

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS NATURAIS E EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGROBIOLOGIA

CAMILA ELICKER

RESPOSTA DA MICROALGA CLOROFÍCEA *Desmodesmus quadricauda* (TURPIN) BRÉBISSEON A ACRILAMIDA EM DIFERENTES CONDIÇÕES SIMULADAS DE ESTRESSE ABIÓTICO

Santa Maria, RS, Brasil
2016

Camila Elicker

RESPOSTA DA MICROALGA CLOROFÍCEA *Desmodesmus quadricauda* (TURPIN) BRÉBISSON A ACRILAMIDA EM DIFERENTES CONDIÇÕES SIMULADAS DE ESTRESSE ABIÓTICO

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Agrobiologia, Área de Concentração em Agrobiologia, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para a obtenção de grau de **Mestre em Agrobiologia**.

Orientador: Prof^a. Dr^a. Maria Angélica Oliveira

Coorientador: Prof. Dr. Elvis Carissimi

Santa Maria, RS, Brasil

2016

Camila Elicker

**RESPOSTA DA MICROALGA CLOROFÍCEA *Desmodesmus quadricauda*
(TURPIN) BRÉBISSEON A ACRILAMIDA EM DIFERENTES CONDIÇÕES
SIMULADAS DE ESTRESSE ABIÓTICO**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Agrobiologia, Área de Concentração em Agrobiologia, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM,RS), como requisito parcial para a obtenção de grau de **Mestre em Agrobiologia**.

Aprovado em 31 de agosto de 2016:



Maria Angélica de Oliveira, Dr^a. (UFSM)
(Presidente/Orientadora)



Elvis Carissimi, Dr. (UFSM)
(Coorientador)



Antônio Carlos Ferreira da Silva, Dr. (UFSM)



Noeli Julia Schussler Vasconcellos, Dr^a. (UNIFRA)

Santa Maria, RS

2016

AGRADECIMENTOS

É com sinceridade que expresso minha imensa gratidão a todos que, de uma forma ou de outra, colaboraram e apoiaram-me na realização deste trabalho.

À Deus por estar sempre iluminando minha caminhada, me protegendo e me guiando, mesmo diante dos obstáculos mais difíceis.

Aos meus pais, minha irmã e meu companheiro Gabriel, que são as pessoas mais importantes na minha vida, por estarem ao meu lado em todos os momentos, investindo e acreditando na minha capacidade sem hesitar e por confiarem que sempre posso alcançar meus objetivos, sem seu apoio, não chegaria até aqui.

À minha orientadora professora Dr. Maria Angélica Oliveira, pela dedicação, paciência e empenho na orientação deste trabalho. Agradeço por ter me recebido de braços abertos, por todos os seus conhecimentos passados, por todas as vezes que a inquietei, por sempre acreditar em mim.

Ao meu coorientador professor Dr. Elvis Carissimi, por acreditar que este trabalho era possível.

À Prof. Dra. Juçara T. Paranhos pela imensa ajuda ao ceder seu laboratório e seus equipamentos para realização dos experimentos, sem seu auxílio a pesquisa não teria sido concluída.

Aos colegas de trabalho do LabFic e LEMA, companheiros de jornada que fizeram esta tarefa muito mais prazerosa e com muitas risadas me animaram em dias tempestuosos.

À Gislayne Alves e Milena Tisoco que percorreram junto comigo os dois anos do mestrado, compartilhando todas as alegrias e tristezas que o cultivo de microalgas apresenta.

Aos colegas de curso, Aline, Athos, Gabriel, Marcelo e Merielem, amigos que o PPG Agrobiologia me presenteou, a todos pela amizade e apoio nas alegrias e nas agonias, pelas longas conversas e pelo café quente sempre disponível.

À Universidade Federal de Rio Grande pelas cepas cedidas ao experimento.

A CAPES pela bolsa cedida a mim durante o período da realização do mestrado.

RESUMO

RESPOSTA DA MICROALGA CLOROFÍCEA *Desmodesmus quadricauda* (TURPIN) BRÉBISSEON A ACRILAMIDA EM DIFERENTES CONDIÇÕES SIMULADAS DE ESTRESSE ABIÓTICO

AUTORA: Camila Elicker
ORIENTADOR: Maria Angélica Oliveira

Essencial à vida, a água está presente em quase todas as atividades humanas, principalmente no consumo de água potável e em atividades agrícolas. Tendo em vista que a população mundial vem aumentando enormemente, a produção de alimentos tem de ser aumentada sendo que esta necessidade tem-se estimulado cooperativas e produtores a buscarem técnicas alternativas para a melhoria da produtividade e redução de custos. Neste contexto, a adição de hidrogéis no solo, otimiza a disponibilidade de água, devido à sua grande capacidade de armazenamento, acelerando o desenvolvimento do sistema radicular e da parte aérea das plantas. A maioria dos hidrogéis é feito à base de poli(acrilamida), polímero da acrilamida (AM), monômero que se apresenta na forma inodora e de coloração branca, solúvel em água e altamente tóxica. Os efeitos prejudiciais da AM, que apresenta risco carcinogênico e desregulador endócrino nos seres vivos, são conhecidos há mais de 30 anos. No solo, a acrilamida apresenta um elevado período para ser degradada e devido a lixiviação, o monômero pode ser encontrada em ambientes aquáticos. Devido a sua toxicidade, a acrilamida em concentração de 5,88 mg/L⁻¹ reinterpreta a EC₅₀ de microalgas clorofíceas *Desmodesmus quadricauda* (Turpin) Brébisson. Além da influência da poluição, vários fatores abióticos como temperatura e pH, interferem nas comunidades aquáticas. O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos tóxicos da acrilamida em concentração pré-estabelecida juntamente com alterações de temperatura (24 °C e 17 °C) e variação de pH sobre parâmetros fisiológicos da microalga *D. quadricauda*. As clorofíceas foram cultivadas em meio Water Culture (WC), com suas células em fase exponencial exposta por um período de 72 horas a concentração de 5,88 mg.L⁻¹ de acrilamida, valores de pH que variaram de 5, 6, 7 e 8. Amostras periódicas foram realizadas contagens ao microscópio, em que se levou em consideração a plasticidade fenotípica e medidas celulares, o biovolume e densidade celular. Ao

comparar este estudo com a EC_{50} da acrilamida obtido em estudo prévio, os resultados indicaram que a 17 °C a toxicidade da acrilamida diminuiu e em temperaturas a 24 °C aumentou, não tendo o pH interferido neste parâmetro. Analisando as medidas celulares de largura e comprimento, resultados foram significativos com o controle de pH8 e com temperatura a 15°C, assim como nos valores do biovolume, onde a variação apenas do pH apresenta variação entre os controles e tratamentos testados. A plasticidade fenotípica do gênero aponta que ao analisar os grupos separadamente nos períodos de 24, 48 e 72 horas, que apesar de não haver diferenças significativas, maior alteração fenotípica foi encontrada nos cenóbios de uma célula, que prevaleceu maior no grupo tratado com acrilamida e alteração de pH em praticamente todos os períodos. Portanto, a concentração de acrilamida presente nos ensaios juntamente com alterações de temperatura e pH testadas, indica que a toxicidade da substância altera os parâmetros testados na microalga, se tornando um risco às comunidades aquáticas se expostas a acrilamida.

Palavras - chave: Ecotoxicologia, Clorofíceas, Biovolume.

ABSTRACT

MICROALGAE RESPONSE *Desmodesmus quadricauda* (TURPIN) BRÉBISSEON TO ACRYLAMIDE IN DIFFERENT ENVIRONMENTAL CONDITIONS OF ABIOTIC STRESS

AUTHOR: Camila Elicker
SUPERVISOR: Maria Angelica Oliveira

Essential to life, water is present in almost all human activities, mainly in the consumption of drinking water and agricultural activities. Considering that the world population has increased enormously, food production must be increased and this need has encouraged cooperatives and producers to seek alternative techniques to improve productivity and reduce costs. In this context, the addition of hydrogels on the ground, optimizes the availability of water due to its large storage capacity, accelerating the development of the root system and aerial part of the plant. Most hydrogels is done based on polyacrylamide polymer of acrylamide (AM) monomer which is in the form odorless and white colored water soluble and highly toxic. The damaging effects of AM, which has carcinogenic risk and endocrine disrupter in living beings are known for over 30 years. In soil, acrylamide has a high time to be degraded and due to leaching, the monomer can be found in aquatic environments. Due to its toxicity, acrylamide in a concentration of 5.88 mg / L⁻¹ restates the EC50 microalgae Chlorophyceae *Desmodesmus quadricauda* (Turpin) Brébisson. In addition to the influence of pollution, various abiotic factors such as temperature and pH, interfere with aquatic communities. The aim of this study was to evaluate the toxic effects of acrylamide in predetermined concentration with changes in temperature (24 ° C and 17 ° C) and pH variation on physiological parameters of microalgae *D. quadricauda*. The green algae were grown in Water Culture (WC) with its exposed cells in exponential growth phase for a period of 72 hours at concentrations of 5.88 mg l⁻¹ of acrylamide, pH values ranging from 5, 6, 7 and 8. Periodic samples counts were performed under the microscope, in which it took into account the phenotypic plasticity and cellular measures, the biovolume and cell density. When comparing this study with acrylamide EC50 obtained in a previous study, the results indicated at low temperatures (17 ° C) the toxicity of acrylamide and decreased at high temperatures (24 ° C) increased, not having the pH interfered in this parameter. Analyzing cellular measures of width and length, results were

significant with the control of pH 8 and temperature 15 ° C, as in biovolume values where only the variation of pH shows variation among the tested controls and treatments. Phenotypic gender plasticity shows that when analyzing the groups separately for periods of 24, 48 and 72 hours, although no significant differences, most phenotypic change was found in the monasteries of a cell that prevailed most in the group treated with acrylamide and pH change in almost all periods. Therefore, the concentration of acrylamide in this test along with changes in temperature and pH tested, indicating that the toxicity of the substance changes the parameters tested in microalgae, becoming a risk to aquatic communities exposed to acrylamide.

Key - words: Ecotoxicology, Chlorophytes, Biovolume.

LISTA DE QUADROS

Quadro 1- Definição de alguns termos utilizados em testes de toxicidade	22
Quadro 2 - Meio de Cultura WC	28
Quadro 3 - Nomenclatura e parâmetros de cada tratamento e controle durante os ensaios.....	29
Quadro 4 - Planilha de contagem para inóculo inicial e densidade celular	31

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** – Média \pm desvio padrão do comprimento e da largura celular (μm) durante as 72 horas de exposição à $5,88 \text{ mg.L}^{-1}$ de acrilamida e alteração de pH – Temperatura 17°C 38
- Tabela 2** – Média \pm desvio padrão do comprimento e da largura celular (μm) durante as 72 horas de exposição à $5,88 \text{ mg.L}^{-1}$ de acrilamida e alteração de pH – Temperatura 24°C 38
- Tabela 3** – Média \pm desvio padrão do biovolume celular ($\mu\text{m}^3.\text{ml}^{-1}$) durante as 72 horas de exposição a acrilamida – Teste com temperatura 17°C 41
- Tabela 4** – Média \pm desvio padrão do biovolume celular ($\mu\text{m}^3.\text{ml}^{-1}$) durante as 72 horas de exposição a acrilamida – Teste com temperatura 24°C 42

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Cultura de *Desmodesmus quadricauda* representando os diferentes cenóbios encontrados.....24
- Figura 2** - Medidas microscópicas necessárias para o cálculo do biovolume do gênero *Desmodesmus*.....24
- Figura 3** - Cepas iniciais do banco de algas e amostras após repicagem e período de incubação.....27
- Figura 4** - Preparação e incubação do inóculo inicial..... 28
- Figura 5** - Densidade celular durante as três etapas experimentais com o parâmetro de pH 5, pH 6 e pH 8 em temperatura de 17° e 24 °C.....35
- Figura 6** - Dimensões celulares durante as três etapas experimentais em temperatura 17°C39
- Figura 7** - Dimensões celulares durante as três etapas experimentais em temperatura 24°C.....40
- Figura 8** - Porcentagem celular das expressões fenotípicas encontradas em todos os grupos nos períodos de 24, 48 e 72h - temperatura 17°C.....44
- Figura 9** - Porcentagem celular das expressões fenotípicas encontradas em todos os grupos nos períodos de 24, 48 e 72h - temperatura 24°C.....45

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	13
2. OBJETIVOS.....	16
2.1 Objetivos Gerais.....	16
2.2 Objetivos específicos.....	16
3. REVISÃO DE LITERATURA.....	17
3.1 Acrilamida	17
3.2 Usos da acrilamida no solo e em agroecossistemas	19
3.3. Ecotoxicologia e Testes de Toxicidade.....	20
3.4. Algas como organismos indicadores	23
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	26
4.1 Local	26
4.2 Material	26
4.3 Metodologia	30
4.3 Testes estatísticos.....	33
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	34
5.1 Crescimento populacional.....	34
5.2 Dimensões Celulares.....	36
5.3 Biovolume.....	40
5.4 Plasticidade Fenotípica.....	42
6. CONCLUSÃO.....	47
7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	48

1. INTRODUÇÃO

Essencial à vida, a água está presente em quase todas as atividades humanas, sendo ainda, componente da paisagem e dos agroecossistemas. A água é a substância fundamental à vida e sua importância nos sistemas biológicos, principalmente na relação de plantas com o meio ambiente.

Com as previsões climáticas de aumento de temperatura e de CO₂, haverá secas mais frequentes, causando um grande efeito na relação da planta com o meio, a economia de água potável é imprescindível. Assim, a relação da planta com a água é de grande importância para a economia de água e aumento da produtividade na agricultura. (PIMENTEL, 2004)

A população mundial vem aumentando enormemente e a produção de alimentos tem de ser aumentada, isto porque a produção agrícola não é suficiente para manter a crescente população e por muitas áreas marginais para a agricultura, com deficiência de água e de nutrientes.

A necessidade de aumentar a produção de alimentos aliada à globalização do comércio e à competitividade dos produtos agrícolas tem-se estimulado cooperativas e produtores a buscarem técnicas alternativas para a melhoria da produtividade e redução de custos (MENDONÇA, et al. 2013). Porém, a produção alimentar intensificada tem, tradicionalmente, significado o aumento da dependência de fertilizantes e um consumo excessivo de água, o que pode degradar solos e recursos hídricos (FAO, 2010). Alternativas são necessárias para reduzir o consumo de água potável do planeta que a agricultura consome e aperfeiçoar o uso da água durante o cultivo. Da era dos Gregos até os dias atuais, a ciência evoluiu muito e a pesquisa na área agrônômica procurou adequar o vegetal e o solo de modo que melhores colheitas pudessem ser obtidas (SILVA e ARAÚJO, 2002).

