamento foi

visível nas duas espécies nos três tratamentos (T1, T2 e T3), já no controle (T4) houve a manutenção se manteve sua movimentação aparente.

O desenvolvimento reprodutivo é outro fator alterado durante o experimento. Na espécie E1 era visível a divisão celular ou pareamento de indivíduos, o que não ocorreu como controle, que se manteve da mesma forma. Pode-se supor que poderia ser necessidade de reprodução em situação de estresse (Figura 13 letra A). Para a espécie *Desmodesmus quadricauda*, contudo, não foram observados indivíduos se reproduzindo, mas sim alguns cenóbios se desfazendo (Figura 13 letra B) aparecendo na forma unicelular.

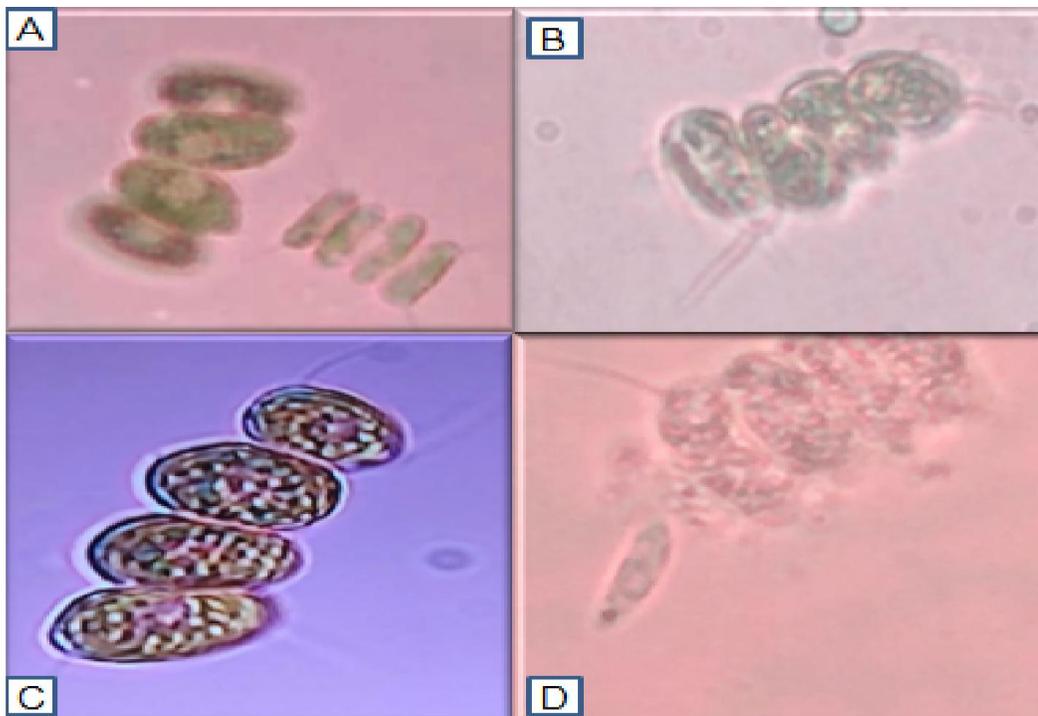
Figura 13- Comportamento reprodutivo, das microalgas letra (A) troca de material genético para reproduzir e espécie *Monoraphidium* sp., letra (B) Células livres de *Desmodesmus quadricauda*, em forma de cistos.



Fonte: NUNES 2019.

Outros indivíduos da espécie *Desmodesmus quadricauda* apresentam o pirenóide, corpo protéico existente nos cloroplastídios associado à reserva de alimento (BICUDO e MENEZES, 2006), em geral arredondados, evidentes e de aspecto brilhante, porem após 24h apresentou aspecto acinzentado, opaco, como se estivesse maior e menos denso (T1, T2 e T3), este fenômeno ocorreu somente nos tratamentos com glifosato.

Figura 14-Morfologia da espécie *Desmodesmus quadricauda*, letra (A) formação mais arredondada juntamente com deslocamentos dos pirenóides, letra (B) malformação dos espinhos, letra (C) degradação dos cloroplastos de tons esverdeados para acinzentados e mortalidade (D) após 96 horas.

