

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO – MESTRADO EM TECNOLOGIA
AMBIENTAL**

ÁREA DE CONCENTRAÇÃO EM GESTÃO E TECNOLOGIA AMBIENTAL

Leticia Weis

**EMPREGO DE MICROALGAS PARA REMOÇÃO DOS INSETICIDAS
BIFENTRINA E IMIDACLOPRIDO EM ÁGUAS**

Santa Cruz do Sul

2018

Leticia Weis

**EMPREGO DE MICROALGAS PARA REMOÇÃO DOS INSETICIDAS
BIFENTRINA E IMIDACLOPRIDO EM ÁGUAS**

Esta dissertação foi submetida ao Programa de Pós-Graduação – Mestrado em Tecnologia Ambiental, Área de Concentração em Gestão e Tecnologia Ambiental, Universidade de Santa Cruz do Sul – UNISC, para a obtenção do título de Mestre em Tecnologia Ambiental.

Orientadora: Prof. Dra. Michele Hoeltz

Co-orientadora: Prof. Dra. Rosana de
Cassia de Souza Schneider

Santa Cruz do Sul

2018

Leticia Weis

**EMPREGO DE MICROALGAS PARA REMOÇÃO DOS INSETICIDAS
BIFENTRINA E IMIDACLOPRIDO EM ÁGUAS**

Esta dissertação foi submetida ao Programa de Pós-Graduação – Mestrado em Tecnologia Ambiental, Área de Concentração em Gestão e Tecnologia Ambiental, Universidade de Santa Cruz do Sul – UNISC, como requisito parcial para a obtenção do título.

Dr. Fábio de Farias Neves

Professor Examinador – UDESC (Laguna)

Dra. Lisianne Brittes Benitez

Professor Examinador – UNISC

Dra. Michele Hoeltz

Professora Orientadora – UNISC

Dra. Rosana de Cassia de Souza Schneider

Professora Co-orientadora – UNISC

Santa Cruz do Sul

2018

Dedico este trabalho aos meus pais Mauro e Rosângela.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por estar sempre ao meu lado e tornar tudo possível.

Aos meus pais, Mauro e Rosângela, que sempre estiveram do meu lado me apoiando. Que nunca me deixaram desistir e que me ensinaram que precisamos lutar e trabalhar bastante para realizar os nossos sonhos.

Ao meu namorado Alex, por me dar força e incentivo em todos os momentos difíceis e sempre acreditar no meu potencial.

As professoras Michele Hoeltz e Rosana de Cassia de Souza Schneider, que com sua dedicação, competência e profissionalismo, me ajudaram na elaboração e construção deste trabalho.

À querida colega e hoje amiga Valéria Leal. Uma das coisas boas que o mestrado me trouxe foi ter conhecido você. Obrigada por todos os ensinamentos, conversas e companhia.

Aos colegas da turma de PPGTA 2016 e 2017. Com muito orgulho posso dizer que fiz parte das duas turmas.

Aos colegas e funcionários do Departamento de Química e CEPPOB, Michele Rodrigues, Jocelene Soares, Maiara Souza, Martiele Bizarro, Francesca Fornasier, Gisele Alves e Laura Costa.

À empresa pela liberação de meio turno durante 2 ano para conclusão das disciplinas do PPGTA.

A todos os professores e funcionários do PPGTA pelo auxílio e conhecimentos transmitidos.

À CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela bolsa cedida para o Mestrado em Tecnologia Ambiental da UNISC.

A todos os meus amigos e colegas, que de alguma forma, me ajudaram e contribuíram para a realização deste trabalho.

“If you can dream it, you can do it.”

Walt Disney

RESUMO

A acumulação de agrotóxicos no ambiente pode causar problemas aos ecossistemas aquáticos e causar efeitos adversos para o ser humano e ao meio ambiente. Estes compostos podem ser encontrados na água devido ao escoamento, quando aplicados na agricultura e em usos industriais e domésticos. Bifentrina e imidacloprido foram estudados devido ao seu grau de toxicidade (grau II) em relação aos organismos e ambiente e ao uso na cultura do tabaco. A fitorremediação foi proposta como uma alternativa ambiental para a remediação de recursos de água contaminados com esses inseticidas. As microalgas foram reproduzidas a partir do reservatório de água doce da cidade de Santa Cruz do Sul (Lago Dourado). Para tanto, foram avaliados processos de biodegradação, bioabsorção, influência do pH, percentual de inóculo e fotoperíodo em experimentos realizados em bancada durante 20 dias de cultivo. Após o processo de fitorremediação, o inseticida bifentrina ($m/z = 181$) foi quantificado por CG-EM e o imidacloprido usando CLAE-DAD ($\lambda = 270 \text{ nm}$). As microalgas reproduzidas a partir da água do lago foram capazes de auxiliar a remoção de aproximadamente 99% de bifentrina e 26% de imidacloprido, através dos processos de biodegradação e bioabsorção. Para bifentrina a melhor condição de fitorremediação foi 20% de inóculo e fotoperíodo 18:6 h e para o imidacloprido, 10% de inóculo e fotoperíodo 12:12 h, ambos sem controle de pH.

Palavras chave: Microalgas, fitorremediação, águas residuais e inseticidas.

ABSTRACT

USAGE OF MICROALGAE FOR REMOVAL OF BIFENTHRIN AND IMIDACLOPRID IN WATER

The accumulation of pesticides in the environment and can cause problems to aquatic ecosystems and also cause adverse effects for humans and the environment. These compounds can be found in water due to runoff when used in agriculture, industrial and domestic applications. Bifenthrin and imidacloprid were studied due to their toxicity degree (degree II) in relation to the environment and organisms and also in its use in tobacco culture. The phycoremediation was proposed as an environmental alternative for the remediation of water courses contaminated with insecticides. The microalgae were reproduced from Santa Cruz do Sul's water reservoir (Lago Dourado). For that, the biodegradation, biosorption, pH influence, inoculum percentage and photoperiod were evaluated in experiments carried out on a batch during 20 days of cultivation. After the phycoremediation process, bifenthrin insecticide ($m/z = 181$) was quantified by GC-MS and imidacloprid using HPLC-DAD ($\lambda = 270$ nm). The microalgae reproduced from the lake's water were capable to aid in the removal of approximately 99% of bifenthrin and 26% of imidacloprid through biodegradation and biosorption processes. For bifenthrin the best phycoremediation condition was 20% of inoculum and photoperiod 18:6 h and for imidacloprid, 10% of inoculum and photoperiod 12:12 hour, both without pH control.

Keywords: Microalgae, phycoremediation, residual waters and insecticides.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estrutura química da bifentrina.	26
Figura 2 – Estrutura química do imidacloprido.	27
Figura 3 – Requerimentos para o crescimento das microalgas [64].	29
Figura 4 – Mapa de localização do Lago Dourado, Santa Cruz do Sul – RS.	39
Figura 5 – Fluxograma esquemático do delineamento da pesquisa para a bifentrina.	40
Figura 6 – Fluxograma esquemático do delineamento da pesquisa para o imidacloprido.	41
Figura 7 – Fotobiorreator do tipo misto, com colunas verticais (A) e tanque aberto (B).	42
Figura 8 – Agitador automático usado como fotobiorreator.	45
Figura 9 – Sistema manifold acoplado a bomba de vácuo.	51
Figura 10 – Espectro de massa do composto bifentrina utilizando $m/z = 181$ e cromatograma, utilizando CG-EM.	53
Figura 11 – Cromatograma e espectro UV do imidacloprido, empregando CLAE-DAD.	56
Figura 12 – Exposição dos filhotes de <i>Daphnia magna</i> as amostras.	58
Figura 13 – Dados médios de incidência de irradiação solar (22 a 29 de agosto de 2016).	60
Figura 14 – Temperaturas médias diurnas (22 a 29 de agosto de 2016).	60
Figura 15 – Identificação morfológica com predominância do gênero <i>Chlorella</i> , aumento de 400x.	61
Figura 16 – Imagem microscópica da microalga <i>Lobochlamys segnis</i>	62
Figura 17 – Imagem microscópica da microalga <i>Parachlorella kessleri</i>	62
Figura 18 – Monitoramento do pH das amostras dos testes preliminares com bifentrina.	66
Figura 19 – Monitoramento do pH do meio das amostras.	67
Figura 20 – Percentual de bifentrina nas amostras com a presença de somente bifentrina.	71
Figura 21 – Percentual de bifentrina nas amostras com presença de microalgas e bifentrina.	73