A necessidade de otimizar a produção tem estimulado pesquisadores a buscarem técnicas alternativas para melhoria da produtividade e redução de custos. Neste contexto, a adição de hidrogéis no solo, devido à sua grande capacidade de armazenamento e uma subsequente capacidade de liberação dessa água para a planta de forma gradativa, otimiza a disponibilidade de água, reduz as perdas por percolação e lixiviação de nutrientes e melhora a aeração e drenagem do solo, acelerando o desenvolvimento do sistema radicular e da parte aérea das plantas. (GUIMARÃES, 2007)

A maioria dos hidrogéis comerciais são feitos à base de poli(acrilamida), polímero da acrilamida que se apresenta na forma inodora e de coloração branca, solúvel em água e altamente tóxica. A acrilamida (AM) é utilizada na fabricação de polímeros desde a década de 1950 e com uma infinidade de aplicações químicas e industriais, destacando-se na utilização como floculante no processo de tratamento da água, indústria têxtil, condicionantes do solo e em laboratórios. O potencial carcinogênico da acrilamida e seu comportamento de desregulador endócrino nos seres vivos é um fator desfavorável ao seu uso.

A neurotoxicidade da acrilamida em seres humanos, efeito conhecido há mais de trinta anos, é bem documentada através de estudos de exposição ocupacional e acidental. Em animais e seres humanos é absorvida através da ingestão, inalação ou absorção da pele. Adicionalmente, estudos experimentais com animais mostram efeitos genotóxicos, carcinogênicos e na reprodução (FAO/WHO, 2002; IARC, 1999).

A desregulação endócrina induzida por contaminantes ambientais é uma das principais problemáticas ocasionadas pelo estilo de vida moderno do homem, que introduz constantemente no meio ambiente uma série de substâncias interferentes nos sistemas hormonais dos mais diversos organismos, onde não se exclui a espécie humana, que sofre cada vez mais com disfunções reprodutivas e cânceres que podem estar relacionados à exposição aos micropoluentes (BILA, 2007). Estes elementos ou compostos, dependendo da sua concentração e do tempo de exposição podem causar diversos danos aos organismos aquáticos e às suas interações com o meio ambiente.

Exposta constantemente a um grande número substâncias tóxica provenientes de diversas fontes de emissão, a biota aquática recebe a descarga de lixos tóxicos derivadas de efluentes industriais, os processos de drenagem agrícola, os derrames acidentais de lixos químicos e os esgotos domésticos lançados em rios e mares que contribuem para a contaminação dos ecossistemas (ARIAS et. al, 2007).

A ecotoxicologia, ciência que estuda a toxicidade de substâncias químicas em organismos vivos, é indicada para identificar e diagnosticar substâncias possivelmente tóxicas e seus efeitos no meio ambiente sendo a ecotoxicologia aquática com objetivo avaliar o efeito de substancias químicas toxicas sobre organismos representativos do ecossistema aquático.

Os testes de toxicidade são ensaios laboratoriais, realizados sob condições experimentais específicas e controladas, utilizados para estimar a toxicidade de substâncias, efluentes industriais e amostras ambientais. Nesses ensaios, organismos-testes são expostos a diferentes concentrações de amostra e os efeitos tóxicos produzidos sobre eles são observados e quantificados. (COSTA, et al., 2007).

Os organismos utilizados em testes são denominados como bioindicadores e dentro de diversos grupos de indivíduos, as algas são consideradas ecologicamente importantes devido seu papel de manter o equilíbrio ecológico de um ecossistema.

As algas são consideradas a produção primária de um ecossistema aquático e sendo o nível mais inferior da cadeia alimentar, as alterações que ocorrer com esta população influenciará todo ciclo de vida da cadeia alimentar. Os resultados de testes com estes bioindicadores são avaliados através das taxas de crescimento populacional, alteração morfológicas, concentração de clorofila entre outras.

A clorofícea *Desmodesmus quadricauda* apresenta em vida livre como sua forma característica o cenóbio de quatro células. Perante o cultivo laboratorial, seus cenóbios podem alterar sua morfologia para cenóbios de uma, duas ou oito células.

O ambiente aquático é altamente complexo e diverso e os ecossistemas são produtos dinâmicos de interações complexas entre os componentes bióticos e abióticos característicos de cada um deles. As propriedades físicas e químicas dos ecossistemas aquáticos podem afetar significativamente a atividade biológica e o impacto dos agentes químicos (COSTA, et al., 2007). Os fatores abióticos, como temperatura, pH, salinidade, entre outros, também influenciam a interação dos organismos sendo que suas alterações podem desencadear modificações em toda a comunidade aquática.

No Brasil, os estudos que relacionam a toxicidade de substâncias químicas e seus efeitos na biota dos corpos hídricos são escassos, desta forma, o principal objetivo ao conduzir este estudo foi avaliar os efeitos toxicológicos da acrilamida em clorofíceas através de ensaios ecotoxicológicos visando a resposta da *Desmodesmus quadricauda* diante de estressores ambientais.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

O objetivo geral deste estudo foi verificar se estresses abióticos tais como variação de temperatura e alteração de pH em condições de simulação de toxicidade da acrilamida afetam diretamente as células da microalga *Desmodesmus quadricauda* (Turpin) Brébisson.

2.2. Objetivos Específicos

Os objetivos específicos foram:

- Analisar a densidade celular da microalga *Desmodesmus quadricauda* (Turpin) Brébisson mediante inoculação em meio de cultura com adição de acrilamida.
- Analisar o efeito da simulação de estresse ambiental com alteração de fatores abióticos de temperatura a 15° C e 17° C e pH em solução com acrilamida a 5,88 mg.L⁻¹, em relação ao aumento populacional, plasticidade e biovolume.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Acrilamida

A acrilamida ($\text{CH}_2\text{CHCONH}_2$) é um monômero industrial bem conhecido, aparecendo como um cristal branco e inodoro. É solúvel em água, metanol, etanol, éter de dimetilo e acetona, o que lhe confere alta mobilidade em águas subterrâneas, mas insolúvel em benzeno e heptano. A acrilamida (AM) é incompatível com ácidos, bases, agentes oxidantes, ferro e sais de ferro. Decompõe-se não termicamente para formar amônia, enquanto a decomposição térmica produz monóxido de carbono, dióxido de carbono e óxidos de azoto (IARC, 1999).

Como uma substância comercial, a acrilamida tem sido utilizada em todo o mundo para a síntese de poliacrilamida e outros polímeros desde 1950. É utilizada na forma de polímero como floculante para clarificar e purificar a água potável; no tratamento de esgotos e efluentes; no condicionamento do solo para a produção de represas, como agente selante em construções civis e em processos de retenção de água no solo através de hidrogéis. Em laboratórios é usada como suporte sólido para a separação de proteínas por electroforese (EXOM, 2006), além de ser utilizada na indústria de papel, madeira e têxtil, é adicionada também em cosméticos e artigos de higiene (KAPP, 2002; PAULSSON, 2002; SCF, 2002).

Embora não seja tóxico na forma de polímero, o monomero pode causar neuropatia periférica. A neurotoxicidade da AM em seres humanos, efeito conhecido há mais de trinta anos, é bem documentada através de estudos de exposição ocupacional e acidental. De acordo com Rice (2005) e Friedman (2003), diversos estudos comprovam a grande probabilidade cancerígena da acrilamida para seres humano, com base em resultados de bioensaios positivos, realizados em roedores que demonstraram o potencial carcinogênico em vários órgãos, ressaltando-se o sistema nervoso e reprodutivo. Adicionalmente, estudos experimentais com animais mostram efeitos genotóxicos, carcinogênicos e na reprodução (FAO/WHO, 2002; IARC, 1999).

A exposição humana a AM no trabalho é dérmica, sendo em contato com o monômero sólido, inalação de poeira e vapor. Além de exposição ocupacional, a exposição provável ao público em geral é através do consumo de certos alimentos.

Outra fonte de exposição à acrilamida ao público em geral poderia ser através da água potável tratada com floculantes de poliacrilamida. A AM pode permanecer na água após o tratamento e após floculação com poliacrilamidas, devido à sua elevada solubilidade e não sendo facilmente adsorvido pelos sedimentos (TAREKE et al., 2002; CROLL et al., 1974; BROWN et al., 1980)

Em animais e seres humanos é absorvida através da ingestão, inalação ou absorção da pele, podendo ser metabolizada através de duas vias distintas de excreção dos compostos, uma envolve o citocromo P450, uma enzima metabólica que possibilita a transformação da acrilamida em uma forma de excreção facilitada, a glicidamida. Já a outra via, envolve a conjugação da acrilamida com o glutationa (GST), formando N-acetil-S-(3-amino-3-oxopropil), resultando na cisteína como produto final (FÉLIX, 2007).

A acrilamida é também utilizada como um intermediário químico na produção de N-methylolacrilamida e acrilamida N-butoxi e como um super absorvente em fraldas descartáveis, médica e produtos agrícolas (ATSDR, 2009). No uso em todo o mundo, a acrilamida é liberada no meio ambiente como resíduos durante a sua produção e na fabricação de poliacrilamidas e outros polímeros.

O mais importante resultado da contaminação ambiental é na utilização de acrilamida em “grouting” do solo. Alguns relatórios têm indicado que a poliacrilamida, na presença de luz solar e glifosato, degrada ao monomero e esta é uma entrada direta de acrilamida em áreas agrícolas já que está presente em hidrogéis utilizados para uma maior absorção de água. (SMITH et al., 1996; SMITH, et al., 1993). O glifosato parece interagir tanto com o monomero de acrilamida ou polímeros, diminuindo a taxa de degradação do monomero (VER VERS, 1999). A meia-vida de acrilamida em solo aeróbios aumenta quando a temperatura diminui (EPA, 1994).

A degradação do monómero de AM em rios varia entre semanas a meses (BROWN et al., 1980) sendo que em condições aeróbias, a degradação da acrilamida em água doce por bactérias foi relatada com uma meia-vida de 55-70 horas (CONWAY et al., 1979). A acrilamida tem demonstrado que permanece ligeiramente por periodo mais longo em estuários de sal que de água doce (CROLL et al.; 1974). As emissões de AM para o solo e água de 1987 a 1993 totalizaram mais de 18 toneladas das quais cerca de 85 por cento foi para a água, de acordo com o Inventário de Lançamento de Produtos Tóxicos da Agência de Proteção Ambiental (EPA) dos EUA.

Com a intenção de garantir os riscos referentes à presença do monômero de acrilamida na água potável, a União Européia estabelece limite residual de 0,1 µg/l de acrilamida e a EPA estabeleceu um de 0,5 µg/l, sendo a Organização Mundial de Saúde também permite estes valores limites para a água potável. No Brasil, valor máximo permitido é de 0,5 µg/l, segundo a portaria nº 2914, de 12 de dezembro de 2011 do Ministério da Saúde (MS) (BRASIL, 2011).

3.2 Usos da acrilamida no solo e em agroecossistemas

Durante muito tempo, o homem vem buscando alternativas para aumentar a irrigação de plantas. O sistema de retenção de água apresentado no uso de hidrogéis de poliacrilamida é de grande valia, pois devido a sua grande capacidade em armazenar centenas de vezes seu peso em água e liberando-a gradativamente para as plantas, possibilita o aumento os intervalos de irrigação. O surgimento dos hidrogéis a base de poliacrilamida na agricultura, se deu na década de 50 por uma empresa americana. Nessa época, a capacidade de retenção de água não ultrapassava 20 vezes a sua massa. No entanto, os materiais de alto custo de aplicação limitaram seu uso por algum tempo. O interesse em condicionadores de solo foi renovado nos anos de 1970 (AZEVEDO et al., 2002).

Os polímeros na agricultura são preferencialmente usados para mudas, flores, e cultivo de vegetais visando melhorar condições de disponibilidade de água, como condicionadores de solo. Um condicionar de solo é definido como todo material orgânico ou sintético, natural ou quimicamente modificado que, adicionado ao solo, altera favoravelmente suas propriedades físicas e estruturais (SILVA, 2006).

A adição de condicionadores no solo melhora suas propriedades estruturais na medida em que aumenta a capacidade de retenção de água e melhora a permeabilidade do solo, além de reduzir a erosão causada pela água e ventos e contribuir para o crescimento de plantas (AZEVEDO et al., 2000). Terry e Nelson (1986) observaram uma melhora em termos percentuais de 80% na estabilidade do solo após a adição de poliacrilamida aniônica.

A partir do trabalho de revisão de Azevedo, Bertonha e Gonçalves (2002), em relação ao uso de hidrogéis na agricultura, podemos constatar resultados positivos quanto à ação dos hidrogéis na redução das perdas de nutrientes, bem como a ação dos hidrogéis no aumento da retenção de água no solo. Os autores concluíram que

o hidrogel é um produto promissor para ser usado na agricultura irrigada ou de sequeiro, principalmente pela habilidade que o mesmo possui em armazenar e disponibilizar água às plantas.

No mercado mundial existem atualmente mais de 100 marcas comerciais. O Brasil pouco utiliza desta tecnologia, em razão do alto custo deste material e da pouca disponibilidade no mercado nacional sendo a maioria dos produtos comerciais é feito à base de poliacrilamida. Recentemente, uma nova geração de condicionadores de solo começou a ser desenvolvido, envolvendo a poliacrilamida com alto teor de grupamentos ionizáveis (carboxilatos). Dentre os hidrogéis aplicados na agricultura, poliacrilamidas ou copolímeros de acrilato-acrilamida com ligações cruzadas são responsáveis pela maioria dos hidrogéis, visto permanecerem ativos por um longo tempo.

A dessorção da poliacrilamida após adição ao solo raramente ocorre, e após processos de secagem, o polímero fica irreversivelmente ligado ao solo. No solo, é degradada como resultado de processos físicos de cultivo, químicos, biológicos e fotoquímicos (SMITH et al., 1997; CAULFIELD et al., 2003.)

Estudos da degradação de poliacrilamida aniônica solúvel em água, utilizada principalmente para evitar a erosão do solo, foram desenvolvidos em solo com baixa concentração de carbono a partir de medidas da abundância natural dos isótopos estáveis. Quando 5382 Kg de poliacrilamida foram aplicados por hectare a um solo pobre em carbono, 13% da poliacrilamida foi degradada após 6 anos e 73% após 12 anos (ENTRY et al., 2008).