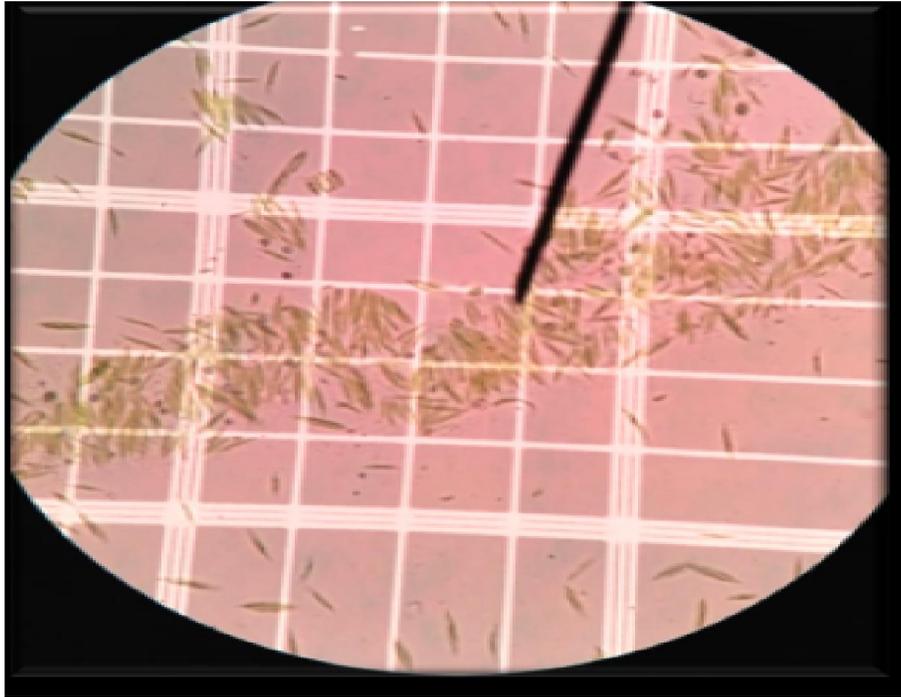


Fonte: NUNES, 2019.

As culturas de microalgas são dependentes de vários elementos como temperatura, pH, salinidade e outras variáveis que podem intensificar ou limitar sua proliferação (VAZ et al., 2011). O glifosato utilizado nos tratamentos possui no ingrediente o ativo sal de isopropilamina, ou seja, somente de ser derivado do sal, pode explicar a mudança de comportamento reprodutivo das espécies. Tais elementos são capazes de serem definidos como inibitórios, pois não permitem o processo das microalgas; substância limitantes que geram diminuição a divisão celular ou de qualquer outra reação fisiológica; estressantes, aqueles que implicam uma diferença metabólica, que demanda ajustes bioquímicos antes que as células possam novamente se dividir (DIAS, 2017).

Caracteristicamente fitoplanctônico, *Monoraphidium* sp, apresenta hábito isolado, o que torna difícil ser encontrado nas amostras, somente apresenta agrupamento no período reprodutivo. Nas análises realizadas, no intervalo de 16 horas, apresentaram-se em forma agregada, por causa do estresse pela presença de glifosato (Figura 15).