Figura 22 – Percentual de bifentrina nas amostras com a presença e ausência de microalgas e presença de bifentrina.....	74
Figura 23 – Cromatograma da identificação dos metabólitos formadas a partir da degradação da bifentrina (3 dias de cultivo).....	76
Figura 24 – Diagrama de Pareto dos efeitos das variáveis no total de biomassa (mg L^{-1}) para a bifentrina.	78
Figura 25 – Diagrama de Pareto dos efeitos das variáveis na degradação (%) para a bifentrina.....	79
Figura 26 – Monitoramento do pH dos testes preliminares com imidacloprido.	81
Figura 27 – Diagrama de Pareto dos efeitos das variáveis no total de biomassa (mg L^{-1}) para o imidacloprido.....	83
Figura 28 – Diagrama de Pareto dos efeitos das variáveis na degradação (%) para o imidacloprido.	84
Figura 29 – Diagrama de Pareto dos efeitos das variáveis no percentual de imidacloprido na biomassa.....	85

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Tipos de agrotóxicos comumente utilizados [28].	23
Tabela 2 – Ingrediente ativo usado para produção de agrotóxicos em 2012.	24
Tabela 3 – Propriedades da bifentrina [40].	26
Tabela 4 – Propriedades do imidacloprido [55, 56].	27
Tabela 5 – Perfis metabólicos das microalgas [85, 86].	33
Tabela 6 – Estudos realizados para a remoção de agrotóxicos empregando microalgas.	38
Tabela 7 – Condições otimizadas para os experimentos de fitorremediação.	44
Tabela 8 – Composição dos reatores no estudo preliminar do processo de fitorremediação da bifentrina (5 mg L ⁻¹).	46
Tabela 9 – Composição dos reatores no experimento usando bifentrina com controle de pH.	47
Tabela 10 – Composição dos reatores no estudo preliminar do processo de fitorremediação do imidacloprido.	48
Tabela 11 – Planejamento fatorial dos experimentos.	48
Tabela 12 – Condições instrumentais da análise de bifentrina por CG-EM [111].	52
Tabela 13 – Condições instrumentais da identificação de metabólitos da bifentrina por CG-EM/EM.	54
Tabela 14 – Condições instrumentais da análise de imidacloprido por CLAE-DAD [114].	56
Tabela 15 – Nutrientes remanescentes do meio líquido.	64
Tabela 16 – Total de biomassa e elementos da biomassa.	65
Tabela 17 – Biomassa total e percentual de nutrientes na biomassa.	68
Tabela 18 – Percentual de bifentrina na biomassa.	69
Tabela 19 – Resultados do planejamento fatorial da bifentrina.	77
Tabela 20 – Total de biomassa seca e percentual de imidacloprido encontrado em cada meio.	80
Tabela 21 – Resultados do planejamento fatorial do imidacloprido.	82
Tabela 22 – Mortalidade dos indivíduos de <i>Daphnia magna</i> após 48 h de exposição em bifentrina remanescente do processo de fitorremediação	87

Tabela 23 – Mortalidade dos indivíduos de <i>Daphnia magna</i> após 48 h de exposição em imidacloprido remanescente do processo de fitorremediação.....	88
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AB – amostras com a presença de somente bifentrina (controle)

AB0 – amostras com a presença de somente bifentrina, avaliando a ausência de NPK (controle)

AB1 – amostras com a presença de somente bifentrina, avaliando a presença de NPK (controle)

AB12 – amostras com a presença de somente bifentrina na condição de fotoperíodo 12:12 h (controle)

AB18 – amostras com a presença de somente bifentrina na condição de fotoperíodo 18:6 h (controle)

AB65 – amostras com a presença de somente bifentrina, com ajuste em pH 6,5 (controle)

AB70 – amostras com a presença de somente bifentrina, com ajuste em pH 7,0 (controle)

AB75 – amostras com a presença de somente bifentrina, com ajuste em pH 7,5 (controle)

ABS – amostras com a presença de somente bifentrina, sem ajuste de pH (controle)

AI1 – amostras com a presença de somente imidacloprido (3,5 mg L⁻¹) (controle)

AI12 – amostras com a presença de somente imidacloprido na condição de fotoperíodo 12:12 h (controle)

AI18 – amostras com a presença de somente imidacloprido na condição de fotoperíodo 18:6 h (controle)

AI2 – amostras com a presença de somente imidacloprido (7,0 mg L⁻¹) (controle)

AI3 – amostras com a presença de somente imidacloprido (14,0 mg L⁻¹) (controle)

AI4 – amostras com a presença de somente imidacloprido (21,0 mg L⁻¹) (controle)

AM – amostras com a presença somente de microalgas (branco)

AM1012 – amostras com a presença de somente microalgas (10%) na condição de fotoperíodo 12:12 h (branco)

AM1018 – amostras com a presença de somente microalgas (10%) na condição de fotoperíodo 18:6 h (branco)

AM2012 – amostras com a presença de somente microalgas (20%) na condição de fotoperíodo 12:12 h (branco)

AM2018 – amostras com a presença de somente microalgas (20%) na condição de fotoperíodo 18:6 h (branco)

AMB – amostras com a presença de microalgas e bifentrina

AMB0 – amostras com a presença de microalgas e bifentrina, avaliando a ausência de NPK

AMB1 – amostras com a presença de microalgas e bifentrina, avaliando a presença de NPK

AMB1012 – amostras com a presença de microalgas (10%) e bifentrina na condição de fotoperíodo 12:12 h

AMB1018 – amostras com a presença de microalgas (10%) e bifentrina na condição de fotoperíodo 18:6 h

AMB2012 – amostras com a presença de microalgas (20%) e bifentrina na condição de fotoperíodo 12:12 h

AMB2018 – amostras com a presença de microalgas (20%) e bifentrina na condição de fotoperíodo 18:6 h

AMB65 – amostras com a presença de microalgas e bifentrina, com ajuste em pH 6,5

AMB70 – amostras com a presença de microalgas e bifentrina, com ajuste em pH 7,0

AMB75 – amostras com a presença de microalgas e bifentrina, com ajuste em pH 7,5

AMBS – amostras com a presença de microalgas e bifentrina, sem ajuste de pH

AMI1 – amostras com presença de microalgas e imidacloprido (3,5 mg L⁻¹)

AMI1012 – amostras com a presença de microalgas (10%) e imidacloprido na condição de fotoperíodo 12:12 h;

AMI1018 – amostras com a presença de microalgas (10%) e imidacloprido na condição de fotoperíodo 18:6 h

AMI2 – amostras com presença de microalgas e imidacloprido (7,0 mg L⁻¹)

AMI2012 – amostras com a presença de microalgas (20%) e imidacloprido na condição de fotoperíodo 12:12 h

AMI2018 – amostras com a presença de microalgas (20%) e imidacloprido na condição de fotoperíodo 18:6 h

AMI3 – amostras com presença de microalgas e imidacloprido (14,0 mg L⁻¹)

AMI4 – amostras com presença de microalgas e imidacloprido (21,0 mg L⁻¹)

AT0 – amostra não ficorremediada

AT20 – amostra ficorremediada

CE50 – Concentração de efeito que mata 50% de uma população

CEPPOB – Centro de Excelência de Produtos e Processos Oleoquímicos e Biotecnológicos

CG-EM – Cromatógrafo gasoso com detector espectrômetro de massas

CG-EM/EM – Cromatógrafo gasoso com detector espectrômetro de massas do tipo triplo quadrupolo

CLAE-DAD – Cromatógrafo líquido de alta eficiência com detector arranjo de diodos

CORSAN – Companhia Riograndense de Saneamento

COT – Carbono orgânico total

DNA – Ácido desoxirribonucleico

LED – Diodo emissor de luz

LGD – Lago Dourado, reservatório de água de abastecimento da cidade de Santa Cruz do Sul – RS

LOD – Limite de detecção

LOQ – Limite de quantificação

NIST – Instituto Nacional de Padrões e Tecnologia

OMS – Organização Mundial da Saúde

PCR – Reação em cadeia polimerase

UFC – Unidade formadoras de colônias

UNISC – Universidade de Santa Cruz do Sul

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	19
2.	OBJETIVOS	21
2.1	Objetivo geral.....	21
2.2	Objetivos específicos	21
3.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	22
3.1	Poluição ambiental por agrotóxicos	22
3.1.1	Bifentrina	25
3.1.2	Imidacloprido	27
3.2	Microalgas	28
3.3	Fatores que influenciam o crescimento de microalgas	29
3.3.1	Luminosidade	30
3.3.2	Temperatura	31
3.3.3	Agitação.....	32
3.3.4	Nutrientes	32
3.3.5	pH.....	34
3.3.6	Microbiota de água naturais e interações	34
3.4	Ficorremediação	35
4.	METODOLOGIA.....	39
4.1	Delineamento da pesquisa	39
4.2	Manutenção do inóculo.....	43
4.3	Identificação das microalgas reproduzidas a partir da água do LGD.....	43
4.3.1	Identificação molecular	43
4.4	Estudos de ficorremediação dos inseticidas	44
4.4.1	Condições dos estudos preliminares do processo de ficorremediação	44
4.4.2	Estudo preliminar do processo de ficorremediação de bifentrina	45