3.3. Ecotoxicologia e Testes de Toxidade

A poluição dos corpos hídricos tem aumentado desde a revolução industrial no século 19. A quantidade e a complexidade dos resíduos tóxicos lançados nos ecossistemas aquáticos, terrestres e na atmosfera têm aumentado significativamente (ZAGATTO & BERTOLETTI, 2006). Medidas de prevenção e de uso racional dos ambientes aquáticos vêm sendo planejadas e implementadas em muitos países. A complexa composição dos efluentes gerou necessidades maiores sobre o conhecimento dos efeitos tóxicos dos diferentes poluentes sobre a biota aquática. A avaliação ecotoxicológica tornou-se uma ferramenta indispensável para a análise da qualidade desses efluentes, associando as concentrações de contaminantes no

meio e seu risco ecotoxicológico, complementando os mecanismos tradicionais do controle da poluição (PEREIRA et al., 2007)

Segundo Hoffmann et al. (2003), o termo ecotoxicologia foi usado por Truhaut em 1969 como uma extensão natural da toxicologia, a ciência dos efeitos de substâncias tóxicas em organismos individuais, para os efeitos ecológicos de poluentes. Mais recentemente, definiu-se a ecotoxicologia como a ciência de contaminantes na biosfera e seus efeitos sobre os constituintes da biosfera, que inclui os humanos. Ecotoxicologia emprega parâmetros ecológicos para avaliar a toxicidade. Em um sentido mais restritivo, pode ser definida como a ciência de avaliar os efeitos de substâncias tóxicas sobre os ecossistemas com o objetivo de proteger ecossistemas inteiros, e não apenas componentes isolados.

Em muitos países vem sendo implementado a avaliação ecotoxicológica para obtenção de medidas de prevenção de contaminação ambiental e de uso racional dos ambientes aquáticos. Testes toxicológicos tornaram-se uma ferramenta indispensável para a análise de qualidade de efluentes, pois fazem a associação de mecanismos tradicionais do controle da poluição juntamente com as concentrações de contaminantes no meio e seu risco toxicológico (PEREIRA et al, 2007). Segundo Magalhães (2008), os instrumentos de análise de testes de toxicidade são capazes de responder a toxicidade de compostos químicos, sinalizando os potenciais ecotoxicológicos e seus mecanismos de ação em organismos vivos, a partir da obtenção de curvas concentração-efeito e concentração-resposta, bem como na detecção de ecotoxicidade em ambientes impactados. A inserção dos ensaios ecotoxicológicos como ferramenta de avaliação ambiental é de fundamental importância, pois alguns fatores não são avaliados pelas variáveis abióticas, como por exemplo, a biodisponibilidade e a interação entre os efeitos de poluentes.

Os testes de toxicidade podem ser basicamente distinguidos em testes de toxicidade aguda e crônica. Os testes de toxicidade aguda avaliam uma resposta rápida e severa dos organismos a um agente estressor, geralmente, o efeito observado é a letalidade ou a imobilidade em invertebrados. O objetivo básico do teste é determinar a Concentração Letal Média (CL₅₀). Já os testes de toxicidade crônica avaliam concentrações da substância química que não causam a morte dos indivíduos, mas interfere na sua fisiologia, morfologia ou comportamento, sendo os resultados expressos através da Concentração Efetiva Média (CE₅₀), que representa

a concentração da substância tóxica que causa algum efeito observado em 50% dos indivíduos.

Testes com a exposição à acrilamida foi estudada por Nunes (2014) que indicou a toxicidade da acrilamida nas células da microalga *D. quadricauda*, expressando a concentração de 5,88 mg.L⁻¹ como a EC₅₀ na espécie testada. A presença da acrilamida causou alterações significativas sobre o crescimento populacional e sobre o biovolume celular da microalga.

Quadro 1 Definição de alguns termos utilizados em testes de toxicidade.

Fonte: Adaptado de (COSTA, 2008).

Parâmetro	Definição	Tempo de Exposição
CE50	Concentração Efetiva Média: concentração de amostra que causa um efeito agudo (imobilidade, por exemplo) a 50% dos organismos no tempo de exposição e nas condições do teste.	24 a 72 h
CL50	Concentração Letal Média: concentração de amostra que causa mortalidade de 50% dos organismos no tempo de exposição e nas condições do teste.	24 a 96 h
DL50	Dose Letal Média: dose de amostra que causa mortalidade de 50% dos organismos no tempo de exposição e condições do teste.	24 a 96 h
CEO	Concentração de Efeito Observado: menor concentração de agente tóxico que causa efeito deletério estatisticamente significativo nos organismos no tempo de exposição e nas condições do teste.	7 dias
CENO	Concentração de Efeito não Observado: maior concentração de agente tóxico que causa efeito deletério estatisticamente significativo nos organismos no tempo de exposição e nas condições do teste.	7 dias

. As dimensões celulares, bem como a plasticidade fenotípica também foram afetadas pela exposição à acrilamida. Takahashi (2004) realizou testes com a substância, e através de seus estudos utilizando um paramécio verde, determinou os valores de toxicidade aguda (≥ 1500 mg/L⁻¹) e toxicidade crônica (500 mg/L⁻¹), entretanto em baixas concentrações não ocorreram alterações significativas no crescimento dos indivíduos. Porém quando avaliou o crescimento das algas endossimbióticas obteve concentrações bem mais baixas, encontrando 7,8mg/L⁻¹ como a concentração que inibiu 50% do crescimento das células.

3.2. Algas como organismos indicadores

Englobando organismos com clorofila e outros pigmentos fotossintéticos, as algas são organismos que realizam fotossíntese oxigênica, mas o termo alga não possui valor taxonômico (RAVEN, 2001; LOURENÇO, 2006) devido à grande diversidade morfológica e de habitats. Variam desde organismos procarióticos unicelulares como as cianobactérias até eucarióticos de grande porte como as algas marinhas da classe Phaeophyceae. No entanto, o grupo de maior diversidade é formado pelas Chlorophyceae, também conhecidas como algas verdes. Sendo consideradas responsáveis por pelo menos 60% da produção primária da Terra, são encontradas em diversos ambientes como em água doce, no meio marinho e no solo (CHRISTI, 2004).

As algas são organismos ecologicamente importantes, principalmente pelo papel de manter o equilíbrio ecológico de um ecossistema e como bioindicadoras ambientais. Sendo o grupo que representa o nível trófico mais inferior, as algas servem como fonte de alimento fundamental para outros organismos aquáticos e ocupando uma posição exclusiva entre os produtores primários. Desta forma, as algas são consideradas um elo importante na cadeia alimentar e essenciais a “economia” dos ambientes aquáticos.. (VIDOTTI e ROLLEMBERG, 2004).

Para a realização dos testes ecotoxicológicos é necessária a utilização de organismos indicadores, como as algas clorofíceas, que apresentam alguma alteração, seja ela fisiológica, morfológica ou comportamental quando expostos a determinados poluentes, devido às suas características de pequeno limite de tolerância ecológica, a determinadas substâncias químicas (MAGALHÃES, 2008).

Os testes com algas permitem identificar materiais que afetam o crescimento, avaliar a disponibilidade biológica de nutrientes e determinar curvas dose-resposta para as substâncias limitantes do crescimento (VIDOTTI & ROLLEMBERG, 2004).

As razões que justificam o emprego de algas em bioensaios são o simples cultivo em laboratório, curto ciclo de vida e sua abundância em sistemas fluviais. Além disso, esses organismos se reproduzem por partenogênese, possibilitando a obtenção de populações mais homogêneas a serem utilizadas em bioensaios (CESAR et al., 2010).

A microalga clorofícea *D. quadricauda* é de ocorrência cosmopolita e caracteriza-se por apresentar formas coloniais em miniatura denominada

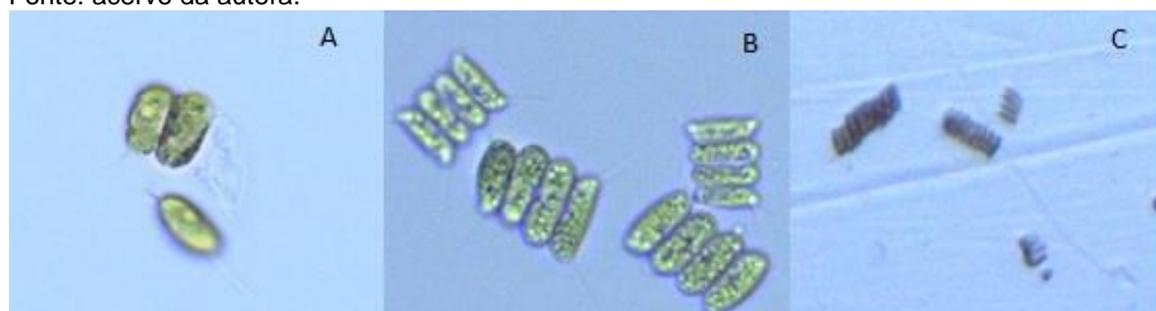
autocolônias ou cenóbios, em que os grupos de 4 a 8 células estão ligados juntos em uma fileira. A morfologia isto é, o número de células por cenóbio de *Desmodesmus* varia dependendo das condições ambientais e o estado fisiológico. Sob estresse ambiental, ele pode falhar para produzir tais colônias (LURLING e VAN DONK 1999, LOMBARDI et al., 2007).

Essas mudanças na plasticidade fenotípica são consideradas uma resposta ao estresse ambiental. Recentemente, a variação morfológica ou deformação de cenóbios tem sido empregada como medida de avaliação de toxicidade de várias substâncias (PEÑA-CASTRO et al., 2004; LOMBARDI et al., 2007; CHIA e MUSA 2014).

A figura 1 ilustra diferentes morfologias encontradas no cultivo do gênero *Desmodesmus*.

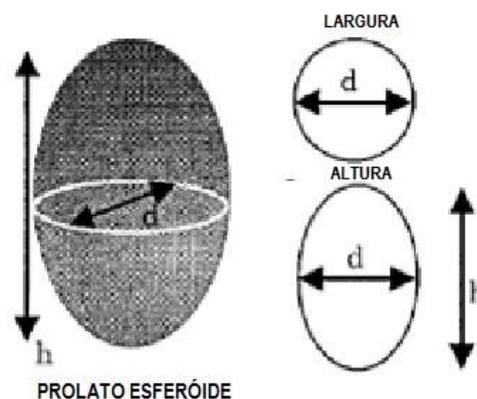
Figura 1 – Cultura de *Desmodesmus quadricauda* representando os diferentes cenóbios encontrados. (A) cenóbio de uma e duas células, (B) cenóbios de quatro células e (C) cenóbios de oito células.

Fonte: acervo da autora.



Além da alteração morfológica, o tamanho das algas também varia consideravelmente, dentro da mesma espécie e ao longo do ciclo de vida. Com as medidas celulares é possível calcular o biovolume das microalgas (HILLEBRAND, 1999) sendo geralmente utilizado para avaliar a abundância relativa (como biomassa ou carbono) que varia dependendo da espécie, da forma e do tamanho das células. No caso específico do gênero *Desmodesmus*, o formato enquadrado é na categoria de prolato esferóide, sendo necessárias aferições da largura e do comprimento central das células conforme indicado por Hillebrand (1999) e demonstrado na figura 2.

Figura 2- Medidas microscópicas necessárias para o cálculo do biovolume do gênero *Desmodesmus*. Fonte: adaptado de HILLEBRAND (1999).



Os organismos aquáticos são frequentemente expostos a diversos estressores, tanto naturais quanto antropogênicos, de forma simultânea. Interações entre múltiplas fontes de estresse podem ser tanto aditivas quanto não aditivas.

O tipo de efeito interativo, assim, é dependente de quais os estressores que estão agindo simultaneamente, qual o nível trófico atingido e qual o nível da resposta biológica, por exemplo, interações entre espécies em uma comunidade podem mascarar os impactos de estressores múltiplos e, muitas vezes, serem de difícil detecção.

A visão ecossistêmica tem sido enfatizada ultimamente em uma nova abordagem que vem sendo denominada de Ecologia do Estresse, à medida que os agentes tóxicos frequentemente interagem com fatores de estresse naturais, como temperatura, pH, pressão osmótica e nutrição, principalmente quando os efeitos das substâncias tóxicas tornam-se mais severos. Uma situação de estresse surge quando algum fator ambiental muda ou quando um organismo encontra-se fora de seu nicho ecológico (MAGALHES, 2008).

A temperatura é um dos fatores ambientais mais importantes na composição bioquímica das microalgas (RICHMOND, 2004). Ao ocorrer um decréscimo na temperatura de cultivo abaixo do nível ótimo de crescimento geralmente aumenta o grau de instauração dos sistemas de membrana lipídica das células, já em baixas temperaturas, ocorre o aumento da estabilidade e fluidez das membranas celulares, principalmente no aparato fotossintético (NISHIDA e MURATA, 1996). Conforme Thompson et al. (1992), decréscimos na temperatura de cultivo abaixo do ótimo fisiológico podem resultar no aumento da produção de enzimas como um mecanismo adaptativo para manutenção das taxas fotossintéticas e respiração.

Além da temperatura o pH do meio de cultivo é um dos fatores de importância no cultivo de algas. O pH determina a solubilidade do dióxido de carbono e minerais no meio e influencia direta ou indiretamente o metabolismo das algas. O pH depende de vários fatores, como composição e capacidade tamponante do meio, quantidade de dióxido de carbono dissolvido, temperatura (que determina a solubilidade do CO₂) e atividade metabólica das células (BECKER, 1995).

Os testes com algas permitem identificar materiais que afetam o crescimento, avaliar a disponibilidade biológica de nutrientes e determinar curvas dose-resposta para as substâncias limitantes do crescimento. A tolerância apresentada por algumas espécies de algas a concentrações mais elevadas de algumas substâncias potencialmente tóxicas é bastante significativa para a acumulação na alga e para o comprometimento da cadeia alimentar pela transferência aos níveis tróficos superiores. Assim, existe uma clara necessidade de conceitos e abordagens apropriadas a analisar, quantificar e analisar as respostas dos diferentes níveis tróficos em ambientes aquáticos a estressores múltiplos.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. LOCAL

Os experimentos foram realizados seguindo as metodologias adaptadas proposta por ABNT (2005), OECD/OCDE (2011) e APHA (1998) e conduzidos no Laboratório de Ficologia (LabFic) e Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais do Departamento de Biologia e no Laboratório do Meio Ambiente (LEMA) do Departamento da Engenharia Sanitária e Ambiental, ambos pertencentes à Universidade Federal de Santa Maria - RS.

4.2. MATERIAL

Para a realização dos ensaios foi utilizada uma cultura de *D. quadricauda*, doadas pelo Departamento de Biologia da Universidade Federal de Rio Grande (FURG), Rio Grande, RS. Para conseguir uma quantidade segura de cepas para

início dos experimentos, as amostras das culturas de algas foram submetidas a repicagens em tubos de ensaios para um aumento no estoque de células.