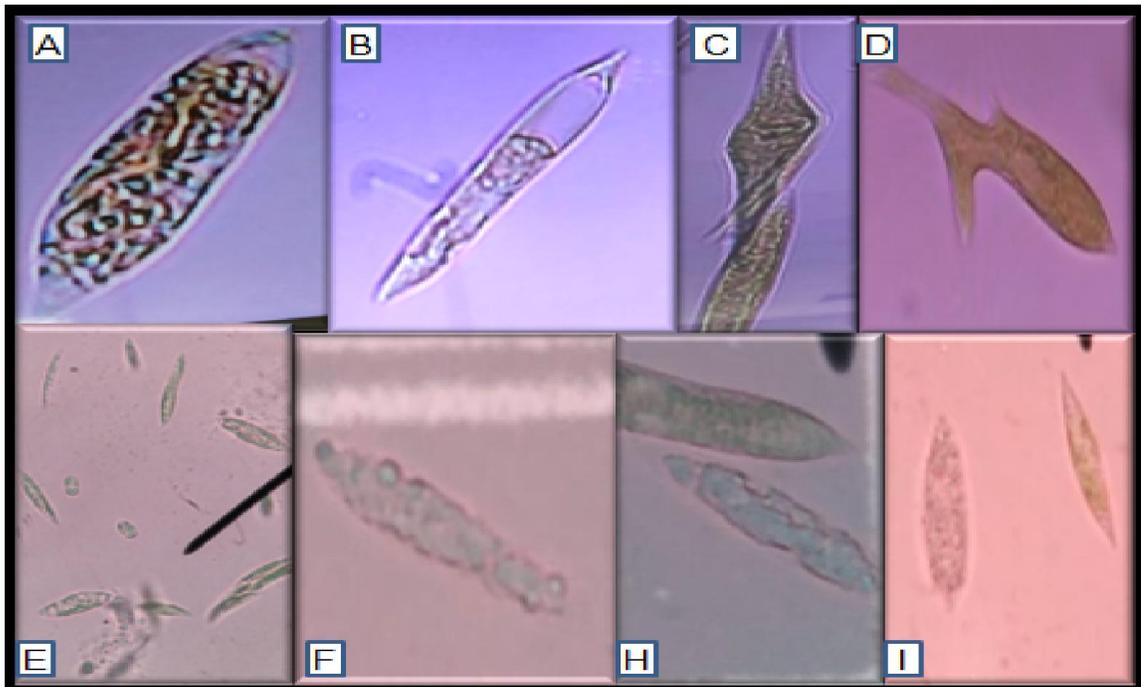
Figura 15- Monorraphyidium sp. na câmara de Neubauer demonstrando um comportamento de agrupamento.



Fonte: NUNES 2019.

Observou-se também a degradação dos cloroplastos de tons esverdeados para acinzentados (Figura 16 A e H), lesões, deformações (Figura 16 D), deformações na membrana plasmática (Figura 16 F) na parede celular e por fim mortalidade, isso em um período de quatro dias.

Figura 16 - Análise morfológica na letra (A) degradação dos cloroplastos de tons esverdeados para acinzentados, letra (B) lesões na parede celular com degradação do conteúdo celular, letra (C) deformações na membrana e alteração no formato da célula, letra (D) aparecimento de melanomas na parede celular e por fim na letra (I) células mortas.



Fonte: NUNES, 2019.

A principal função das microalgas está relacionada à fotossíntese produção do oxigênio atmosférico tão necessário ao metabolismo da respiração, e fixando em seus tecidos para convertê-lo em açúcar (glicose). Como possuem habilidade de acumular em seus tecidos carbonos, fósforo, nitrogênio e incorpora-los a sua biomassa, representam uma excelente fonte de nutrientes aos organismos aquáticos, e são consideradas fontes inesgotáveis de compostos naturais (BATISTA et al., 2013). Nos organismos fotossintetizantes, este processo acontece a partir dos cloroplastos (ou plastídeos). Os pigmentos responsáveis pela ativação dos fotossistemas são classificados em clorofilas, carotenóides e ficobilinas, pigmentos que acabam por conferir a coloração para esses organismos (OLIVEIRA, 2007; SOARES, 2010).