4.4.3	Estudo do processo de fitorremediação de bifentrina com controle de pH ..	46
4.4.4	Estudo preliminar do processo de fitorremediação de imidacloprido	47
4.4.5	Planejamento fatorial da fitorremediação de bifentrina e imidacloprido	48
4.5	Análises realizadas	49
4.5.1	Análises preliminares do processo de fitorremediação de bifentrina	49
4.5.2	Determinação de bifentrina na biomassa	50
4.5.3	Determinação de bifentrina retida na parede do reator	50
4.5.4	Extração de bifentrina da fase aquosa utilizando extração em fase sólida...	50
4.5.5	Determinação de bifentrina utilizando cromatografia gasosa acoplado a espectrometria de massas	52
4.5.6	Avaliação da presença de metabólitos no processo de fitorremediação de bifentrina.....	53
4.5.7	Determinação de imidacloprido na biomassa	54
4.5.8	Determinação de imidacloprido retida na parede do reator	55
4.5.9	Determinação de imidacloprido utilizando cromatografia líquida com detector arranjo de diodos.....	55
4.5.10	Determinação do rendimento da biomassa de seca.....	56
4.5.11	Avaliação da toxicidade aguda de amostras com a presença de bifentrina e imidacloprido usando <i>Daphnia magna</i>	57
4.5.12	Quantificação de fungos e bactérias viáveis nos processos de fitorremediação de bifentrina e imidacloprido.....	58
4.6	Análise de dados	59
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	60
5.1	Reprodução das microalgas nativas do LGD.....	60
5.2	Identificação das microalgas reproduzidas a partir da água do LGD	61
5.2.1	Identificação morfológica	61
5.2.2	Identificação molecular	62
5.3	Resultados dos estudos do processo de fitorremediação	63

5.4	Ficorremediação da bifentrina.....	63
5.4.1	Estudo preliminar do processo de ficorremediação de bifentrina	63
5.4.2	Estudo do processo de ficorremediação de bifentrina com controle de pH ..	66
5.4.3	Rendimento de biomassa e percentual de nutrientes remanescentes	67
5.4.4	Teor de bifentrina na biomassa seca.....	69
5.4.5	Teor de bifentrina nas amostras com a presença de somente bifentrina	70
5.4.6	Teor de bifentrina nas amostras com presença de microalgas e bifentrina ..	72
5.4.7	Avaliação de presença de metabólitos no processo de ficorremediação com bifentrina.....	75
5.4.8	Resultados do processo de ficorremediação com planejamento fatorial para bifentrina.....	76
5.5	Ficorremediação do imidacloprido	80
5.5.1	Estudo preliminar do processo de ficorremediação de imidacloprido	80
5.5.2	Resultados do processo de ficorremediação com planejamento fatorial para imidacloprido	82
5.6	Resultados de toxicidade aguda	86
5.6.1	Bifentrina	86
5.6.2	Imidacloprido	87
5.7	Quantificação de fungos e bactérias nos processos de ficorremediação de bifentrina e imidacloprido	88
6.	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	90
7.	SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	91
8.	REFERÊNCIAS	92

1. INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas a necessidade do aumento da produção agrícola e da qualidade dos alimentos fornecidos à população foram propulsoras de novas tecnologias que ainda dependem fortemente do uso de agrotóxicos. O uso contínuo dessas substâncias é preocupação constante em relação ao comportamento, destino ambiental e potencial adverso ao ecossistema e aos humanos, através da contaminação da água e solo [1].

Problemas ambientais provenientes da poluição geram a necessidade de encontrar novas alternativas que previnam e controlem essa questão de forma eficiente, evitando a degradação ambiental. A contaminação ocorre de forma pontual ou difusa através do descarte e uso incorreto de produtos tóxicos nas atividades industriais, agrícolas e domésticas [2].

A presença de agrotóxicos em águas superficiais, que são usadas como água de abastecimento para animais e humanos, são alvo de estudo em diferentes bacias hidrográficas próximas de produções agrícolas, como da cultura do tabaco, produzido a jusante da captação de água de Santa Cruz do Sul e, portanto, cultura agrícola mais importante para este estudo. Esta cultura, possui aplicação intensiva de agrotóxicos, causando grande preocupação, devido aos impactos ambientais, de saúde e socioeconômicos [3].

O tabaco é um produto agrícola utilizado na fabricação de cigarros. A região sul do Brasil é responsável por aproximadamente 96% do total produzido no país. A produção de tabaco é sazonal e envolve uma produção anual de ciclos. No Rio Grande do Sul, a cidade de Santa Cruz do Sul é quinto maior produtor de tabaco [4].

A presença de ingredientes ativos nos corpos de água próximos as plantações de tabaco são um indicador do uso inadequado e incorreto de agrotóxicos, exploração de recursos naturais, como desmatamento perto das fontes, incentivo da criação de pequenas fazendas sem devida preocupação com qualidade de vida dos agricultores e meio ambiente [5]. Porém, a legislação brasileira não inclui especificações para todos os agrotóxicos relevantes em relação ao padrão de lançamento em corpos

hídricos, o que é um problema, devido ao alto grau de toxicidade apresentado por alguns [6].

A importância do monitoramento e busca de soluções ambientalmente corretas para a remediação dos impactos causados com o uso excessivo e incorreto desses compostos é foco de estudos utilizando processos não convencionais. Nesse contexto, processos biológicos apresentam características apropriadas para auxiliar no combate à poluição, tornando os microrganismos objetos de diversas pesquisas [7-9].

A biorremediação é o processo através do qual emprega-se organismos vivos para reduzir, remover e/ou remediar contaminantes no ambiente [10], em se tratando do uso de microalgas, o processo recebe o nome de ficorremediação [11, 12].

Microalgas são microrganismos fotossintéticos que necessitam de requisitos simples como água, luz, fontes de carbono, fontes de nitrogênio, fósforo e potássio [13-15]. São um dos recursos biológicos que atualmente estão recebendo muita atenção pois são matéria-prima para produção de biocombustíveis com simultâneo sequestro de carbono [11, 16]. As microalgas que estão presentes em muitos corpos de água doce podem, de maneira natural, ser agentes de remediação e remoção de compostos inorgânicos em águas residuais domésticas [17] e de outros compostos orgânicos [18, 19].

Nesse contexto, a avaliação da capacidade de microalgas presentes no reservatório de abastecimento da cidade de Santa Cruz do Sul, em biorremediar os inseticidas bifentrina e imidacloprido, largamente empregados na cultura do tabaco e em outras culturas, se faz relevante nos contextos ambiental e social da região, podendo servir de base para trabalhos similares em outras regiões do mundo que utilizam esses produtos. Por último, ressalta-se que o emprego de microalgas para remediação ambiental se caracteriza como uma tecnologia que pode ter resultados rápidos comparados ao emprego de outros agentes biológicos empregados na remediação.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Utilizar microalgas nativas do Lago Dourado – Santa Cruz do Sul, RS (LGD) no processo de fitorremediação de águas contaminadas com os inseticidas bifentrina e imidacloprido utilizados na cultura do tabaco.

2.2 Objetivos específicos

- Identificar as microalgas predominantes no inóculo;
- Avaliar a presença e quantidade dos inseticidas bifentrina e imidacloprido na biomassa das microalgas após o estudo de fitorremediação;
- Determinar a concentração de bifentrina e imidacloprido residual no meio líquido após a fitorremediação;
- Verificar a presença de metabólitos após o processo de fitorremediação da bifentrina;
- Avaliar a influência do pH, da concentração dos inseticidas no meio, do fotoperíodo e da quantidade de inóculo durante o processo de fitorremediação;
- Quantificar fungos e bactérias no início e fim do processo de fitorremediação;
- Avaliar a toxicidade aguda do meio aquoso após o processo de fitorremediação utilizando *Daphnia magna*.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Poluição ambiental por agrotóxicos

Nos países em desenvolvimento como o Brasil, muitas comunidades e populações residem perto de recursos hídricos, como rios, lagos e reservatórios e são diretamente e indiretamente dependentes desse recurso para o seu sustento [20]. A contaminação dos sistemas aquáticos por produtos tóxicos provenientes de atividades industriais, agrícolas e domésticas são um dos problemas ambientais e sociais mais graves enfrentados na atualidade [21-23]. O aumento da consciência ambiental vem resultando em estudos e medidas que visam remediar o passado e proteger o ambiente de futuras contaminações e exploração. Os chamados agrotóxicos são compostos orgânicos muito utilizados e o seu grau de persistência é grande. Há dois motivos principais que esses compostos persistem no ambiente: a falta de condições necessárias para que a biodegradação ocorra, como por exemplo fatores limitantes como falta de nutrientes, baixa concentração do contaminante e ausência dos microrganismos e o fato do composto ser recalcitrante, ou resistente à biodegradação [24].