As amostras foram devidamente identificadas conforme a data da repicagem, incubadas a 24°C em fotoperíodo de 12h por sete dias. Após o período de incubação foi verificado se as culturas se mantiveram unialgais, através de análises ao microscópio para células contaminantes. Posteriormente, encaminharam-se as suspensões de células da incubadora para um refrigerador, sendo mantidas refrigeradas por até seis meses e com análises periódicas para evitar a presença de contaminantes.

Figura 3 - Cepas iniciais da solução estoque e após repicagem. (A) Cepa inicial doada FURG e (B) Cultura após sucessivas repicagens da cepa inicial de *D. quadricauda*. Foto: Acervo da autora.



Para a manutenção da solução estoque bem como para os ensaios utilizou-se o meio de cultura Water Culture – WC, conforme descrito no Quadro 2.

As soluções preparadas para o meio de cultura foram mantidas congeladas por um período de um ano, devidamente identificadas e com a data de fabricação e validade. Foi descongelado somente o que foi utilizado para o preparo do meio de cultura. Já os meios de cultura, quando necessário, permaneceram congelados a -5° C por no máximo 45 dias.

O princípio do teste de toxicidade aguda com algas, conforme ABNT (2005), consiste em expor uma suspensão de células de algas com densidade conhecida a diferentes condições de estresse ambiental e de uma substância tóxica, durante um período de 72 horas sob condições pré-estabelecidas. O resultado é expresso através da inibição do crescimento celular verificada através de contagens celulares periódicas diante microscópio, em relação ao controle.

Quadro 2 - Meio de Cultura WC.

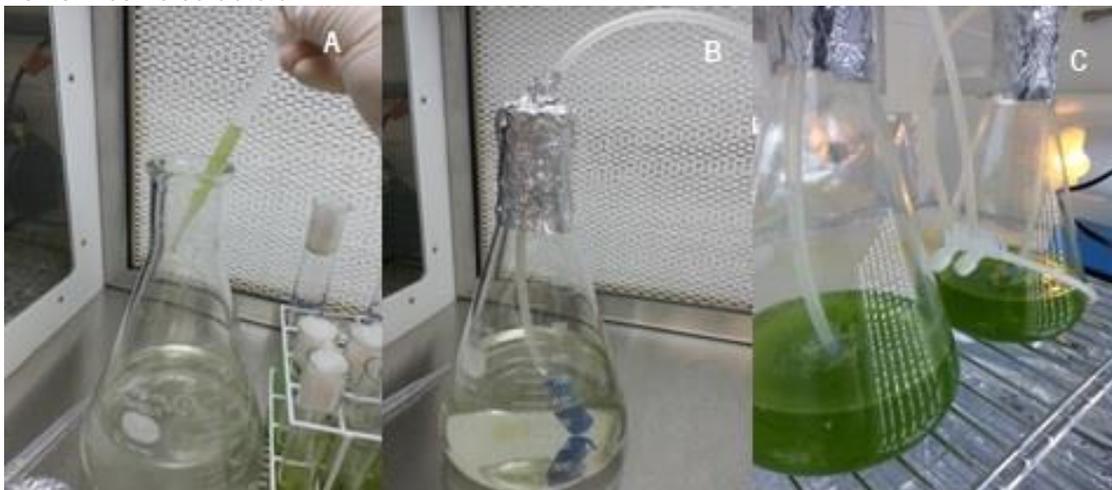
Fonte: GUILLARD & LORENZEN (1972).

Meio de Cultura WC		
Macronutrientes		
Substância	Concentração	Quantidade
CaCl ₂	36,8 g/L ⁻¹	1ml/ L ⁻¹
MgSO ₄	37,0 g/L ⁻¹	1ml/ L ⁻¹
NaHCO ₃	12,6 g/L ⁻¹	1ml/ L ⁻¹
K ₂ HPO ₄	8,7 g/L ⁻¹	1ml/ L ⁻¹
NaNO ₃	85 g/L ⁻¹	1ml/ L ⁻¹
Na ₂ SiO ₃	28,4 g/L ⁻¹	1ml/ L ⁻¹
Micronutrientes		
Substância	Concentração	Quantidade
Na ₂ EDTA	4,36 g/L ⁻¹	1ml/ L ⁻¹
FeCl ₃	3,15 g/L ⁻¹	
CuSO ₄	0,010 g/L ⁻¹	
ZnSO ₄	0,022 g/L ⁻¹	
CoCl ₂	0,010 g/L ⁻¹	
MnCl ₂	0,018 g/L ⁻¹	
Na ₂ MoO ₄	0,0006 g/L ⁻¹	
H ₃ BO ₃	0,1 g/L ⁻¹	
Vitaminas		
Substância	Concentração	Quantidade
Tiamina	0,1 g/L ⁻¹	1ml/ L ⁻¹
Biotina	0,0005 g/L ⁻¹	
B ₁₂	0,0005 g/L ⁻¹	

Para o início do experimento é necessária uma cultura em fase de crescimento exponencial, sendo que para a clorófitica *Desmodesmus* é necessário o preparo do inóculo cinco dias antes da realização dos testes (Figura 4). Em uma câmara de fluxo laminar, colocou-se uma cepa repicada da coleção em aproximadamente 750 mL de meio de cultura previamente autoclavado a 120° C a 1 atm, que foi mantida nas mesmas condições do ensaio definitivo.

Figura 4 – Preparação e incubação do inóculo inicial. (A) Inoculação da cepa repicada de *D. quadricauda*, (B) Difusor de ar para aeração constante do meio e (C) Inóculo após cinco dias em crescimento.

Fonte: Acervo da autora



Todos os experimentos foram realizados com culturas axênicas cultivadas em meio Water Culture (WC/2) (GUILLARD & LORENZEN, 1972) com ajuste de pH para 7.0 através de HNO_3 ou NaOH , sob temperatura de 24 ± 2 °C e fotoperíodo de 12 horas por dia.

Os testes foram realizados em frascos erlenmeyer de 250 mL utilizando o volume de 110 mL de meio de cultura, 25 mL de inóculo e 115 mL de solução com a concentração de acrilamida a ser testada ou de água destilada para o controle, em cada replica. Foi montado em cada experimento os tratamentos e controles conforme o quadro 3.

Quadro 3: Nomenclatura e parâmetros de cada tratamento e controle durante os ensaios.

	Frasco de 250 mL	Padão	Temperatura
Controle Negativo - CN (pH 7)	110 mL de meio de cultura 115 mL de água destilada 25 mL de inóculo	Microalga	17° C 24° C
Controle de pH - CpH (pH 5, 6 e 8)	110 mL de meio de cultura 115 mL de água destilada 25 mL de inóculo	Microalga e alteração de pH	17° C 24° C
Tratamento CE_{50} - T (pH 5, 6 e 8)	110 mL de meio de cultura 115 mL de solução de acrilamida de 5,88 mg/L^{-1} 25 mL de inóculo	Microalga e acrilamida	17° C 24° C
Tratamento CE_{50} + alteração de pH - TR (pH 5, 6 e 8)	110 mL de meio de cultura 115 mL de solução de acrilamida de 5,88 mg/L^{-1} 25 mL de inóculo	Microalga, acrilamida e alteração de pH	17° C 24° C

4.3. METODOLOGIA

4.3.1 Preparo dos meios de cultura e vidrarias

O meio de cultura e as demais vidrarias utilizadas nos ensaios foram esterilizadas em autoclave a temperatura de 121°C a 1 atm, para eliminação de patógenos e células de outras microalgas, visando manutenção de uma cultura monoespecífica (GRESSLER, 2011). O restante do material não autoclavado, como mangueiras, difusores de ar, ponteiras, pipetas de Pasteur e etc., ficaram em solução de hipoclorito de sódio por um período superior a três horas, e posteriormente foram lavados cinco vezes com água destilada para eliminação de um possível residual da solução de hipoclorito, e após a secagem, submetidos a radiação ultravioleta por 30 min. O preparo das soluções, o inóculo das microalgas, bem como a montagem dos frascos para o experimento foi executado em câmara de fluxo laminar para assegurar a manutenção da condição axênica.

4.3.2. Cálculo da concentração da acrilamida

A exposição à acrilamida foi efetuada à uma concentração pré-determinada como CE_{50} (concentração de efeito que inibe em 50% o crescimento da cultura) sendo de $5,88 \text{ mg.L}^{-1}$ conforme estudo realizado por Nunes (2014).

A concentração de $5,88 \text{ mg.L}^{-1}$ foi calculada através da equação 1 onde utilizou-se uma solução mãe inicial de 500 mg.L^{-1} de acrilamida e realizada a diluição da substância nos frascos.

Equação 1:

$$C1 \cdot V1 = C2 \cdot V2$$

Onde:

C1 = concentração inicial

V1 = Volume inicial

C2 = concentração final

V2 = volume final

4.3.3 Densidade celular e plasticidade fenotípica

Para iniciar o experimento é necessário calcular a quantidade de cultura necessária para o preparo do inóculo que será utilizado no ensaio. Utilizou-se como concentração inicial aproximadamente 13000 células/mL⁻¹ e realizou-se a contagem celular através da câmara de contagem de Sedgewick Rafter. A câmara de contagem caracteriza-se por ser reticulada, sendo composta por 1000 campos, cada campo equivale a 1 µm e comporta 1 ml no total.

Por ser um teste realizado com *D. quadricauda* leva-se em consideração as seguintes alterações morfológicas encontradas: cenóbios com quatro, duas, oito e uma célula. Para o cálculo do inóculo inicial bem como as contagens para quantificação da densidade celular nas outras etapas do experimento, utilizou-se o seguinte modelo de planilha:

Quadro 4 – Planilha de contagem para inóculo inicial e densidade celular.

Data:	Teste:
Número de Diluições:	Amostra:
Total de cenóbios contados:	Números de Campos:
Cenóbios de 4 células:	
Cenóbios de 2 células:	
Cenóbios de 1 célula:	
Cenóbios de 8 células:	
Total de cenóbios/mL	
Total de células/mL:	

Para a realização do cálculo do número de indivíduos/mL ou de células/mL, a seguinte equação (2) foi utilizada:

Equação 2:

$$\text{Inóculo inicial} = \text{n}^{\circ} \text{ de céls./mL ou cenóbios./mL (contadas)} \div \left(\frac{\text{número de campos}}{1000} \right)$$

Todos os ensaios foram realizados em triplicata e instalados em uma incubadora BOD (Demanda Bioquímica de Oxigênio) a 24 ±2° C e 17±2° C, com iluminação constante de 4500 lux e aeração constante por 72 horas e com amostragens periódicas.

A temperatura escolhida para a realização dos ensaios simula as condições ambientais de inverno e verão encontradas no Rio Grande do Sul/RS, onde apresenta variações climáticas durante estas estações.

Após o início dos cultivos, foram retiradas alíquotas de 20 mL das culturas e fixadas com lugol acético, em períodos de 24 horas para a determinação da densidade celular através de contagens realizadas em microscópio óptico com auxílio de uma câmara de contagem de Sedgewick-Rafter e contador de células manual.

4.3.4 Biovolume e dimensões celulares

O biovolume algal ($\text{mm}^3/\text{L}^{-1}$) foi estimado conforme metodologia proposta por HILLEBRAND (1999) e considera-se em média 30 indivíduos, calculado a partir das dimensões celulares aplicando fórmula de sólidos geométricos correspondentes ao formato das células prolato esferóide (Equação 03).

$$\text{Equação 03: } V = \frac{\pi}{6} \cdot d^2 \cdot h$$

Onde:

d= largura da célula

h= altura da célula

O volume celular obtido para as células do controle e do tratamento nas três etapas experimentais foi multiplicado pelos valores da densidade celular de cada grupo correspondente, calculados através da contagem microscópica. O fator resultante dessa multiplicação corresponde ao biovolume dos períodos de 24, 48 e 72 horas para o grupo controle e para o grupo tratado com acrilamida.

As medidas de comprimento e largura celular dos controles e tratamentos tiveram como objetivo analisar se a exposição da acrilamida juntamente com o estresse causado pela mudança de temperatura e alteração de pH, além da agitação constante e luminosidade das condições experimentais, ocasionaria alterações da morfologia das células da microalga testada.

4.4. TESTES ESTATÍSTICOS

Os resultados obtidos foram submetidos ao Teste de Shapiro-Wilk para verificar a normalidade dos dados e ao Teste de Levene para a homogeneidade da variância. Para avaliar se as diferenças apresentadas entre o grupo controle e o grupo tratado com acrilamida foram significativas, quando os dados apresentaram normalidade e homogeneidade de variância, os resultados foram analisados através de ANOVA seguida do teste de Tukey com 95% de confiança, para a comparação entre todos os pares. Já quando os resultados obtidos não se encaixavam em uma análise paramétrica, foram analisados a partir do teste de Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Dunn. A análise estatística foi realizada através do software BioEstat 5.0. e Past.

As hipóteses consideradas para a análise estatística foram:

1. Se ocorreram diferenças significativas para os parâmetros de densidade celular, biovolume e plasticidade fenotípica entre o grupo tratado com acrilamida ($CE_{50} = 5,88 \text{ mg/L}^{-1}$) em comparação aos resultados do controle, durante o período de 24, 48 e 72 horas.
2. Se ocorreu diferença significativa dos parâmetros de densidade celular, biovolume e plasticidade fenotípica entre os grupos com acrilamida, variação de pH e controle em duas temperaturas distintas entre os períodos de 24, 48 e 72 horas.
3. Se ocorreu variação significativa dos parâmetros de densidade celular, biovolume e plasticidade fenotípica dentro das amostras do grupo controle entre os períodos das 24, 48 e 72 horas.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. DENSIDADE CELULAR

Avaliando o crescimento populacional, onde se observou a densidade de células por mL⁻¹, no período de 24, 48 e 72 horas em incubação nos grupos controle negativo, controle de pH, tratamento e tratamento com alteração de pH testado separadamente, nas temperaturas de 24 °C e 17 °C, os resultados mostraram que houve aumento significativo da densidade celular ($p < 0,005$) em todos os testes.