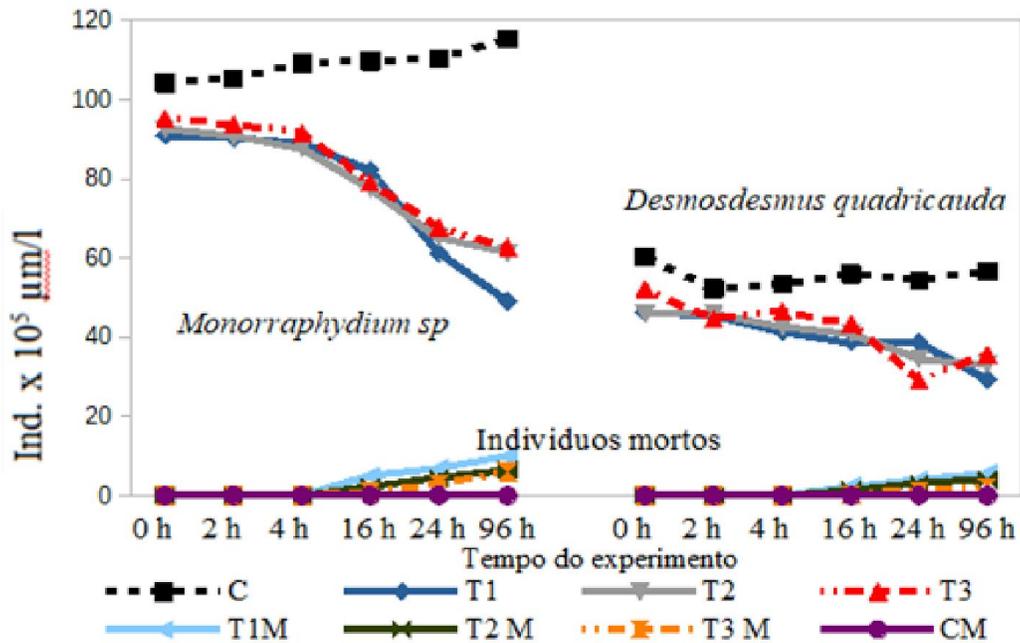
O glifosato tem resultado inibitório do processo de fotossíntese em plantas terrestres e aquáticas. A forma mais utilizada é o sal de isopropilamina, usualmente associado com o surfactante polioxietilenoamina (POEA), que pode ser também um agente da toxicidade aquática das formulações à base de glifosato (TSUI; WANG; CHU, 2005). A redução da fotossíntese leva a interrupção da acumulação de amido, mas a exportação de assimilados e de glyphosate continua, até ser limitada pela baixa disponibilidade de amido, durante a noite. Várias teorias explicam a autolimitação da translocação de glyphosate: (a) inibição da fixação de carbono; (b) interrupção da síntese de amido; (c) limitação do uso de amido armazenado; (d)

limitação do fluxo de importação e descarregamento de sacarose (GEIGER & BESTMAN, 1990).

Em plantas e em alguns microrganismos, o glifosato age por bloqueio competitivo da enzima enolpiruvilshikimate-3-fosfato sintetase (EPSP) primordial na síntese de aminoácidos importantes à síntese protéica em plantas (ácido sintetase) causando déficit de aminoácidos aromáticos. Contudo, efeitos agudos em animais foram registrados após aplicação de altas doses intraperitoneais, tais efeitos são sugestivos de alteração da atividade mitocondrial, provavelmente, desacoplando a fosforilação oxidativa (MENEZES, 2004).

Logo após a aplicação, os inibidores de EPSPs reduzem a importação de assimilados por folhas jovens em desenvolvimento. Mais tarde, a fotossíntese é reduzida e a acumulação de amido é interrompida, mas a exportação de assimilados e de glicose continua, até ser limitada pela baixa disponibilidade de amido, durante a noite. Várias teorias explicam a autolimitação da translocação de glyphosate: (a) inibição da fixação de CO_2 ; (b) interrupção da síntese de amido; (c) limitação do uso de amido armazenado; (d) dano à integridade dos elementos crivados; (e) limitação do fluxo de importação e descarregamento de sacarose (GEIGER & BESTMAN, 1990; KRUSE et al; 2000).

Figura 17- Densidade e mortalidade dos táxons de *Monoraphidium* sp., *Desmosdesmus quadricauda* (Indi. $\times 10^5 \mu\text{m}/\text{l}$), nos diferentes tratamentos (controle (linha preta), Tratamento um (T1) vermelho, Tratamento dois (T2) cinza e Tratamento T3 azul marinho), ao longo do experimento.



Fonte: NUNES, 2019.

A imagem acima demonstra as diferenças táxons de *Monorraphydium sp.*, *Desmosdesmus quadricauda* (Indi. x10⁵μm/l), em seu desenvolvimentos no cultivo e suas mortalidades, após a substâncias nas amostras.

Os resultados encontrados neste trabalho corroboram os verificados por Tsui e Chu (2003), onde algas fotossintéticas, por possuírem rota metabólica similar as plantas, são mais sensíveis ao efeito do herbicida com base em sal de isopropilamina do que organismos não fotossintéticos.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Existem diversos estudos sobre o glifosato e seus efeitos nas plantas, solo e na água. Podemos perceber que mesmo com uma literatura vasta sobre este tópico há necessidade de mais dados com foco nos ambientes aquáticos, principalmente neste momento em que por todo o território brasileiro, há estudos de contaminação e ainda o aumento na liberação do número de agrotóxicos e também do seu uso, principalmente do glifosato.