A legislação brasileira através da Lei Federal nº 7.802 de 11 de julho de 1989 [25], que foi regulamentada pelos decretos números: 98.816 de 1990 e 4.074 de 2002, ordena sobre a pesquisa, a experimentação, a produção, a embalagem e rotulagem, o transporte, o armazenamento, a comercialização, a propaganda comercial, a utilização, a importação, a exportação, o destino final dos resíduos e embalagens, o registro, a classificação, o controle, a inspeção e a fiscalização de agrotóxicos, seus componentes e afins. Através desta lei, o único termo utilizado é agrotóxico e afins e refere-se aos:

- a) Produtos e os agentes de processos físicos, químicos ou biológicos, destinados ao uso nos setores de produção, no armazenamento e beneficiamento de produtos agrícolas, nas pastagens, na proteção de florestas, nativas ou implantadas, e de outros ecossistemas e também de ambientes urbanos, hídricos e industriais, cuja finalidade seja alterar a composição da flora

ou da fauna, a fim de preservá-las da ação danosa de seres vivos considerados nocivos;

b) Substâncias e produtos, empregados como desfolhantes, dessecantes, estimuladores e inibidores de crescimento.

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), os pesticidas, termo usado por eles, são compostos químicos que são usados para matar pragas, como insetos, que podem ser vetores de doenças na saúde pública e causar danos às culturas, na agricultura. Eles são classificados conforme tipo de peste controlada (Tabela 1). Nas últimas décadas, a produção de agrotóxicos aumentou e não há conhecimento sobre a toxicidade e os efeitos (compostos xenobióticos) que grande parte pode causar aos seres humanos e ambientes [26, 27].

Tabela 1 – Tipos de agrotóxicos comumente utilizados [28].

Agrotóxicos	Tipo de organismo que é controlado
Inseticida	Insetos
Herbicida	Plantas indesejáveis
Rodenticida	Ratos e outros roedores
Nematicida	Nematoides
Fungicida	Doenças de fungos
Acaricida	Ácaros e aranhas
Bactericida	Bactérias

Alguns agrotóxicos podem causar vários danos ao meio ambiente, como a contaminação das fontes de água e solo. A contaminação da superfície da água é resultante principalmente de descargas agrícolas de águas pluviais. A propagação ocorre através da lixiviação do solo por fortes chuvas e ventos que transportam esses compostos, depositando-os em lagos, rios, águas costeiras e zonas húmidas [29, 30].

A produção mundial e a aplicação de agrotóxicos aumentaram progressivamente durante as últimas duas décadas. Apenas uma pequena porção do agrotóxico aplicado no campo atinge o alvo biológico final, sendo uma grande parte lançado no ambiente. A propagação ocorre através da lixiviação do solo por chuvas fortes e por ventos que podem transportar esses compostos até o corpo hídrico, todavia outras

características específicas também podem auxiliar no espalhamento. Problemas como toxicidade para organismos não alvo, acumulação, contaminação do solo e de mananciais de água, além do risco à saúde humana, devido a possíveis exposições diretas ou indiretas são comuns de ocorrência. Por esta razão, é necessário monitorar e avaliar possíveis efeitos adversos de agrotóxicos aplicados em ecossistemas [22, 31].

A produção mundial de agrotóxicos totalizou quase 3 bilhões de quilos por ano, em 2012. Os herbicidas representaram a maior parcela, seguido pelos inseticidas e fungicidas, conforme apresentado na Tabela 2 [32].

Tabela 2 – Ingrediente ativo usado para produção de agrotóxicos em 2012.

Tipo de agrotóxico	Mercado mundial 2012 (%)
Herbicidas	49
Inseticidas	18
Fungicidas	14
Outros	19

A engenharia dos processos de biorremediação possuem uma longa história de aplicação em restauração ambiental, embora haja muitos desafios em relação as estratégias de biorremediação para águas contaminadas com agrotóxicos. Os processos tradicionais de biorremediação visam o uso de agentes e produtos adsorventes como: filtros a base de carvão, argila, polivinilpolipirrolidona, albumina e caseína [33, 34]. Por outro lado, a biorremediação de recursos hídricos contaminados com agrotóxicos deve visar os resíduos de agrotóxicos solúveis que são transportados na fase aquosa até os corpos hídricos [35].

Para minimizar os impactos relativos ao uso dos agrotóxicos, há primeiramente a necessidade de redução do uso e em segundo plano, porém não menos importante, o uso de métodos para remediar ou reduzir o efeito nos diferentes ambientes contaminados. A fitorremediação vem ao encontro da redução do impacto desses compostos devido a capacidade de remoção, através do processo de degradação e fixação na biomassa [16].

Além de fatores climáticos e solo apropriado, a produção do tabaco requer o uso intensivo de produtos químicos que inibem o crescimento de pestes que podem impedir o crescimento da cultura de interesse. Como a cultura é intensiva, têm vários impactos ambientais atrelados ao seu cultivo e beneficiamento [5]. Devido à problemática atrelada ao uso indiscriminado de agrotóxicos, de 1991 até 2016, ocorreu uma redução significativa no uso destes produtos. Em 1991, 6,6 kg de ingrediente ativo por hectare era utilizado, sendo essa quantidade reduzida para 1,1 kg ha⁻¹, em 2016 [4]. Embora houve uma redução significativa, a busca deve ser constante.

Sequinatto e colaboradores [5] avaliaram a presença de agrotóxicos em águas superficiais de poços e riachos utilizados para consumo animal e humano, em um cenário onde há predominância do cultivo de tabaco. Do total de sete ingredientes ativos avaliados em cinco pontos distintos, seis foram detectados. Imidacloprido foi detectado na concentração de 0,13 µg L⁻¹ em um dos poços avaliados, demonstrando que é necessário desenvolver alternativas de mitigação.

Os agrotóxicos imidacloprido, atrazina e clomazone foram detectados em amostras de água coletadas durante o ciclo da cultura do tabaco em uma microbacia hidrográfica na cidade de Agudo, RS, Brasil. O ciclo contemplou o plantio, crescimento e a colheita do tabaco, entre os meses de outubro a dezembro de 2003. Imidacloprido e clomazone foram detectados nas maiores concentrações, 2,18 e 1,72 µg L⁻¹, respectivamente, no período de crescimento da planta [36].

3.1.1 Bifentrina

Bifentrina (ácido 2-metilbifenil-3-ilmetil-(Z)-(1RS,3RS)-3(2-cloro-3,3,3-trifluorprop-1-enil)-2,2-dimetil ciclopropanocarboxílico) é nome comum dado ao inseticida da terceira geração de piretróides, utilizado em todo o mundo para controle de pragas de insetos na agricultura e áreas residenciais. Ele é muito utilizado devido a sua grande atividade inseticida [37]. Na região sul do Brasil é amplamente utilizado na cultura do tabaco para o controle dos *Epitrix fasciata* (pulga do fumo) e *Agrotis ipsilon* (lagarta rosca). Estas espécies danificam culturas diversas, como a do tabaco,

em regiões de clima subtropical [38, 39]. Suas principais propriedades estão descritas na Tabela 3.

Tabela 3 – Propriedades da bifentrina [40].

Propriedades	Bifentrina
Fórmula química	$C_{23}H_{22}ClF_3O_2$
Massa molecular ($g\ mol^{-1}$)	422,9
Solubilidade em água ($mg\ L^{-1}$)	0,1
Coefficiente de partição água-octanol ($Log\ K_{ow}$)	6,0
Constante de Henry ($atm\ m^3\ mol^{-1}$)	$7,2 \times 10^{-3}$

Segundo a OMS, a bifentrina (Figura 1) é classificada em relação ao grau de toxicidade como moderadamente tóxica, classe II [41]. O seu uso contribui com uma ameaça de contaminação para habitats aquáticos e águas superficiais através de irrigação e inundação induzida pelas tempestades [42, 43]. Bifentrina é o piretróide que causa maior preocupação em relação à toxicidade da vida aquática e ocorrência generalizada na água e solo [44-46], sendo geralmente mais tóxico do que outros piretróides para insetos terrestres e aquáticos [47]. Os resíduos são frequentemente detectados em diferentes zonas, incluindo especialmente águas e sedimentos.