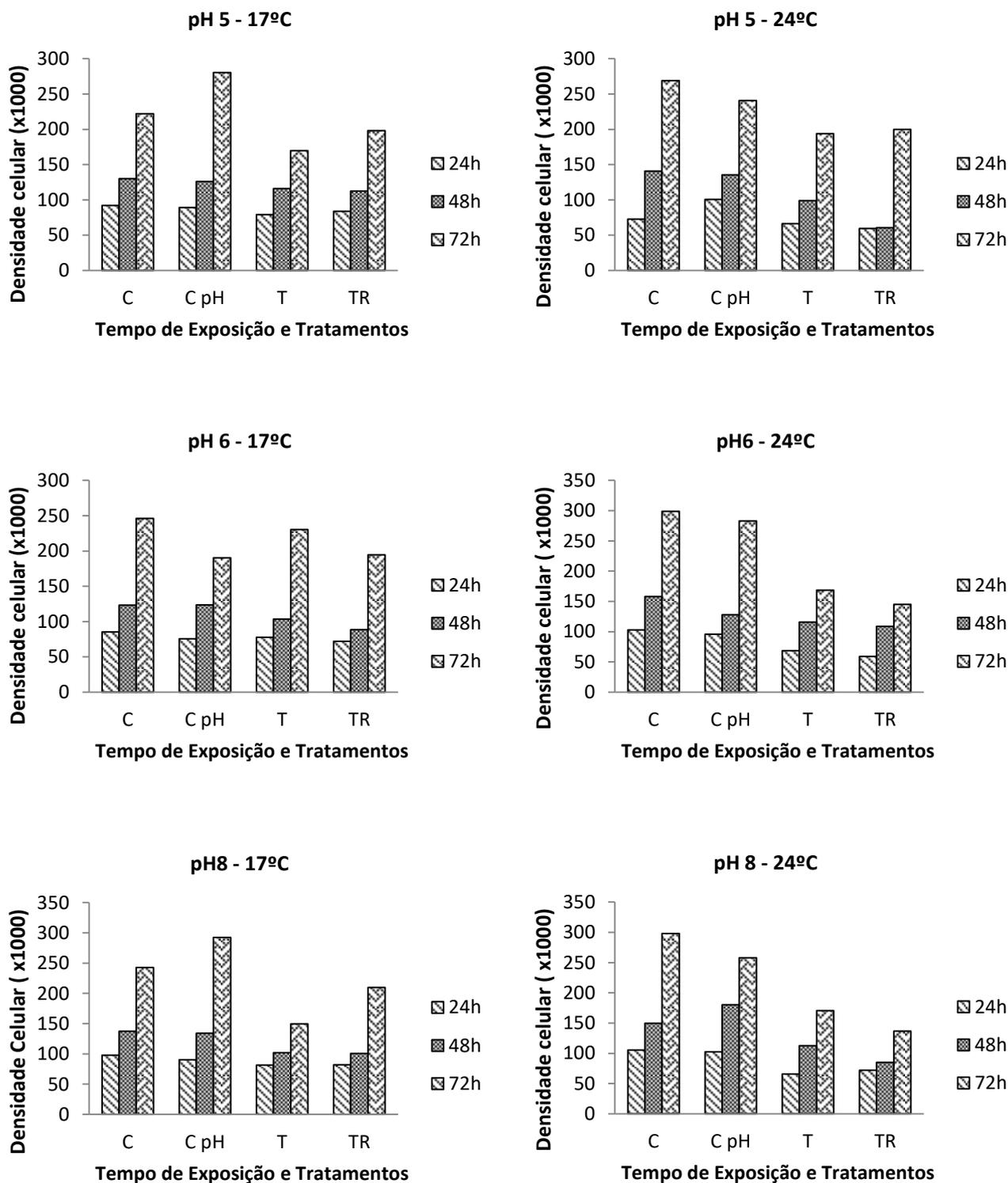
Ao testar as alterações das temperaturas 17 °C e 24 °C (Figura 5), é evidente que a influência da acrilamida em dosagens de 5,88mg.L⁻¹ de acrilamida é suficiente para alterar o crescimento populacional da microalga testada. Os testes realizados em temperatura a 17 °C e com os tratamentos com a presença de 5,88 mg.L⁻¹ de acrilamida em comparação com os mesmos testes a temperatura de 24° C indica uma diminuição da toxicidade da substancia testada.

Utilizando a diatomácea *Phaeodactylum tricornutum*, Mayasichi (1986) observou que as baixas temperaturas aumentaram o crescimento celular em exposição a atrazina em um periodo de 72 horas. Entretanto, a relação entre temperatura de 24 °C e os fatores de pH 8 e 6 apresenta diferença significativa ($p < 0,05$), demonstrando um aumento na toxicidade da acrilamida.

Recentemente, alguns estudos também relataram que a alta temperatura aumentou os efeitos tóxicos em microalgas de outros tipos de poluentes, como o cádmio, nanopaticulas de prata e hidrocarbonetos (QUIAN et al., 2010; OUKARROUM, et al. 2012, VIEIRA e GUILHERMINO, 2012). Já o estudo de Vieira (2012) ao testar hidrocarbonetos aromáticos (HA) na microalga plantônica *Tetraselmis chuii* demonstrou que todos os hidrocarbonetos do experimento reduziram significativamente o crescimento do *T. Chuii* após 96 h de exposição com concentrações de inibição de 20% entre 0,052 e 1,124 mg L⁻¹ a 20 ° C, e entre 0,048 e 0,831 mg L⁻¹ a 25 ° C. Assim, o aumento de temperatura de 5 ° C aumentou significativamente a toxicidade de todos os HA testados.

Ao testar a variação de temperatura da água no meio de cultura e a toxicidade do herbicida durion, Tasmin (2014) afirma que a 15 °C o herbicida apresentou uma maior toxicidade e em temperatura mais elevada o EC₅₀ da substância diminuiu.

Figura 5 - Densidade celular de *D. quadricauda* durante as três etapas experimentais com pH 5, pH 6 e pH 8 em temperatura de 17° e 24 °C.



Resultados similares foram observados também por Chalifou e Janour (2011) em testes com atrazina com microalga verde *Senedesmus obliquus*, com diatomacia *Navicula pelliculosa* e uma cepa tóxica e não tóxica de *Microcystis aeruginosa* foram aclimatados a três temperaturas diferentes (10, 15 e 25 ° C) e

expostas a cinco concentrações do herbicida atrazina (0-0,15 mM) durante 72 h. Com a exceção de *N. pelliculosa*, a toxicidade de atrazina foi maior quando os microorganismos foram aclimatados a temperaturas mais baixas.

As diferenças entre resultados sugerem que a sensibilidade à toxicidade de poluentes a microalgas em relação a temperatura pode se diferenciar devido a forma de ação dos mesmos. Alteração em fatores ambientais como o pH, pode alterar as propriedades químicas das substâncias poluentes, incluindo a solubilidade da mesma e sua forma de absorção no organismo testado (NEWSTED, 2004). Tasmim (2014) também indica em seu estudo que devido a temperatura mais alta, o herbicida apresenta uma degradação ou volatilização, o que não se aplica a acrilamida o qual tem altos valores para degradação, assim confirma a hipótese testada que a temperatura, bem como o efeito de poluentes, influenciam a densidade celular em microalgas. Assim a assimilação de temperatura com substâncias tóxicas deve ser considerada como um risco ecológico em ambientes aquáticos.

Comparando o grupo de controle de pH com os controle negativo, tratamento e tratamento com alteração de pH, os resultados estatísticos não sugerem a influência da temperatura como um fator limitante no crescimento celular.

5.2. DIMENSÕES CELULARES

Os resultados da avaliação das dimensões celulares demonstram que houve mudança de comprimento e largura do grupo controle em relação ao grupo controle de pH e do grupo tratado com acrilamida em comparação ao grupo com acrilamida e alteração de pH em todos os períodos do ensaio (Tabela 1 e 2).

Os testes com os controles de pH5, 6 e 8 apresentaram diferença significativa no comprimento em comparação a todos os grupos de controle e tratamento testados na temperatura 17 °C mas na temperatura 24 °C não houve resultado significativo ($p < 0,05$) no grupo de controle de pH6 e pH8, indicando que o pH favoreceu o desenvolvimento do comprimento das células do grupo controle de pH em temperatura a 17 °C.

Os grupos com tratamento de 5,88 mg.L⁻¹ de acrilamida e tratamento de 5,88 mg.L⁻¹ de acrilamida mais alteração de pH apresentaram resultados significativos

apenas no comprimento do grupo tratado com pH 8 nos períodos de 48 e 72 horas e na temperatura de 17 °C. Comparando os períodos de 24 h, 48 h e 72 h em cada grupo testado separadamente não ocorreram diferenças significativas.

Segundo Lourenço (2006), a influência do pH no desenvolvimento celular é demonstrada na absorção de nutrientes do meio de cultura, podendo ocorrer alteração fisiológicas e conseqüentemente morfológicas que indicariam este aumento de tamanho celular.

Foi realizada a comparação entre resultados para verificar a relação da temperatura na dimensão celular demonstrou que apenas nos testes com pH 8 houve significância. Com tal resultado, é possível afirmar que a temperatura baixa 17 C°, pH8 e na presença de acrilamida modifica as dimensões celulares da microalga *D. quadricauda*.

Na figura 6 é possível visualizar que comprimento nos testes realizados com os parâmetros o pH 5 e 6 a 17 °C apresentou um crescimento em todos os grupos, entretanto com o pH 8 o crescimento ocorreu apenas no grupo controle. Diante dos valores de largura, o crescimento nos tratamentos com acrilamida e com acrilamida e alteração de pH5 durante os períodos de 24 e 48 horas não apresentaram diferença elevada. Nos ensaios com o grupo tratamentos com acrilamida e com acrilamida e alteração dos pH6 e 8 o período de 72 horas a largura apresenta valores maiores que os períodos de 24 e 48 horas.

A largura celular dos controles negativos e controle de pH apresentou um valor maior que o dos dois tratamentos com acrilamida em ambas as temperaturas. O grupo de testes com parâmetro de pH 8 e tratado com acrilamida apresenta no período de 48 horas uma leve elevação de largura e logo após, no período de 72 horas, houve uma diminuição de tamanho, indicando a influência dos fatores pH e temperatura nas dimensões celulares da *D. quadricauda* (Figura 6 e 7).

Tabela 1 e 2– Média e desvio padrão do comprimento e da largura celular (μm) de *D. quadricauda* durante as 72 horas de exposição a $5,88 \text{ mg/L}^{-1}$ de acrilamida e alteração de pH – Temperatura 17°C e 24°C .

	Comprimento celular (μm) – 17°C		
	24h	48h	72h
Controle Negativo	11.77 \pm 2.18	12.55 \pm 2.44	12.34 \pm 2.55
Controle de pH5	13.35 \pm 1.68*	14.13 \pm 1.64*	14.43 \pm 2.15*
Tratamento CE ₅₀	11.48 \pm 2.69	12.69 \pm 2.53	13.00 \pm 2.09
Tratamento CE ₅₀ + Alteração de pH5	11.71 \pm 1.97	11.69 \pm 2.46	11.99 \pm 2.26
Controle Negativo	12.10 \pm 1.97	13.06 \pm 1.97	13.76 \pm 1.94
Controle de pH6	13.37 \pm 1.82	13.53 \pm 1.74	13.11 \pm 2.48
Tratamento CE ₅₀	11.73 \pm 2.04	12.55 \pm 2.40	12.72 \pm 2.33
Tratamento CE ₅₀ + Alteração de pH6	11.33 \pm 2.47	11.83 \pm 2.54	11.93 \pm 2.37
Controle Negativo	14.76 \pm 2.06	14.82 \pm 2.40	15.89 \pm 2.18
Controle de pH8	11.82 \pm 2.22	14.83 \pm 2.72	15.55 \pm 3.22
Tratamento CE ₅₀	13.33 \pm 2.50	14.57 \pm 1.79	13.68 \pm 2.30
Tratamento CE ₅₀ + Alteração de pH8	13.25 \pm 1.88	14.05 \pm 1.70	13.84 \pm 3.23
	Largura celular (μm) – 17°C		
	24h	48h	72h
Controle Negativo	4.78 \pm 1.36	4.69 \pm	4.69 \pm 1.53
Controle de pH5	5.46 \pm 0.88*	6.01 \pm 1.00*	6.39 \pm 1.00*
Tratamento CE ₅₀	4.97 \pm 1.33	4.87 \pm 1.38	4.69 \pm 1.47
Tratamento CE ₅₀ + Alteração de pH5	4.97 \pm 0.93	4.68 \pm 1.25	4.31 \pm 1.19
Controle Negativo	4.66 \pm 1.12	4.49 \pm 1.00	5.12 \pm 1.12
Controle de pH6	5.48 \pm 1.21	5.66 \pm 1.02	5.16 \pm 1.51
Tratamento CE ₅₀	4.74 \pm 1.24	4.76 \pm 1.34	4.98 \pm 1.24
Tratamento CE ₅₀ + Alteração de pH6	4.56 \pm 1.32	4.44 \pm 1.41	4.67 \pm 1.22
Controle Negativo	5.31 \pm 0.99	6.14 \pm 1.13	6.08 \pm 1.68
Controle de pH8	5.09 \pm 1.00	5.84 \pm 1.63	6.61 \pm 1.65
Tratamento CE ₅₀	5.32 \pm 1.65	5.85 \pm 0.98	5.28 \pm 1.19
Tratamento CE ₅₀ + Alteração de pH8	5.48 \pm 1.12	5.79 \pm 0.84	5.37 \pm 1.80

	Comprimento celular (μm) – 24°C		
	24h	48h	72h
Controle Negativo	11.77 \pm 2.18	12.55 \pm 2.44	12.34 \pm 2.55
Controle de pH5	13.35 \pm 1.68*	14.13 \pm 1.64*	14.43 \pm 2.15*
Tratamento CE ₅₀	11.48 \pm 2.69	12.69 \pm 2.53	13.00 \pm 2.09
Tratamento CE ₅₀ + Alteração de pH5	11.71 \pm 1.97	11.69 \pm 2.46	11.99 \pm 2.26
Controle Negativo	12.10 \pm 1.97	13.06 \pm 1.97	13.76 \pm 1.94
Controle de pH6	13.37 \pm 1.82	13.53 \pm 1.74	13.11 \pm 2.48
Tratamento CE ₅₀	11.73 \pm 2.04	12.55 \pm 2.40	12.72 \pm 2.33
Tratamento CE ₅₀ + Alteração de pH6	11.33 \pm 2.47	11.83 \pm 2.54	11.93 \pm 2.37
Controle Negativo	14.76 \pm 2.06	14.82 \pm 2.40	15.89 \pm 2.18
Controle de pH8	11.82 \pm 2.22	14.83 \pm 2.72	15.55 \pm 3.22
Tratamento CE ₅₀	13.33 \pm 2.50	14.57 \pm 1.79	13.68 \pm 2.30
Tratamento CE ₅₀ + Alteração de pH8	13.25 \pm 1.88	14.05 \pm 1.70	13.84 \pm 3.23
	Largura celular (μm) – 24°C		
	24h	48h	72h
Controle Negativo	4.78 \pm 1.36	4.69 \pm	4.69 \pm 1.53
Controle de pH5	5.46 \pm 0.88*	6.01 \pm 1.00*	6.39 \pm 1.00*
Tratamento CE ₅₀	4.97 \pm 1.33	4.87 \pm 1.38	4.69 \pm 1.47
Tratamento CE ₅₀ + Alteração de pH5	4.97 \pm 0.93	4.68 \pm 1.25	4.31 \pm 1.19
Controle Negativo	4.66 \pm 1.12	4.49 \pm 1.00	5.12 \pm 1.12
Controle de pH6	5.48 \pm 1.21	5.66 \pm 1.02	5.16 \pm 1.51
Tratamento CE ₅₀	4.74 \pm 1.24	4.76 \pm 1.34	4.98 \pm 1.24
Tratamento CE ₅₀ + Alteração de pH6	4.56 \pm 1.32	4.44 \pm 1.41	4.67 \pm 1.22
Controle Negativo	5.31 \pm 0.99	6.14 \pm 1.13	6.08 \pm 1.68
Controle de pH8	5.09 \pm 1.00	5.84 \pm 1.63	6.61 \pm 1.65
Tratamento CE ₅₀	5.32 \pm 1.65	5.85 \pm 0.98	5.28 \pm 1.19
Tratamento CE ₅₀ + Alteração de pH8	5.48 \pm 1.12	5.79 \pm 0.84	5.37 \pm 1.80

Figura 6 – Dimensões celulares em três períodos (24h, 48h e 72h) a 17 °C.