Os trabalhos encontrados utilizando algas, em sua, maioria, foram realizados com *Desmodesmus* sp. Neste trabalho a proposta foi usar mais de uma espécie e verificar como seria os diferentes comportamentos, contudo nem todas as espécies conseguiram sobreviver ao período de aclimatação.

O gênero *Monorraphydium* sp. Apresentou, em comparação *Desmodesmus quadricauda*, resposta mais facilmente observável, contudo é necessário repetir o experimento. Sugerem-se ainda experimentos bioquímicos que possam gerar dados mais específicos sobre o glifosato nas vias metabólicas desses microorganismos.

Realizar teste com outras substâncias tóxicas ou agrotóxicas para verificar como estes organismos respondem morfológicamente e comportamentalmente as estas substâncias, e se a resposta dada ao glifosato foi única ou semelhante.

Nas análises morfológicas foi observado um aumento na membrana plasmática das formas em relação as suas medidas visualmente, sugere-se que além da contagem, sejam feitos acompanhamento das medidas, contagem dos indivíduos com malformação e análise de absorção do resíduo para verificar se as variações são ao acaso ou realmente tem relação direta com o uso do agrotóxico.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABNT – Associação Brasileira de Normas Técnicas. 2004. Ecotoxicologia aquática Toxicidade crônica – Método de ensaio com algas (Chlorophyceae). Rio de Janeiro, Projeto NBR 12648:2004. 28ª reunião.

ALVES, SR. Avaliação dos resíduos de pesticidas organofosforado e carbamatos por metodologia enzimática no Córrego de São Lourenço, Nova Friburgo-RJ. 2000, Escola Nacional de Saúde Pública. Fundação Oswaldo Cruz; p.61

BAIRD, C.; CANN, M. (2011) Química ambiental. Tradução de Marco Tadeu Grassi et al. 4ª ed. Porto Alegre: Bookman. 844 p.

BASSFELD, Jackson Cesar. Toxicidade aguda para os organismos-teste *Selenastrum capricornutum* PRINTZ (ALGA-CHLOROFICEAE) e *Daphnia magna*, STRAUS (CRUSTACEA: CLADOCERA) de cinco agrotóxicos frequentemente utilizados na Bacia Hidrográfica do Rio Nhundiaquara-Morretes-PR. 2011.

BATISTA, Ana Paula. Comparison of microalgal biomass profiles as novel functional ingredient for food products. **Algal Research**, v. 2, n. 2, p. 164-173, 2013.

BICUDO, C.E.M. & Menezes, M. (orgs.) 2006. Gênero de Algas Continentais do Brasil (chave para identificação e descrições). Ed. Rima, 2ª. edição, São Carlos, SP. 502p.

BICUDO, CEM., and MENEZES, M. Introdução: As algas do Brasil. In: FORZZA, RC., org., et al. INSTITUTO DE PESQUISAS JARDIM BOTÂNICO DO RIO DE JANEIRO. Catálogo de plantas e fungos do Brasil. Rio de Janeiro: Andrea Jakobsson Estúdio: Instituto de Pesquisa Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2010. p. 49-60. Vol. 1. ISBN 978-85-8874-242-0. Available from SciELO Books.

BUMBAK, F.; COOK, S.; ZACHLEDER, V.; HAUSER, S.; KOVAR, K. Best practices in heterotrophic high-cell-density microalgal processes: achievements, potential and possible limitations. *Applied Microbiology and Biotechnology*, Heidelberg, v. 91, n. 1, p. 31-46, 2011.

CAMPONOGARA, I. (2006).“Vulnerabilidade Natural no Sistema Aquífero Guarani e análise de parâmetros físico-químicos das águas subterrâneas em Quaraí, BR e Artigas, UY.”(2006). 106 f. Dissertação (Mestrado em Geografia) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2006.

CAMPOS, Waldir Wagner. *Análise e mapeamento da estrutura da paisagem da Ilha Comprida, no litoral sul de São Paulo*. 2013. PhD Thesis. Universidade de São Paulo.

CARNEIRO, Fernando Ferreira, et al. *Dossiê ABRASCO: um alerta sobre os impactos dos agrotóxicos na saúde*. EPSJV/Expressão Popular, 2015.