Weston e colaboradores [48] encontraram concentrações tóxicas de bifentrina após chuvas e ventos fortes, a uma distância de mais de 20 km da fonte, mostrando com isso sua toxicidade para vida aquática da espécie de peixe *Hypomesus transpacificus* (do inglês, *Delta Smelt*).

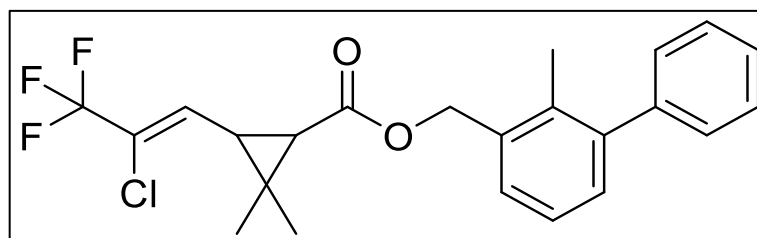


Figura 1 – Estrutura química da bifentrina.

Após contato com o meio aquático, eles se dissipam da fase aquosa e se ligam ao carbono orgânico dos sedimentos [49, 50]. Uma vez ligado aos sedimentos, eles

podem se tornar uma fonte de contaminação secundária, podendo ser liberados nas águas superficiais e causar efeitos as espécies que ali vivem [51].

3.1.2 Imidacloprido

Imidacloprido (1-(6-cloro-piridilmetil)-*N*-nitroimidazolidin-2-ilidaenamima) é parte da nova geração de inseticidas derivado da nicotina, pertencentes ao grupo neonicotinóide [52]. Recomendado no controle dos *Faustinus cubae* (broca do fumo) e *Myzus persicae* (pulgão verde), na cultura do tabaco. Insetos estes que podem causar sérios danos [53, 54]. A Tabela 4 apresenta as suas principais propriedades.

Tabela 4 – Propriedades do imidacloprido [55, 56].

Propriedades	Imidacloprido
Fórmula química	C ₉ H ₁₀ ClN ₅ O ₂
Massa molecular (g mol ⁻¹)	255,86
Solubilidade em água (g L ⁻¹)	0,61
Coeficiente de partição água-octanol (Log K _{ow})	0,57
Constante de Henry (atm m ³ mol ⁻¹)	1,7x10 ⁻¹⁰

Segundo a OMS, o imidacloprido (Figura 2) é classificado em relação ao grau de toxicidade como moderadamente tóxico, classe II [41]. É um inseticida não seletivo para os insetos e é capaz de matar polinizadores importantes, como as abelhas [52]. Neonicotinóides são classificados como o grupo de inseticidas mais utilizado na agricultura nas últimas décadas [57]. O imidacloprido pode facilmente chegar corpos de água através da pulverização ou escoamentos. Devido à sua alta solubilidade possui um alto potencial de chegar a águas subterrâneas [58].

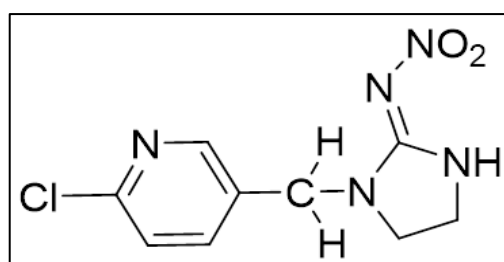


Figura 2 – Estrutura química do imidacloprido.

3.2 Microalgas

Microalgas são microrganismos fotossintéticos que podem crescer com rapidez e vivem em condições difíceis devido à sua estrutura unicelular. Estes organismos são principalmente encontrados em ambientes marinhos e de água doce, representando uma grande variedade de espécies, que vivem em uma ampla gama de condições ambientais. Estima-se que existem mais de 100.000 espécies, mas apenas um número limitado, cerca de 30.000 foram estudadas e analisadas [59, 60].

Os oceanos são o verdadeiro pulmão do mundo, uma vez que o nosso planeta possui aproximadamente 67% de sua superfície recoberta pela água, à qual é habitada por uma grande diversidade de microalgas. A fotossíntese incorpora o CO₂, resultado na liberação de O₂ para a atmosfera [61]. As microalgas fototróficas convertem energia solar em energia química com uma eficiência de até 15 vezes maior que as plantas terrestres e o CO₂ é utilizado como fonte de carbono durante o processo de fotossíntese [62].

As microalgas pertencem a um grupo altamente diversificado de organismos fotoautotróficos, que são importantes para a alimentação de animais aquáticos. Estes microrganismos possuem um papel muito importante, pois são produtores primários, alimento para consumidores como grupos dos rotíferos, copépodes, dáfrias e camarões [63].

Muitas espécies de microalgas podem acumular polissacarídeos extracelulares, como uma massa gelatinosa que cobre as células, que podem ser chamados de cápsulas. As microalgas contêm proteínas, lipídios e ácidos graxos como componentes da membrana. Devido a esta presença possuem nas paredes de suas células grupos funcionais como amino, hidroxila, carboxila e sulfato, que podem atuar como locais de ligação, principalmente de metais. Em termos de produção de biomassa, as microalgas formam o maior grupo de produtores primários [14].

Esses microrganismos possuem uma vantagem competitiva sobre as plantas, que incluem: alta taxa de crescimento; relação superfície/volume alta, que promove altas taxas de absorção e liberação; natureza cosmopolita que pode tolerar extremos; nenhum requerimento para solos agrícolas; crescimento em alta densidade em fotobiorreatores com controle [64].

As microalgas são distintas principalmente pela pigmentação, ciclo de vida e estrutura celular. As divisões ou filos das algas pode variar de 4 a 13, com até 24 classes, conforme dados de 2005 [63]. Entre o número de divisões existentes, algumas possuem potencial para a produção de biocombustíveis e grande potencial nos processos de biorremediação de compostos orgânicos e inorgânicos.

As algas possuem complexos fotossintéticos constituídos por moléculas de pigmentos, como: clorofila a, b, c, d, e e, bacterioclorofilas, feofitina a e b, carotenoides α e β e xantofilas [65].

3.3 Fatores que influenciam o crescimento de microalgas

Existem muitos fatores que influenciam o crescimento das algas. A Figura 3 evidencia fatores de crescimento entre eles: fatores abióticos como luz (qualidade e quantidade), temperatura, concentração de nutrientes, O_2 , CO_2 , pH e salinidade; outros organismos (fatores bióticos) como fungos, bactérias e vírus e a competição com outras espécies. Além de fatores operacionais como o cisalhamento produzido pela mistura, taxa de diluição, profundidade e frequência de repique. A influência dos fatores pode ser positiva ou negativa. Isso vai depender da quantidade e da qualidade como ela ocorre [59].

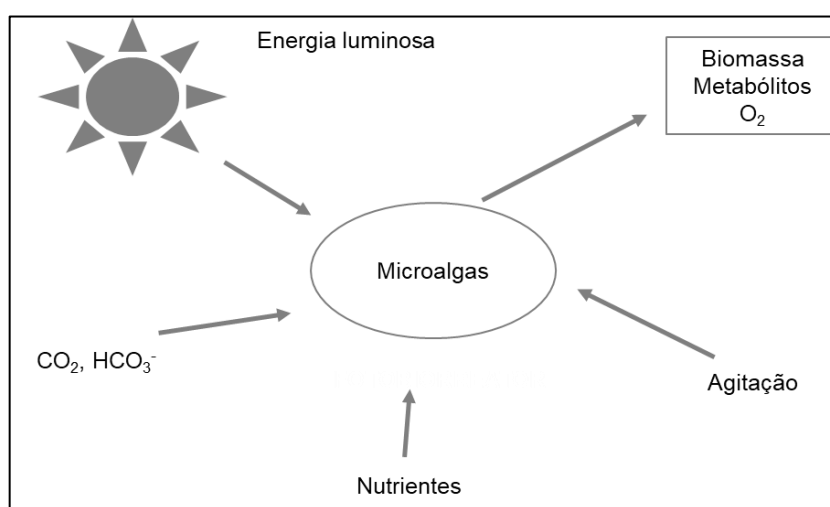


Figura 3 – Requerimentos para o crescimento das microalgas [64].

Um dos métodos que pode ser utilizado para avaliação do crescimento de microalgas, em cultura pura, é o da curva de crescimento. A relação pode ser expressa em número de células ou biomassa por volume e tempo [66, 67].