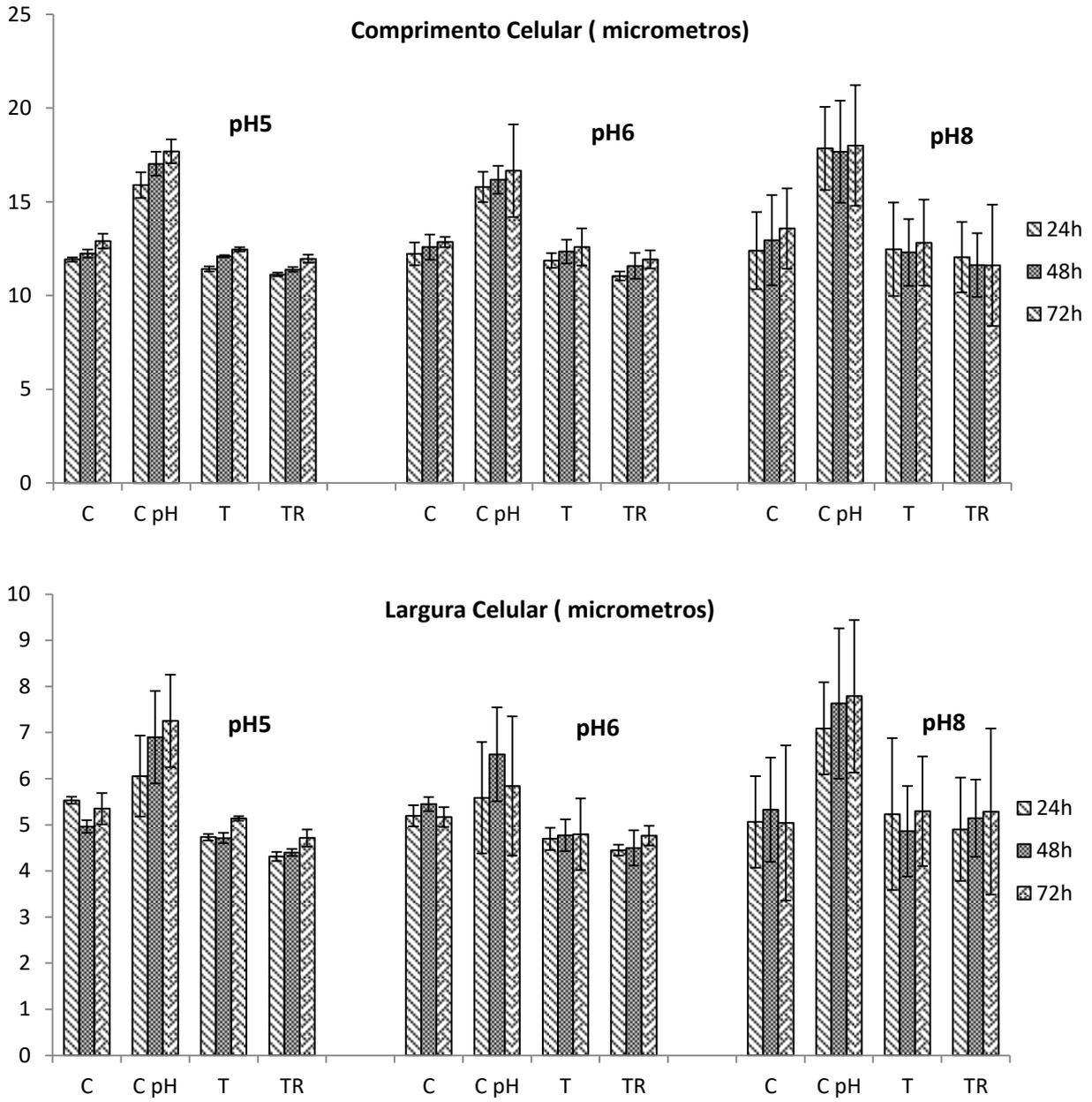
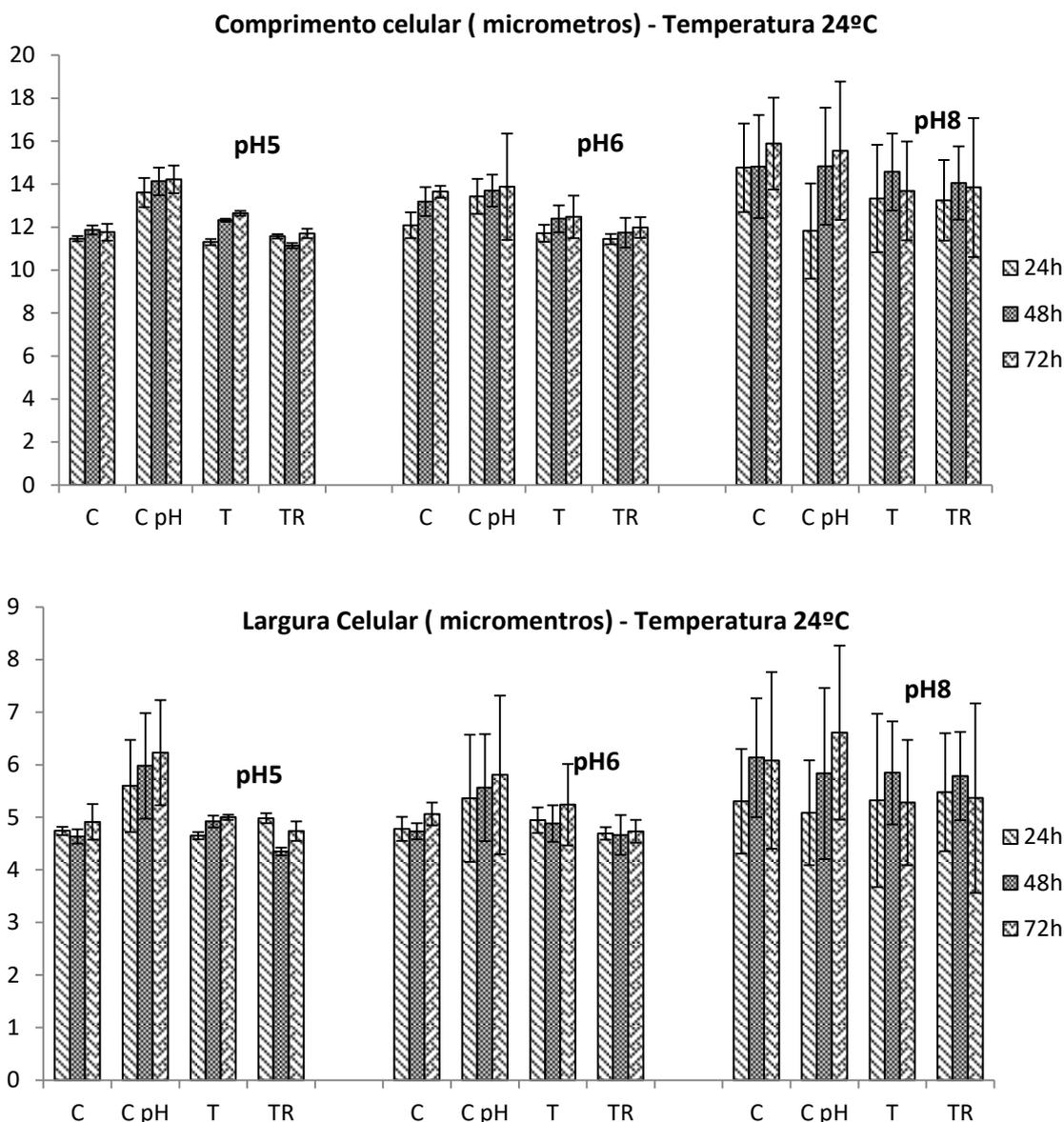


Figura 7 – Dimensões celulares em três períodos (24h, 48h e 72h) a 24 °C.



5.3. BIOVOLUME

Com o resultado das medidas de comprimento e largura das células foi calculado o volume celular para cada grupo e período dos ensaios. O valor obtido na medição foi multiplicado pelo valor obtido na contagem da densidade celular para cada grupo correspondente, determinando assim o biovolume do grupo controle, ambos os grupos tratados com acrilamida e sua variação de temperatura. Os resultados estão expressos nas tabelas a seguir.

	24 h	48 h	72 h	Tabela 3 – Média ± desvio padrão do biovolume celular ($\mu\text{m}^3 \cdot \text{ml}^{-1}$) da <i>D. quadricauda</i> durante as 72 horas
Controle Negativo	4551425.87 ± 754256.84	5285536.39 ± 842925.19	39425409.99 ± 30121776.43	
Controle de pH5	26482993.67 ± 6251119.54	53452711.35 ± 5663524.27	834662320.4 ± 160319310.1	
Tratamento	2676647.95 ± 350410.54	4103611.25 ± 574882.95	7549722.55 ± 1109251.51	
Tratamento + pH5	2258833.76 ± 325475.56*	3299707.59 ± 421458*	7078110.38 ± 1519793*	
Controle Negativo	23608601.07 ± 11560178.62	65919341.61 ± 8122401	163511421.36 ± 125168342.77	
Controle de pH6	4892402.445 ± 725751.3556	26319057.15 ± 4039898.861	220714910.7 ± 33303998	
Tratamento	11451500.25 ± 1959236.64	15523779.12 ± 2674758.27	34734522.38 ± 6090456.97	
Tratamento + pH6	8764283.89 ± 1554953.03*	12576668.60 ± 1961443.53*	27667750.49 ± 4208583.97*	
Controle Negativo	16454602.87 ± 3538735.37	27767458.31 ± 4124644.12	143347223.89 ± 103524964.52	
Controle de pH8	50227814.61 ± 6773537.223	66467109.69 ± 7593051.336	136677197.4 ± 20460683.53	
Tratamento	14547890.35 ± 1840094.42	15764949.70 ± 2110633.80	27917234.49 ± 4624886.52	
Tratamento + pH8	12206369.84 ± 1967816.62*	15654364.56 ± 2046039.17*	35510046.58 ± 5042976.49*	

de exposição a acrilamida a 17 °C.

* Não indica diferença significativa ($p < 0,05$) comparado com o grupo tratado apenas com 5,88mg/L de acrilamida.

Observou-se que houve diferença significativa nos períodos de 24, 48 e 72 horas em todos os grupos quando testados em temperatura de 17 °C e 24 °C. É possível notar que o grupo considerado como controle de pH demonstrou um maior volume em comparação ao grupo controle e aos tratamentos com acrilamida, analisando o grupo controle de pH separadamente dos demais. Entretanto, os resultados estatísticos não apontam diferenças significativas ao comparar o mesmo grupo controle de pH com ambos os grupos expostos a acrilamida.

Já nos experimentos realizados em temperatura elevada a 24°C (Tabela 4), o grupo controle de pH apresentou diferenças ($p < 0,05$) comparado com o grupo tratado com 5,88 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ de acrilamida e com o grupo tratado com 5,88 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ de acrilamida e alteração de pH. Os demais grupos não apresentaram significância estatística na comparação entre si.

Separadamente nota-se que em relação aos grupos controles apresentaram volume maior que os grupos tratados, sendo o grupo controle com o maior valor do que o grupo controle de pH em temperatura a 24 °C. Tal dado apresenta resultado contrário ao encontrado na temperatura mais baixa, indicando que a temperatura pode influenciar no volume celular.

Os grupos de tratamento com acrilamida demonstram um volume menor que dos controles e apontam que entre grupos tratados, o tratamento com acrilamida e variação de pH manteve-se com valores maiores que o grupo apenas exposto a substância nos períodos de 24 e 48 horas no com pH 6 e no período de 24 horas no grupo de tratamento com pH 8. Após os referidos períodos, o grupo apenas com acrilamida, manteve-se com valores superiores apesar do aumento na densidade celular.

Tabela 4 – Média ± desvio padrão do biovolume celular ($\mu\text{m}^3 \cdot \text{ml}^{-1}$) da *D. quadricauda* durante durante as 72 horas de exposição a acrilamida a 24°C

Biovolume celular ($\mu\text{m}^3 \cdot \text{ml}^{-1}$)

	24 h	48 h	72 h
Controle Negativo	9912436.38 ± 1319564.90	17891054.97 ± 4078644.37	115322552.49 ± 72560127.95
Controle de pH5	22444886 ± 3803267.23*	36011440 ± 7246534.38*	430574243 ± 109964775.8*
Tratamento	8524687.59 ± 1328380.77	15826747.27 ± 2074206.10	32107545.41 ± 4865407.76
Tratamento + pH5	8959715.48 ± 1269268.52	6058119.10 ± 4343383.43	26921242.97 ± 4242929.71
Controle Negativo	15372379.81 ± 5488000.94	24022199.37 ± 6258724.69	116625123.18 ± 104929725.25
Controle de pH6	19673798.9 ± 5366055.66	28022243.8 ± 4558308.58	416908610 ± 3811305
Tratamento	10343429.00 ± 2495872.42	18394605.98 ± 4318317.58	31109195.02 ± 11348471.19
Tratamento + pH6	7782324.70 ± 1172792.83	15107547.25 ± 4192904.89	20331958.74 ± 5268801.94
Controle Negativo	23674542.99 ± 0933136.40	46023350.47 ± 12021822.16	290013520.89 ± 70721554.95
Controle de pH8	18266433.05 ± 4048582.43	56461749.36 ± 7143823.76	83772522.23 ± 18862433.1
Tratamento	15652662.89 ± 2629200.01	29853618.34 ± 13071365.29	40754507.77 ± 21342499.99
Tratamento + pH8	17533107.38 ± 8246669.00*	21263551.89 ± 5852922.10*	40393997.26 ± 25402130.65*

* Indica diferença significativa ($p < 0,05$) comparado com o grupo tratado com 5,88mg/L de acrilamida e com o grupo tratado com 5,88mg/L de acrilamida e alteração de pH.