DA SILVA, Liliane Pinto. Comunidade fitoplantônica do reservatório padre Cícero (CASTANHÃO), CEARÁ, 2015.

DIAS, Bruna Pessoa Lobo, et al. Influência de Diferentes Regimes de Cultivo na Produção de Biomassa da Microalga *Acutodesmus obliquus* em um Sistema Laminar de Cultivo de Algas, 2017.

DO DOSSIÊ, Comissão Executiva. DOSSIÊ ABRASCO Um alerta sobre os impactos dos Agrotóxicos na Saúde Parte 1-Agrotóxicos, Segurança Alimentar e Saúde. 2017.

DUNCAN, C. **Factors affecting herbicide performance**. Herbicide Information. Techline Invasive Plant News, 2018. Acessado em: 18 de outubro de 2019.

GORHAM, PRj, et al. Isolation and culture of toxic strains of *Anabaena flos-aquae* (Lyngb.) de Bréb: With Plate 7, 1 figure and 3 tables in the text. *Internationale Vereinigung für theoretische und angewandte Limnologie: Verhandlungen*, 1964, 15.2: 796-804.

HARTZLER, B. 2017. Absorption of soil-applied herbicides. Iowa State University Extension and Outreach, Ames, IA. Available from <https://crops.extension.iastate.edu/absorption-soil-applied-herbicides>.

HESPANHOL, Katia Maria Hipolito. *Monitoramento e diagnóstico da qualidade da água do Ribeirão Morangueiro*. 2009. Master's Thesis. Universidade Estadual de Maringá.

HOLT, Emily A.; MILLER, Scott W. Bioindicators: using organisms to measure environmental impacts. *Nature Education Knowledge*, 2011, 3.10: 8. Acessado em: 14 de outubro de 2019.

JURADO, Amália, Herbicides: the face and the reverse of the coin. An in vitro approach to the toxicity of herbicides in non-target organisms. *Herbicides and environment*, 2011, 1-44.

KAPUSTA, Simone Caterina. Bioindicação ambiental. 2016.

KOMÁREK, J. & Fott, B. 1983. Chlorophyceae (grünalgen) Ordnung: Chlorococcales. In: G. Huber-Pestalozzi (org.), *Das Phytoplankton des Süßwassers: Systematic und Biologie*. Vol. 7, part. 1. E. Schweizerbart'sche Verlagsbuchhandlung (Nägele u. Obermiller), Stuttgart.

KRUSE, N. D.; TREZZI, M. M.; VIDAL, R. Herbicidas Inibidores Da Epsps: Revisão De Literatura. *Revista Brasileira de Herbicidas* v.1, n.2, 2000.

LACORTE S, BARCELO D. Determination of organophosphorus pesticides and their transformation products in river water by automated on-line solid-phase extraction followed by thermospray liquid chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr* 1995; A712:103-112.

LAZZARINI, Luiz Eduardo Santos, et al. USO DE DIODOS EMISSORES DE LUZ (LED) NA FISIOLOGIA DE PLANTAS CULTIVADAS–REVISÃO.

LIMA, Alexandre Batista de. Avaliação in-silico de metabólitos secundários com possível ação na enzima (EPSPS). 2018.

LOPES, Eduardo Jacob. Sequestro de dióxido de carbono em fotobiorreatores. 2007.

MAGALHÃES, Danielly de Paiva, et al. A ecotoxicologia como ferramenta no biomonitoramento de ecossistemas aquáticos. 2008.

MARTÍNEZ, Ana Ruiz. Início de uma cultura de microalgas para a remoção de nutrientes de um efluente urbano previamente tratado anaerobicamente. *Universidade Politécnica de Valência, Valência, Espanha*, 2011.

MENEZES, Sabrina Mecca de. Detecção de soja geneticamente modificada tolerante ao glifosato por métodos baseados na atividade de enzimas. *Revista Brasileira de Sementes*, 2004.

NAIME, Roberto Harb; SPILKI, Fernando Rosado. *Preservação ambiental e o caso especial do manejo de resíduos de laboratório: conceitos gerais e aplicados*. Editora Feevale, 2012.