O monitoramento do crescimento de cepas puras também pode ser realizado através concentração total de clorofila. Uma extração na biomassa separada é realizada usando o solvente metanol. A absorbância do sobrenadante é medida em dois comprimentos de onda, 665 (clorofila a) e 652 nm (clorofila b), utilizando espectrofotômetro [68].

Clorofila é um componente essencial para colheita da luz e transdução de energia em reação de fotossíntese. Reações como: reações da luz, ciclo de Calvin e síntese do amido estão atreladas a fotossíntese. O total de clorofila aumentou 19% na espécie *Chlamydomonas mexicana* com a presença de 50 mg L⁻¹ de carbamazepina após 10 dias de incubação [69].

3.3.1 Luminosidade

A energia luminosa é essencial para o crescimento fototrófico. Por outro lado, a exposição a altas irradiações pode causar uma diminuição da eficiência fotossintética, como a fotoinibição, causando uma desativação reversível do aparelho fotossintético. A movimentação entre as zonas claras e escuras facilita a fotossíntese. A intensidade e o ciclo do fotoperíodo pode influenciar na produtividade e crescimento de lipídios, biomassa e pigmentos [70].

Na seleção da fonte de luz, a qualidade espectral da luz utilizada pelas algas é definida pelo de absorção na faixa de 400 a 700 nm para as clorofilas. A outra eficiência fotossintética é a função da qualidade espectral das fontes de luz. Existem várias fontes de luz disponíveis como: lâmpadas de descarga (fluorescentes, mercúrio e xenônio), lâmpadas incandescentes (tungstênio ou halogênios), diodos emissores de luz (conhecidos como LEDs e lasers) [71].

Ho e colaboradores [72] utilizaram estratégias para avaliar efeitos relacionados com a luz (qualidade, fonte e intensidade), para verificar a possibilidade do aumento do crescimento celular e produção de luteína. Quatro lâmpadas de LED com

diferentes comprimentos onda foram comparados com três tipos de lâmpadas fluorescentes brancas. Todas foram avaliadas com uma intensidade de luz fixa em $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. A Lâmpada fluorescente TL8 (fria) branca apresentou a maior produtividade de biomassa, $300 \text{ mg L}^{-1} \text{d}^{-1}$. Outra estratégia avaliada foi variar a intensidade da luz, de 30 a $450 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Um acréscimo na produtividade de biomassa, variando de 107 até aproximadamente $1000 \text{ mg L}^{-1} \text{d}^{-1}$ foi apresentado. Resultado este que mostra que a luminosidade é um fator importante no crescimento de microalgas.

3.3.2 Temperatura

A temperatura é um fator importante para as culturas de microalgas, em sistemas abertos e fechados, além de ser um fator importante na composição bioquímica. Muitas espécies têm uma temperatura ideal entre 15 e 25 °C, porém outras crescem bem em outras temperaturas fora deste intervalo. Temperaturas muito acima ou abaixo desse intervalo, podem afetar negativamente os rendimentos de biomassa [73].

A temperatura ambiente é um fator relevante, devido as variações sazonais e diurnas. O superaquecimento pode ocorrer em sistema fechados durante períodos de calor intenso. A temperatura dentro do reator pode variar entre 10 – 30 °C [71]. Em verões extremos a temperatura interna pode atingir 55 °C. Nestes casos, sistemas de refrigeração podem ser usados para diminuir a temperatura em torno de 20 – 26 °C [59].

A temperatura é alvo de estudos para avaliação do crescimento de espécies de microalgas. Zhang e colaboradores [74] avaliaram a densidade celular após 15 dias de cultivo, nas temperaturas 12, 18, 25 e 38 °C, usando *Chlorella* sp. Uma curva de crescimento foi obtida nas diferentes temperaturas. Durante o processo de crescimento, a densidade celular nas temperaturas 12 a 25 °C ficou extremamente maior que comparado a 38 °C. Em 18 °C a densidade chegou em $2,8 \pm 0,37 \times 10^7 \text{ cel mL}^{-1}$, sendo que em 38 °C a máxima foi de apenas $2,1 \pm 0,24 \times 10^5 \text{ cel mL}^{-1}$.

A microalga *Scenedesmus* sp. foi avaliada nas temperaturas 10, 20, 25 e 30 °C. Não houve diferença significativa entre a densidade algal dos cultivos ($p > 0,12$), após 15 dias de incubação. Em relação ao teor de biomassa, o resultado ficou o mesmo para as três temperaturas superiores. Na condição 10 °C, a biomassa ficou em torno de 30% mais baixa [75].

3.3.3 Agitação

A mistura constante das culturas microbianas pode ser feita através de mistura mecânica (agitação) ou mistura de bolhas de ar (turbulência), e é muito importante para a distribuição homogênea de vários parâmetros: células, metabólitos, calor, transferência de gases através das interfaces gás-líquido e regime de luz [71, 76].

Um certo grau de turbulência, especialmente na produção em larga-escala, é necessário para promover a circulação rápida de células de microalgas do lado escuro para a zona de luz do reator. Por outro lado, elevadas velocidades e graus, de turbulência, podem danificar as microalgas devido ao esforço do cisalhamento. A turbulência muito baixa pode ocasionar assentamento [59].

Quando os requerimentos nutricionais dos cultivos estão satisfeitos, e outras condições do ambiente não são limitantes do crescimento, a turbulência constitui o requisito mais importante para o aumento constante da massa de algas [71].

Estudos em escala menor, utilizando frascos reatores de no máximo 1 L de volume, empregaram a agitação mecânica para a distribuição homogênea dos parâmetros presentes no meio. Nos experimentos realizados por vários autores, a velocidade de agitação variou entre 80 e 380 rpm [77, 78]. Todavia a rotação média usual mais utilizada gira em torno de 140 rpm [79-81].

3.3.4 Nutrientes

A presença de nutrientes é um fator importante que controla os níveis de produtividade primária de organismos fotossintéticos. Para um crescimento ideal, a cultura precisa ser suplementada adequadamente com micro e macronutrientes. Os

micronutrientes estão presentes na ordem de grandeza de $\mu\text{g L}^{-1}$, ng L^{-1} ou pg L^{-1} . São constituídos de elementos traço como ferro, boro, manganês, cobre, molibdênio, vanádio, cobalto, níquel, silício, selênio e vitaminas. Os macronutrientes presentes são o carbono, nitrogênio, fósforo, enxofre e potássio [71, 82].

As proporções corretas entre estes nutrientes também desempenham um papel importante no crescimento. A absorção varia de acordo com a disponibilidade dos nutrientes no meio e das espécies. As microalgas têm a capacidade de armazenar grandes quantidades, mas também podem crescer com menores quantidades de um nutriente [83].

O carbono é considerado o macronutriente mais importante nos cultivos, consistindo de 40 a 50% da biomassa obtida [84]. Muitas vezes, os nutrientes N, P e C são limitantes, porém o excesso de oferta pode levar ao estresse e ao crescimento reduzido [64].

As microalgas podem assumir diferentes perfis metabólicos, devido a capacidade de adaptação a diferentes condições ambientais. Estes perfis (Tabela 5) são determinados conforme a forma que a microalgas utiliza a fonte de energia e carbono disponível.

Tabela 5 – Perfis metabólicos das microalgas [85, 86].

Perfil metabólico	Fonte de energia	Fonte de carbono
Fotoautotrófico/autotrófico	Luz	Inorgânico
Heterotrófico	Orgânica	Orgânico
Mixotrófico	Luz e orgânica	Inorgânico e orgânico
Fotoheterotrófico	Luz	Orgânico

As fontes de carbono orgânico ou substrato (açúcares, proteínas, gorduras ou outros compostos), vitaminas, sais e outros nutrientes (N e P) são vitais para o crescimento, além do equilíbrio entre os parâmetros operacionais (O_2 , CO_2 , pH, temperatura, intensidade da luz, e remoção de produtos e subprodutos) [59].

Efluentes e resíduos são comumente utilizados como fontes de nutrientes para o crescimento das microalgas. Efluente de cozinha é um potencial meio de cultivo, pois contém nutrientes em abundância. Zhang e colaboradores [87] avaliaram esse

resíduo no cultivo das microalgas *Chlorella sorokiniana* SDEC-18 e *Scenedesmus* SDEC-8, que mostram uma produção de biomassa ótima de 0,42 e 0,55 g L⁻¹, respectivamente, utilizando uma diluição de 1/15 do efluente, em 15 dias de cultivo. A produção em larga escala também foi avaliada, com adição de K₂HPO₄, onde houve um aumento significativo (fator 2,27) na produção de biomassa usando a cepa *Scenedesmus* sp.