Realizando as comparações entre experimentos a fim de verificar a influência da temperatura no volume celular, os dados estatísticos não apontaram diferenciação, ou seja, mesmo ocorrendo um aumento no número de células o biovolume não variou devido a temperatura e sim a exposição da acrilamida e as alteração do valor do pH. Desta forma, constata-se que os dois fatores testados (temperatura e alteração de pH) e a exposição à acrilamida não interferem apenas no crescimento celular, mas também no volume das células algais, e conseqüentemente, interferindo em seu volume.

5.4. PLASTICIDADE FENOTÍPICA

O efeito morfológico da acrilamida, temperatura e pH na microalga foi avaliado pela porcentagem do número de células por cenóbio encontrado em cada tratamento durante as contagens microscópicas para a avaliação da densidade celular.

A análise estatística foi realizada com cada expressão fenotípica em cada etapa dos testes bem como a relação porcentual entre grupos tratados e controles.

Nos testes realizados com a temperatura de 17 °C, os cenóbios de quatro células apresentaram uma homogeneidade porcentual relacionado os grupos controles com os grupos tratados com acrilamida, não apresentando diferença significativa ($p < 0,05$). Os resultados individuais demonstram que no período de 24 horas os testes realizados com o pH 8, a porcentagem de cenóbios de quatro células foi menor que comparado com os grupos do pH 6 e 5. Nos outros períodos (48 e 72h) os resultados também apresentaram a mesma tendência comparado aos outros grupos de pH.

Os cenóbios de duas células apresentaram uma maior diferença de porcentagem em ambos os grupos tratados com acrilamida nos pH 5 e 8 no período de 24 horas, nos pH 6 e 8 no período de 48 horas e nos pH 6 e 8 no período de 72 horas. Comparando os grupos controles, as porcentagens apresentaram maior alteração no período de 72 horas nos pH 5 e 8.

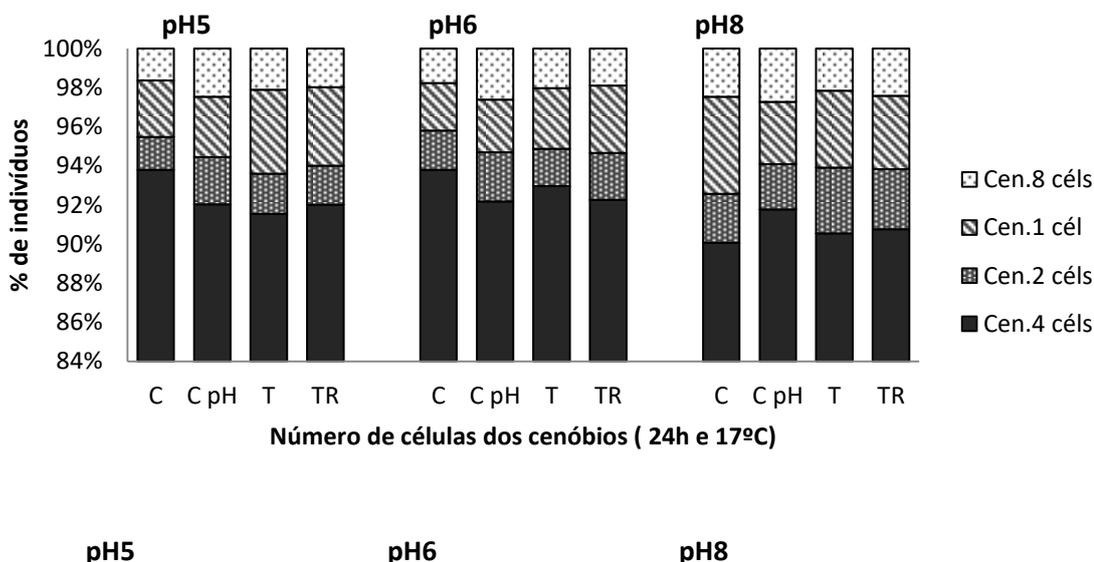
A maior alteração fenotípica foi encontrada nos cenóbios de uma célula, que prevaleceu maior no grupo tratado com acrilamida e alteração de pH em praticamente todos os períodos. Nos grupos controles não houve variação significativa durante as três etapas experimentais a 17°C.

Analisando os cenóbios de oito células, não houve resultados estatísticos significativos nos grupos testados em relação ao número de indivíduos, porém a relação dos grupos expostos a acrilamida, apresenta um aumento de cenóbios no grupo com alteração de pH 8 no período de 24 e 72 horas e uma diminuição nos outros três períodos experimentais e nos grupos com alteração de pH 5 e 6.

Esses resultados presumem que o pH 8 e a exposição da acrilamida induz uma alteração das expressões fenotípicas dos cenóbios de quatro células para cenóbios de oito, duas e uma célula.

A figura 8 e 9 demonstram os resultados obtidos entre os tratamentos avaliados.

Figura 8 – Porcentagem celular da *D. quadricauda* das expressões fenotípicas encontradas em todos os grupos nos períodos de 24, 48 e 72h a 17 °C.



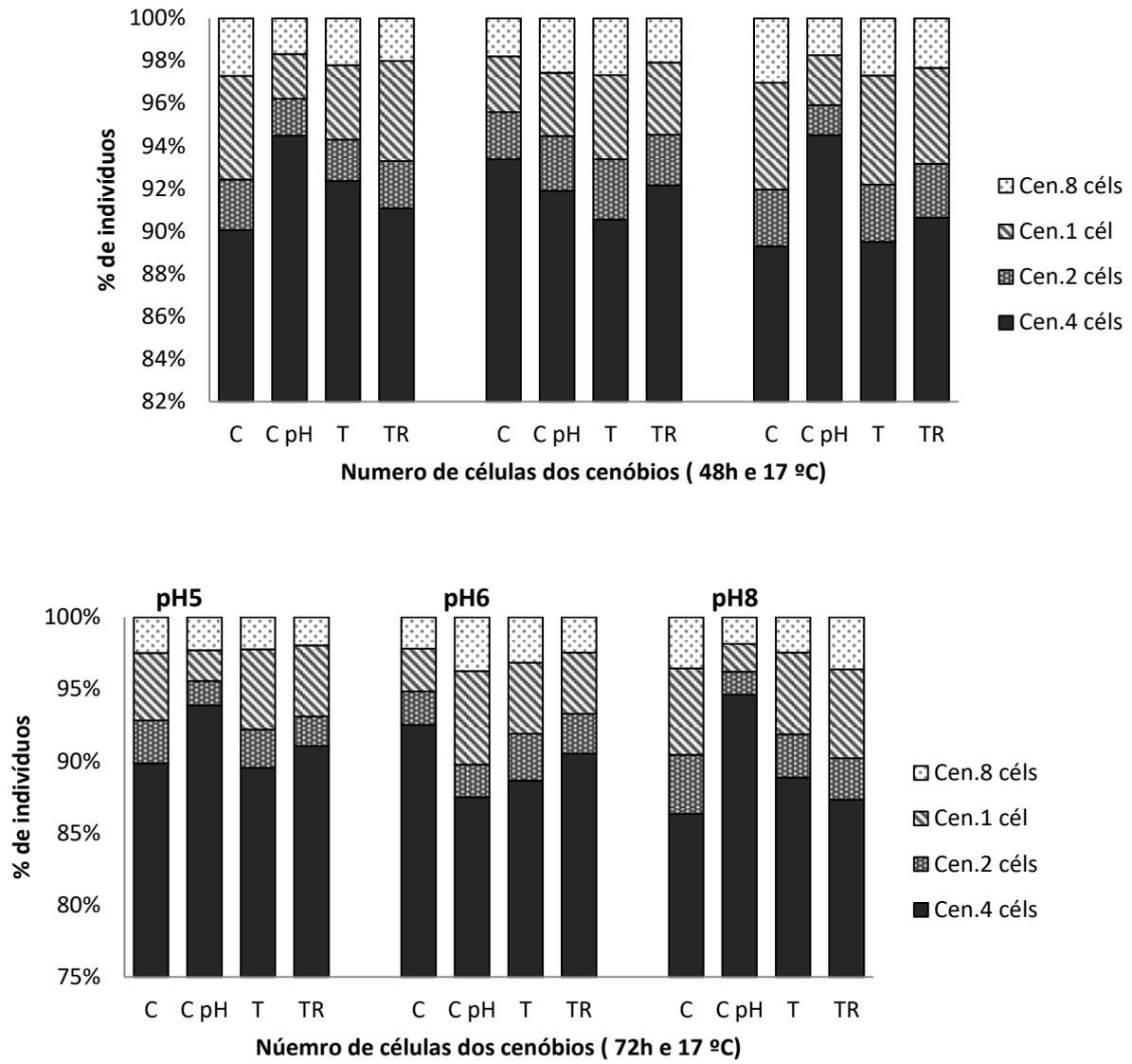
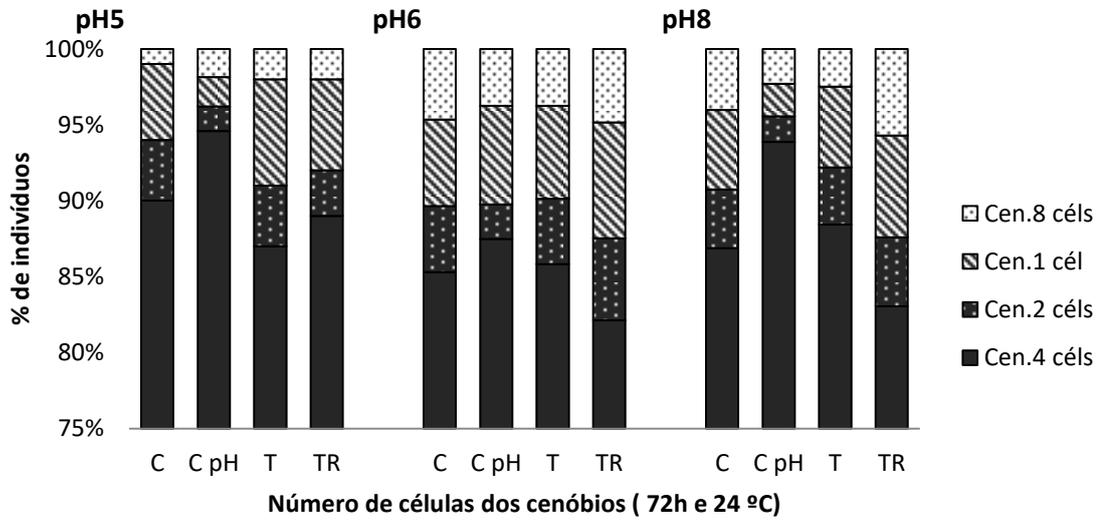
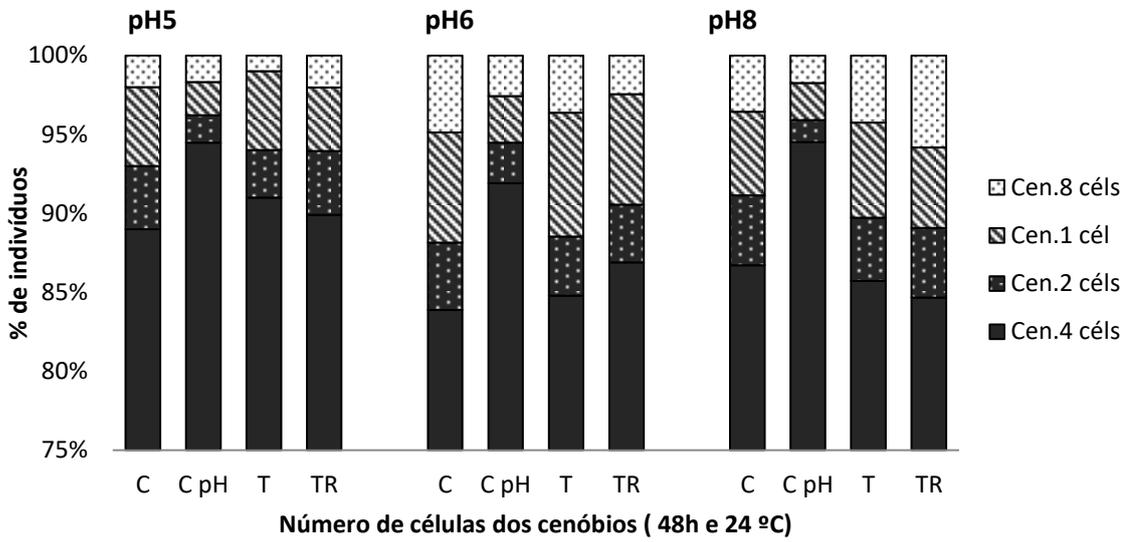
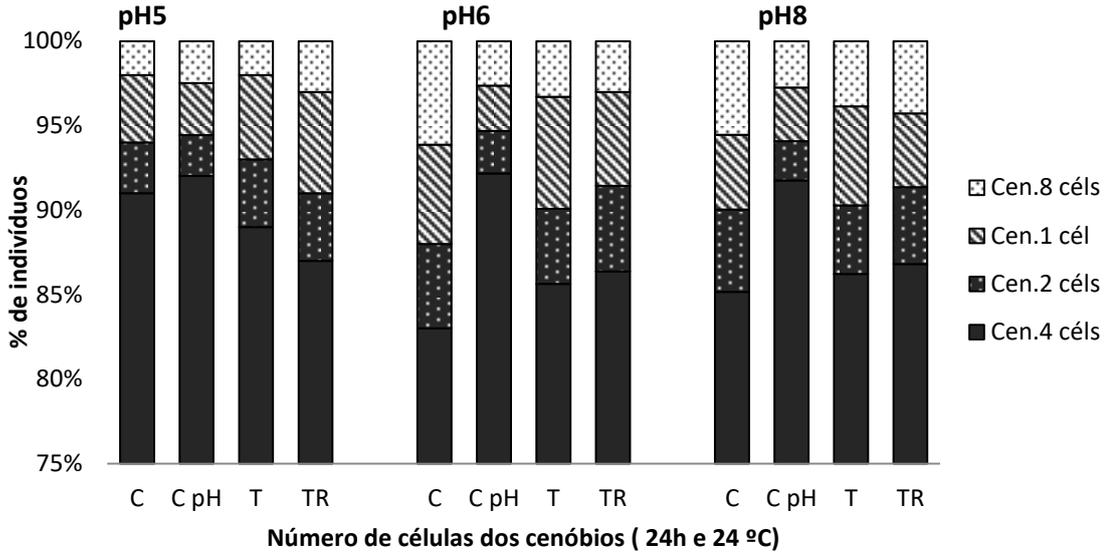


Figura 9 – Porcentagem celular da *D. quadricauda* das expressões fenotípicas encontradas em todos os grupos nos períodos de 48 e 72h a 24 °C.