OLIVEIRA, Ádria Caloto de. *Toxicidade de elementos-traço para consumidores primários na presença de exopolissacarídeos produzidos por organismos fitoplanctônicos (Chlorophyceae e Cyanophyceae)*. 2007. PhD Thesis. Universidade de São Paulo.

PAN, Y.Y.; WANG, S.T.; CHUANG, L.T.; CHANG, Y.W.; NATHAN CHEN, C.N. Isolation of thermo-tolerant and high lipid content green microalgae: Oil accumulation is predominantly controlled by photosystem efficiency during stress treatments in *Desmodesmus*. *Bioresource Technology*, v. 102, n.22, p. 10510-10517, 2011.

PINTO - COELHO, R. M., & Havens, K. (2016). *Gestão de recursos hídricos em tempos de crise*. Artmed Editora pg 14.

RAMOS, Geraldo José Peixoto; BICUDO, C. E. M.; MOURA, C. W. N. Novos registros de algas verdes cocoides (Chlorophyceae, Chlorophyta) para o estado da Bahia e para o Brasil. *Sitientibus, série Ciências Biológicas*, 2015,.

RENAUD, S. M. et al. Effect of temperature on the growth, total lipid content and fatty acid composition of recently isolated tropical microalgae *Isochrysis* sp., *Nitzschia closterium*, *Nitzschia paleacea*, and commercial species *Isochrysis* sp. (Clone T. ISO). *Journal of Applied Phycology*, v. 7, p. 595-602, 2004.

RIBEIRO, D. S.; Pereira, T. D. S. **O agrotóxico nosso de cada dia**. *Vittale – Revista de Ciências da Saúde* 28 (2016) 14-26.

RIGATTI, B.D.B., Nicolodi, A. and Pereira, F.D.S., 2003. Estudos de iluminação artificial complementar. *Salão de Iniciação Científica (15. 2003: Porto Alegre). Livro de resumos. Porto Alegre: UFRGS, 2003.*

ROSA, Artur Rech da. Manejo e descarte de resíduos de embalagens de agrotóxicos em um município da Serra Gaúcha. 2017.

SAMORI, G.; SAMORI, C; GUERRINI, F; PISTOCCH, R. Growth and nitrogen removal capacity of *Desmodesmus communis* and of a natural microalgae consortium in a batch culture system in view of urban wastewater treatment: Part I. *Water Research*, v. 47, n.2, 2013.

SANTOS, Natanael de Alencar. Política envenena? O projeto de lei 6299/2002 pela perspectiva da rede sociotécnica. 2019.

SILVA, Ana Lucia. *Interferentes endócrinos no meio ambiente: um estudo de caso em amostras de água in natura e efluente de estação de tratamento de esgotos da região metropolitana de São Paulo*. 2009. PhD Thesis. Universidad de São Paulo.

SOLOMON, K. R.; THOMPSON, D. G. Ecological risk assessment for aquatic organisms from over-water uses of glyphosate. *Journal of Toxicology and Environmental Health B*, Philadelphia, v.6, n.3, p.211-246, 2003.

SPADOTTO, Claudio A., et al. Monitoramento do risco ambiental de agrotóxicos: princípios e recomendações. *Embrapa Meio Ambiente-Documentos (INFOTECA-E)*, 2004.

STAGNARI, F. A review of the factors influencing the absorption and efficacy of lipophilic and highly water-soluble post-emergence herbicides. **The European Journal of Plant Science and Biotechnology**, v. 1, p. 22-35, 2007.

TAVARES, Claudineia Raquel de Oliveira. *Síntese do glifosato marcado com nitrogênio-15*. 2005. PhD Thesis. Universidade de São Paulo.

THOMPSON, P. A. GUO, M. HARRISON, P. J. Effects of variation in temperature: On the biochemical composition of eight species of marine phytoplankton. *Journal of Phycology*, v. 28, p. 481-488, 2008.

VANACÔR, Romualdo Nunes. Avaliação do coagulante orgânico Veta Organic utilizado em uma estação de tratamento de água para abastecimento público. 2005.

XAVIER, Emanuel D., et al. Cultivo Intensivo de Microalgas na Região Autónoma dos Açores: uma Abordagem Biotecnológica Integrada. *Livro de Atas das Jornadas "Ciência nos Açores-que futuro? Tema Ciências Exactas e da Engenharia"*, 2013, 229-231 2017.