3.3.5 pH

O pH do meio da cultura pode afetar tanto a química dos compostos polares quanto a disponibilidade de muitos nutrientes, como CO₂, ferro e ácidos orgânicos [71]. O pH de uma cultura diminui quando é aumentada a concentração de carbono inorgânico dissolvido como resultado da dissolução de CO₂, que interfere na faixa de pH permitida para crescimento de microalgas [88].

Para atingir um crescimento celular e um teor de lipídios maior, um estudo com diferentes pH foi avaliado por Qiu e coautores [79]. Quatro diferentes valores de pH (6, 7, 8 e 9), foram avaliados em escala menor, usando frascos de 0,5 L com a microalga *Chlorella sorokiniana*. O ajuste foi realizado através da injeção de uma mistura de CO₂ e ar (5:95, v/v). O pH 7 apresentou uma maior taxa de crescimento e o pH 6 uma maior acumulação de lipídios, se comparado aos outros pH, após 15 dias de cultivo. Além disso, com valores de pH acima de 7 as taxas de crescimento caíram significativamente.

3.3.6 Microbiota de água naturais e interações

A microbiota presente nos meios aquáticos não facilmente visíveis a olho nu, exigindo o uso de um microscópio para uma observação detalhada, são chamados de microrganismos. Fungos, bactérias, protozoários e microalgas são encontrados em meios aquáticos, como rios, lagos e mares [89].

A predominância de gêneros e quantidades de cada tipo de microrganismo depende de fatores naturais como: temperatura, luz, pH e nutrientes. Além do mais,

em ambientes de água doce, a água é o principal constituinte interno da biota. Em função disso as propriedades físicas e químicas da água são fundamentais para os microrganismos que nela vivem e suas interações [90]. Microalgas e bactérias fotossintéticas têm a capacidade de converter energia luminosa em energia química, embora exista diferença em termos de tamanho de célula, pigmentação e fisiologia [91].

Estudos avaliaram a interação de microalgas com outros organismos, como bactérias e outras algas em processos de biorremediação. Em alguns casos pode ocorrer um relacionamento mutuamente benéfico. Resíduos orgânicos abrigam inúmeras bactérias que podem estimular ou inibir o crescimento de microalgas. As microalgas podem fornecer O₂ e compostos extracelulares para as bactérias heterotróficas, e enquanto estas podem fornecer CO₂, substâncias orgânicas de baixo peso molecular e vitamina B [80].

Consórcio de diferentes espécies de microalgas também possuem vantagens em processos de biodegradação de compostos orgânicos halogenados. As microalgas *Chlorella vulgaris* e *Coenochloris pyrenoidosa* foram capazes de degradar clorofenol em diferentes fotoperíodos. Usando 24 h de luz, o consórcio foi capaz de degradar 100% de clorofenol adicionado (50 mg L⁻¹) em 5 dias [78].

Márquez e coautores [81] desenvolveram um consórcio de microalgas e bactérias para degradar compostos fenólicos. As microalgas das espécies *Scenedesmus obliquus* e *Chlorella vulgaris* e as bactérias *Raoultella terrigena* e *Pantoea agglomerans* metabolizaram mais de 99% dos compostos fenólicos do meio em 48 horas. O consórcio microalgal-bacteriano também removeu concentrações significativas de N e P da água residual da lavagem de azeitonas.

3.4 Ficorremediação

As microalgas presentes em águas residuais podem ser utilizadas como indicadores da poluição da água, pois são os principais produtores e têm um papel fundamental nas interações bióticas e abióticas dos sistemas aquáticos, além de possuírem a capacidade de sobreviver em ambientes oligotróficos e eutróficos. Elas

também desempenham papel no sequestro de nutrientes, deposição de metais e remoção de outros contaminantes das águas residuais. Em relação aos xenobióticos orgânicos, elas desempenham um papel importante na dispersão, transformação química e bioacumulação de muitos compostos químicos [20, 92].

A biotecnologia das microalgas ganhou popularidade devido à crescente necessidade de inovação ambiental. Requisitos de crescimento simples como luz e fontes de carbono como CO₂, e a vantagem de ser utilizada simultaneamente para múltiplas tecnologias como a mitigação de carbono, produção de biocombustíveis e biorremediação, tornam as microalgas candidatas favoráveis para estes processos, se comparadas com outras tecnologias convencionais [93-95].

Ficorremediação pode ser definida, em um sentido mais amplo, como o uso de macroalgas ou microalgas para remoção ou biotransformação de poluentes, incluindo nutrientes e xenobióticos de águas residuais e CO₂ com propagação de biomassa simultânea. Em função disso ela se tornou uma técnica promissora com alto potencial de assimilação de poluentes [96]. A ficorremediação contempla várias aplicações como: remoção de nutrientes de águas residuais, remoção de nutrientes e compostos xenobióticos com biosorventes a base de algas, tratamento de ácidos e metais em água residuais, sequestro de CO₂, transformação e degradação de xenobióticos e detecção de compostos tóxicos, como um bioindicador a base de algas [16, 97].

Existem muitas vantagens atreladas a ficorremediação no tratamento de água residuais: é um processo com custo-efetivo, ecologicamente amigável (do inglês, *eco-friendly*), sustentável e seguro, onde os microrganismos usados não produzem substâncias tóxicas. Outras vantagens já foram evidenciadas, como redução dos nutrientes atrelada a redução de sólidos totais dissolvidos, aumento de O₂ dissolvido, biomassa pode ser usada na produção biofertilizantes. Ademais o lodo não resulta em resíduos tóxicos, como no tratamento químico convencional, odor reduzido, operação e manutenção simples, custo de construção e operação são menos que a metade das plantas de tratamentos mecânicos que utilizam, solução de tratamento sustentável com potencial significativo de recuperação de energia e nutrientes [96, 98].

Microalgas têm a capacidade de degradar poluentes orgânicos diretamente [99, 100]. Estudos foram realizados com foco na capacidade de remoção de compostos

orgânicos da água utilizando microalgas: remoção de fármacos [69], metais [101], matéria-prima plástica [102], nutrientes [103, 104], entre outros compostos.

Efeitos adversos foram determinados por Gong e colaboradores [105] na espécie *Chlorella vulgaris* quando a mesma foi exposta a nano partículas de óxido de níquel. O estudo mostrou razões máximas de redução do níquel foram alcançados em 72 horas de exposição. As microalgas verdes possuem o potencial de uso na nano poluição, que pode ser biorremediado em sistemas aquáticos.

Os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos benzo(a)pireno (BaP) e benzo(a)antraceno (BaA) foram expostos em mini biorreatores com a presença de microalgas das espécies *Selenastrum capricornutum* e *Scenedesmus acutus* (50:50). O ciclo com uma vazão de 0,08 mL min⁻¹ usando modo de operação com alimentação contínua, apresentou uma remoção de 92 e 88%, de BaP e BaA, respectivamente [106].

O emprego de microalgas na remoção de agrotóxicos da água vem ganhando destaque nos últimos anos [9, 19]. Elas desempenham um papel importante na dispersão, transformação química e bioacumulação de muitos compostos xenobióticos tóxicos, como os agrotóxicos. A remoção de contaminantes orgânicos pode se dar através dos processos de adsorção, absorção e biodegradação [66].

Os termos bioadsorção e bioacumulação são usados por diferentes autores, mencionando a capacidade da biomassa de microalgas de remover, por meio de adsorção, poluentes do meio [18, 107]. Bioadsorção é definida como um processo de energia metabólica passiva, rápida, reversível e independente realiza por microrganismo vivos ou inativos. Este processo é representado pelo desequilíbrio das forças superficiais entre uma superfície sólida (biomassa) com uma fase líquida [108, 109].

A Tabela 6 mostra estudos realizados utilizando o processo de fitorremediação de águas contaminadas com agrotóxicos. Diferentes espécies de microalgas estão sendo aplicadas devido a sua capacidade de remoção de poluentes orgânicos em águas contaminadas com diversos tipos de agrotóxicos. Os percentuais de remoção variam de 0 até 95%. Os estudos foram realizados em escala laboratorial.

Tabela 6 – Estudos realizados para a remoção de agrotóxicos empregando microalgas.