Os resultados apresentados na figura 9, indicam que a porcentagem de cenóbios de quatro células permaneceu elevada em comparação aos outros tipos morfológicos encontrados no período de 24 horas, sendo possível visualizar uma maior porcentagem no grupo considerado controle de pH. Tais resultados repetem-se nos demais períodos testados.

A formação de cenóbios de duas células apresentou pouca representatividade nos controles e em grupos tratados com acrilamida também não apresentou resultados significativos.

Nos cenóbios unicelulares a variação de porcentagem de indivíduos foi maior que nas outras formações. Nos testes com variação de pH os resultados apresentam significância ($p < 0.05$) considerando os grupos controle, tratamento com acrilamida e tratamento com acrilamida de variação de pH em todo período do experimento. Já a formação de cenóbios de oito células apresentou baixos valores nos grupos com pH5 mas elevadas porcentagens nos pH 8 e pH 6 no período de 72 horas e comparados com as demais tratamentos.

Lurling (2003) e Chia (2014) indicam após estudos que a temperatura e a exposição de substâncias tóxicas afetam a estrutura do cenóbio dos gêneros *Scenedesmus* e *Desmodesmus*, reduzindo o número de células por cenóbio, o que significa que ele pode ser considerado um biomarcador importante para ensaios de toxicidade.

6. CONCLUSÃO

Os resultados desta pesquisa indicam que fatores abióticos, como a variação de temperatura e alteração dos valores de pH, juntamente com a toxicidade da acrilamida afetam diretamente o desenvolvimento das células da microalga *Desmodesmus quadricauda*. A exposição à acrilamida e a simulação de estresse ambiental, causaram um aumento na densidade celular nos grupos tratados

com 5,88 mg.L⁻¹ de acrilamida na temperatura 17 °C e diminuição de células em temperaturas elevadas (24 °C) e com pH 6 e 8, indicando uma maior toxicidade da acrilamida a 24 °C.

As modificações da porcentagem relacionada à plasticidade fenotípica e os valores obtidos na análise do biovolume indicam que temperatura não apresentou influencia nestes quesitos avaliados, apenas a exposição à acrilamida e a alteração do pH foram fatores que alteram a morfologia e volume celular. As dimensões celulares tiveram alterações tanto em comprimento quanto largura em ambas as temperaturas e nas variações de pH.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS - **NBR 13373**. Ecotoxicologia Aquática – Toxicidade crônica – Método de ensaio com algas (Chlorophyceae). Rio de Janeiro: ABNT 2005.

American Public Health Association - Standard Methods of the examination of water and freshwater. 20^a ed. Washington, APHA, 1998.

AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCE AND DISEASE REGISTRY. Toxicological profile for acrylamide: draft for public comment. Atlanta: U.S. Public Health Service; ATSDR 2009.

ARIAS, A.R.L, et al. Utilização de bioindicadores na avaliação de impacto e no monitoramento da contaminação de rios e córregos por agrotóxicos. **Ciência & Saúde Coletiva**. v 12, p. 61-72. 2007.

AZAVEDO, T.L.F, BERTONHA, A., GONÇALVES, A.C.A. Uso de hidrogel na agricultura. **Revista do Programa de Ciências Agro-Ambientais**, Alta Floresta, v.1, n.1, p.23-31, 2002.

BECKER, E. W. Microalgae: biotechnology and microbiology. **Cambridge University Press**, 1995.

BERENGUEL, M. et al. Model predictive control of pH in tubular photobioreactors. **Journal of Process Control**. n.14. p.377-387. 2004.

BILA, D. M.; DEZOTTI, M. Desreguladores endócrinos no meio ambiente: efeitos e conseqüências. **Química Nova**, São Paulo, v.30, p.651-666, 2007.

BRAGA, B. et al. *Introdução a Engenharia Ambiental*. Editora Prentice-Hall, 2012.

BRASIL. **Portaria nº 2914 de 12 de dezembro de 2011**. Estabelece os procedimentos e responsabilidades relativos ao controle e vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade, e dá outras providências. Publicada Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, p. 26, 14 dez. 2011.

BROWN, L, et al. Case studies of acrylamide pollution resulting from industrial use of acrylamides. **Water Pollution Control** . v. 79, n. 4, p. 507-510, 1980.

BROWN, L., et al. Model studies of the degradation of acrylamide monomer. **Water Research** v.14, n.7, p.775-778, 1980.

CAULFIELD J. M., HAO X., QIAO G. G., SOLOMON D. H. Degradation on polyacrylamides. Part I. Linear polyacrylamide. **Polymer**, v. 44, p.1331–1337, 2003.

CESAR, R. et al. Biodisponibilidade de contaminantes em solos brasileiros tratados com lodo de esgoto: uma abordagem ecotoxicológica utilizando bioensaios com organismos aquáticos e edáficos. **Geochimica Brasiliensis**. v 24, n 1, p 41-49, 2010.

CHALIFOUR A; JANEAU P. Temperature-dependent sensitivity of growth and photosynthesis of *Senedesmus obliquus*, *Navicula pelliculosa* and two strains of *Microcystis aeruginosa* to herbicide atrazine. **Aquat. toxicol.** v.103, p. 9-17, 2011.

CHIA, M. A.,MUSA, R. I. Effect of indigo dye effluent on the growth, biomass production and phenotypic plasticity of *Scenedesmus quadricauda* (Chlorococcales). **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v.86, p. 419-428, 2014.

CONWAY, E. J. et al. Assessment of the need for and character of limitations on acrylamide and its compounds, Washington DC, US Environmental Protection Agency. (Report prepared for the Office of Pesticides and Toxic Substances,). 1979.

COSTA, C.R. et al. A toxicidade em ambientes aquáticos: discussão e métodos de avaliação. **Quim. Nova**, v. 31, n. 7, p. 1820-1830, 2008.

CROLL, B. T. et al. Residues of acrylamide in water. **Water Resource**. v.8, n.11, p. 989-993, 1974.

ENTRY, J.A., SOJKA, R.E., HICKS, B.J., *Geoderma*, n.145, p8-16. 2008.

EXON, J. H. A review of the toxicology of acrylamide. **Journal of Toxicology and Environmental Health** (2006) v.9. p397, 2006.

FAO (Food and Agriculture Organization), WHO (World Health Organization). FAO/WHO Consultation on the Health Implications of Acrylamide in Food. Summary Report, p.25-27. Junho de 2002. Geneva: WHO. Disponível em: <http://www.who.int/fsf/Acrylamide>. Acesso em: 20 jun. 2014.

FÉLIX, A. M. T. (2007). **Fichas toxicológicas. Departamento de Saúde Pública e Planejamento.** p. 50.

GRESSLER, P.D. Avaliação da eficiência de *Desmodesmus subspicatus* (r.chodat) e hegewald & a.schmidt (chlorophyceae) cultivada em fotobiorreator tubular com efluente da ETE-UNISC, visando biorremediação e obtenção de energia. 2011.130 f. Dissertação (Curso de Pós-Graduação em Tecnologia Ambiental: Gestão e Tecnologia Ambiental) - Universidade de Santa Cruz do Sul, Santa Cruz do Sul, 2011.

GUILLARD, R. R. L., LORENZEN, C. J. Yellow-green algae with chlorophyllide **Journal of Phycology**. n. 8, p. 10-14, 1972.

GUIMARÃES, A.S.G. Síntese e caracterização de hidrogéis superabsorventes à base de acrilamida e acrilato de sódio. 2009. 206f. Tese (Curso de Pós-Graduação em Química)- Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2009.

HILLEDRAND, H. *et al.* Biovolume Calculation for Pelagic and Benthic Microalgae. **J. Phycol.** n. 35, p. 403–424, 1999.

International Agency for Research on Cancer (**IARC**) Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans, v. 60, Acrylamide. Lyon, França, p. 389-433, 1999.

KAPP, C. Who urges more research into acrylamide in food. **The Lancet**, v. 360, p. 64, 2002.

LEVY, J. *et al.* Toxicity, biotransformation, and mode of action of arsenic in two freshwater microalgae (*Chlorella* sp. and *Monoraphidium arcuatum*). **Environmental Toxicology & Chemistry**, v.24, p. 2630-2639, 2005.

LOURENÇO, S. O. **Cultivo de microalgas marinhas – princípios e aplicações.** São Carlos: RiMa, 2006.

LOMBARDI, A.T. Toxicity of ionic copper to the freshwater microalga *Scenedesmus acuminatus* (Chlorophyceae, Chlorococcales). **Phycologia** .v 46 , p.74–78, 2007.

LÜRLING M.; BEEKMAN W. — Grazer-induced defenses in *Scenedesmus* (Chlorococcales ; Chlorophyceae) : coenobium and spine formation. **Phycologia**, v. 38, p. 368-376, 1999.

LÜRLING, M. F. L. L. W. Phenotypic plasticity in the green algae *Desmodesmus* and *Scenedesmus* with special reference to the induction of defensive morphology. **Annales de Limnologie-International Journal of Limnology**. v.39. EDP Sciences, 2003.

MAGALHÃES, D. DE P.; FILHO, A. DA S. F. A ecotoxicologia como ferramenta no biomonitoramento de ecossistemas aquáticos. **Oecol. Bras.** v. 12, n. 3, p 355-381, 2008.

MAYASICH JM, *et al.* Grow response of *Nannochloris oculata* Droop ad *Phaeodactylum tricornutum* Bohlin to the herbicide atrazine as influenced by light intensity and temperature. **Aquat toxicol.** v.8, p.175-184, 1986.

- MAXAM, G., RILA, J., DOTT, W., EISENTRAEGER, A. Use of bioassays for assessment of water-extractable ecotoxic potential of soils. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, n.45, p. 240-246.
- NEWSTED, J. Effect of light, temperature, and pH on the accumulation of phenol by *Selenastrum capricornutum*, a green alga. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.59, p.237-243, 2001.
- NISHIDA, I. & MURATA, N. Chilling sensitivity in plants and cyanobacteria: the crucial contribution of membrane lipids. **Annu. Rev. Plant Physiol., Plant Mol. Biol.**, v. 47, p. 541–68. 1996.
- NUNES, B.W. Análise ecotoxicológica a acrilamida utilizando uma microalga como organismo indicador. 2014. 105 f. Dissertação (Curso de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental: Recursos Hídricos e Tecnologias Ambientais) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2014.
- OEDC/OCDE. (2011). Freshwater Alga and Cyanobacteria, Growth Inhibition Test. OECD Guidelines for testing of chemicals.
- OUKARROUM, A., POLCHTCHIKOV, S., PERREAULT, F., POPOVIC, R. Temperature influence on silver nanoparticles inhibitory effect on photosystem II photochemistry in two green algae, *Chorella vulgaris* and *Dunaliella tertiolecta*. **Environ Sci Pollut Res Int**. v 19, p 1755-1762, 2012.
- PAULSSON, B. et al. The Multiplicative Model for Cancer Risk Assessment: Applicability to Acrylamide. **Carcinogenesis**, v. 22, n. 5, p. 817-819, 2002.
- PÁDUA, V. L. D., & FERREIRA, A. C. D. S. Qualidade da água para consumo humano. **Abastecimento de água para consumo humano**. Belo Horizonte: Editora UFMG, 2006.
- PEÑA-CASTRO, et. al. Heavy metals removal by the microalga *Scenedesmus incrassulatus* in continuous cultures. **Bioresource Technology**. v.94. p.219-222, 2004.
- PIMENTEL, C. **A relação da planta com a água**. Rio de Janeiro: Saropédica: 2004.
- QUIAN, H, et al. Photoperiod and temperature influence cadmium's effects on photosynthesis-related gene transcription in *Chorella vulgaris*. **Ecotoxicol Environ Saf**. v. 76, p. 1202-1206, 2010.
- REBOUÇAS, A.C. Água e desenvolvimento rural. **Estudos Avançados**, v.15, n.43, p.327-344, 2001.
- RICHMOND, A. **Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology**. Oxford: Blackwell Science, 2004.
- Scientific Committee on Food (**SCF**). European Commission. Opinion of the Scientific Committee on Food on New Findings Regarding the Presence of Acrylamide in Food. 2002. Disponível em: <http://www.europa.eu.int>. Acesso em: 8 ago 2015.
- SILVA, D.J.; ARAÚJO, C.A.S. Agricultura irrigada: a importância da adubação. **Embrapa**. 2002.
- SMITH, E. A.; OEHME, F. W. Rapid direct analysis of acrylamide residue in polyacrylamide thickening agents by HPLC. **Journal of Chromatographic Science**. p. 31-192, 1993.
- SMITH, E. A.; et al. Environmental degradation of polyacrylamides I. Effects of artificial environmental conditions: temperature, light and pH. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. p.35-121, 1996.

U.S. Environmental Protection Agency (**U.S. EPA**). Integrated Risk Information System (IRIS) Online. Coversheet for Acrylamide. In: Office of Health and Environmental Assessment, U.S. EPA, Cincinnati; 1994.

TASMIN, R. et al. Elevated water temperature reduces the acute toxicity of the widely used herbicide diuron to a green alga, *Pseudokirchneriella subcapitata*. **Eviron. Sci. Pollut Res.** v. 21, p.1064-1070, 2014.

TAREKE, E. et al. Analysis of acrylamide, a carcinogen formed in heated foodstuffs. **Journal of Agricultural Food Chemistry.** v. 50, n.17, p.4998-5006, 2002.

TERRY R.E., NELSON S.D. Effects of PAM and irrigation methods on soil physical properties, **Soil Science**, v. 141, p. 317-320, 1986.

THOMPSON, JR. G. A. *Lipids and membrane function in green algae*. **Biochem. Biophys. Acta**, v. 1302, p.17–45. 1996.

VER VERS, L.M. Determination of acrylamide monomer in polyacrylamide degradation studies by high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatographic Science.** p. 37-486. 1999.

VIEIRA, L.R; L. GUILHERMINO . Multiple stress effects on marine planktonic organisms: Influence of temperature on the toxicity of polycyclic aromatic hydrocarbons to *Tetraselmis chuii*. **Journal of Sea Research**, v. 72, p.94-98, 2012.

VIDOTTI, E.C; ROLLEMBERG, M, C, E. Algas: da economia nos ambientes aquáticos à bioremediação e à química analítica. **Quim. Nova**, v. 27, n. 1, p.139-145, 2004.