Grupo de agrotóxico	Agrotóxico e percentual de remoção (%)	Concentração	Tempo de incubação (dias)	Temperatura (° C)	Fotoperíodo (luz:escuro h)	Intensidade da luz ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	Microalgas	Autores
Herbicida	Atrazina (6), simazina (10) e alacloro (51)	10 $\mu\text{g L}^{-1}$	8 (tempo de retenção hidráulica) reatores com alimentação contínua	23 $\pm$ 5	12:12	150	<i>Chlorella</i> sp. e <i>Scenedesmus</i> sp.	[19]
Inseticida	Diazinona (39), clorfenvinfós (49)							
Fungicida	lindano (41), malation (95), clorpirifós (84) e endosulfan (89)							
	Pentaclorobenzeno (84)							
Fungicida	Dimetomorfe (24) e pirimetanil (10)	600 $\mu\text{g L}^{-1}$	1 – 4	23 $\pm$ 2	24:0	65	<i>Scenedesmus obliquus</i> e <i>Scenedesmus quadricauda</i>	[77]
Herbicida	Isoproturon (54)	10 $\mu\text{g L}^{-1}$						
Fungicida	Metalaxil (0), ciprodinil (0), propamocarbe (50) e mandipropamida (0)	2 $\mu\text{g L}^{-1}$	4	20	16:8	100	<i>Chlorella vulgaris</i>	[18]
Herbicida	Fluroxipir (56)	0,5 mg L ⁻¹	5	20 – 25	14:10	80	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	[107]
Herbicida	Atrazina (80) e terbutrina (90)	0,75 mol L ⁻¹	1	18 $\pm$ 1	12:12	70 $\pm$ 2	<i>Synechococcus elongatus</i> e <i>Chlorella vulgaris</i>	[9]

4. METODOLOGIA

4.1 Delineamento da pesquisa

O Lago Dourado é o reservatório de água doce da cidade de Santa Cruz do Sul, proveniente do Rio Pardinho. Ele é fonte de captação e fornecimento de água para a cidade. Neste estudo foram utilizadas microalgas nativas do Lago Dourado (Figura 4) (29°43'49.1" latitude sul, 52°27'39.6" longitude oeste) a fim de avaliar seu potencial de fitorremediação dos inseticidas bifentrina e imidacloprido.

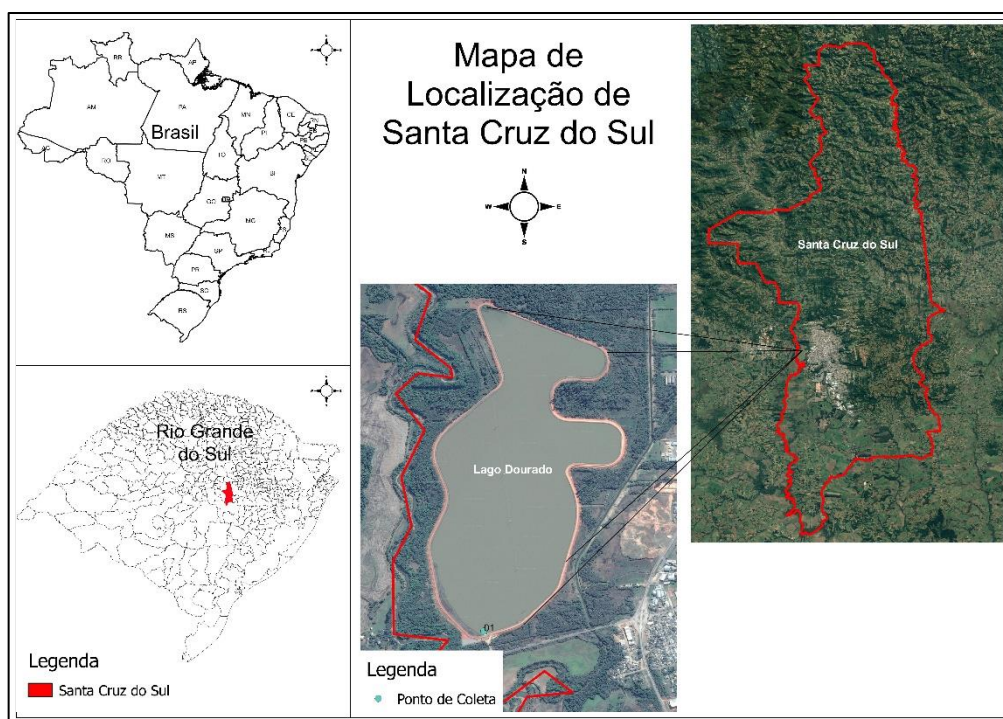


Figura 4 – Mapa de localização do Lago Dourado, Santa Cruz do Sul – RS.

A Figura 5 e 6 mostram o delineamento experimental da pesquisa, para a bifentrina e imidacloprido, respectivamente. O fluxograma contempla etapas desde a produção do inóculo de microalgas nativas até os processos de fitorremediação analisados (biodegradação, biossorção, adsorção e a determinação quantitativa dos inseticidas remanescentes) e as análises realizadas.

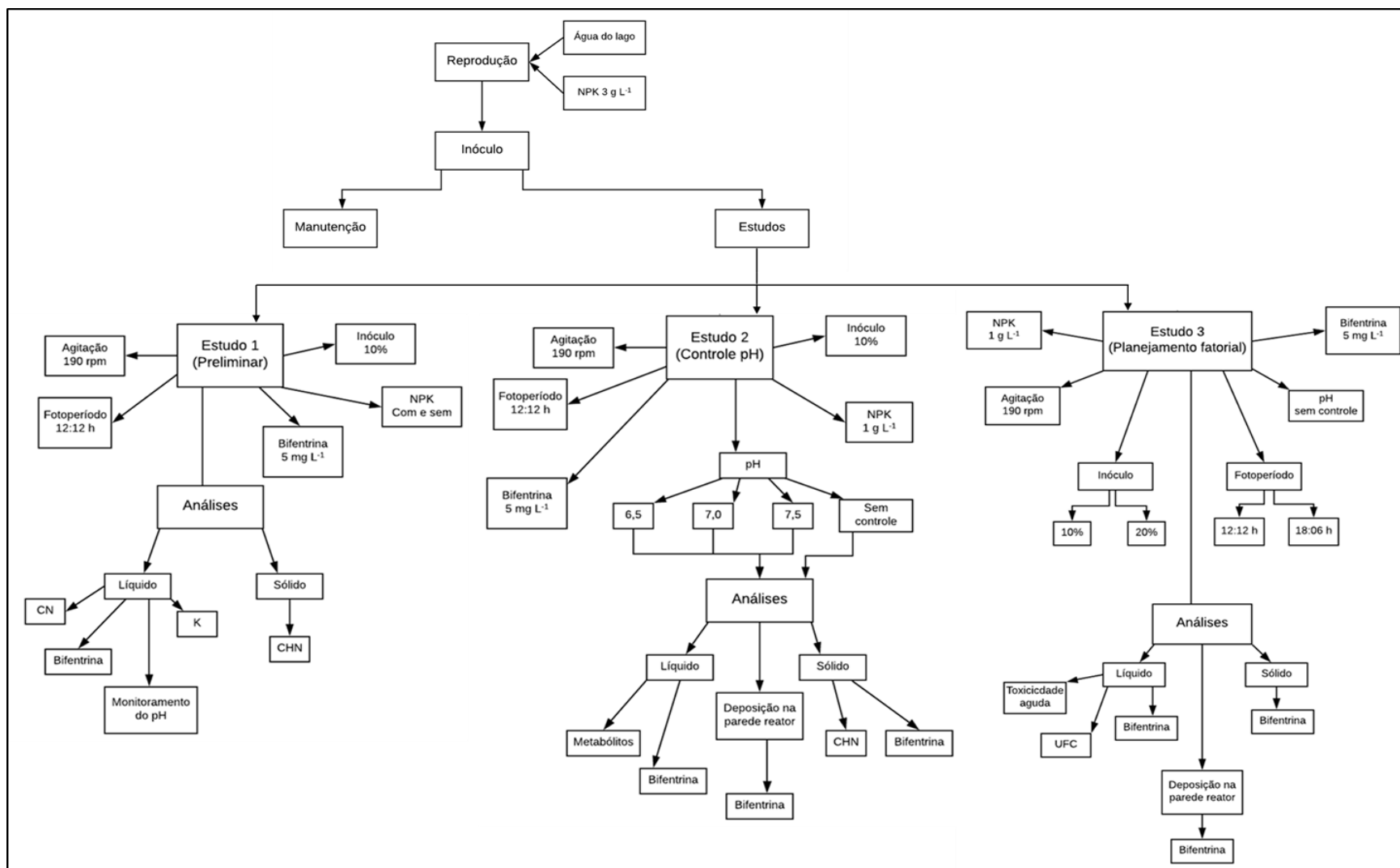


Figura 5 – Fluxograma esquemático do delineamento da pesquisa para a bifentrina.

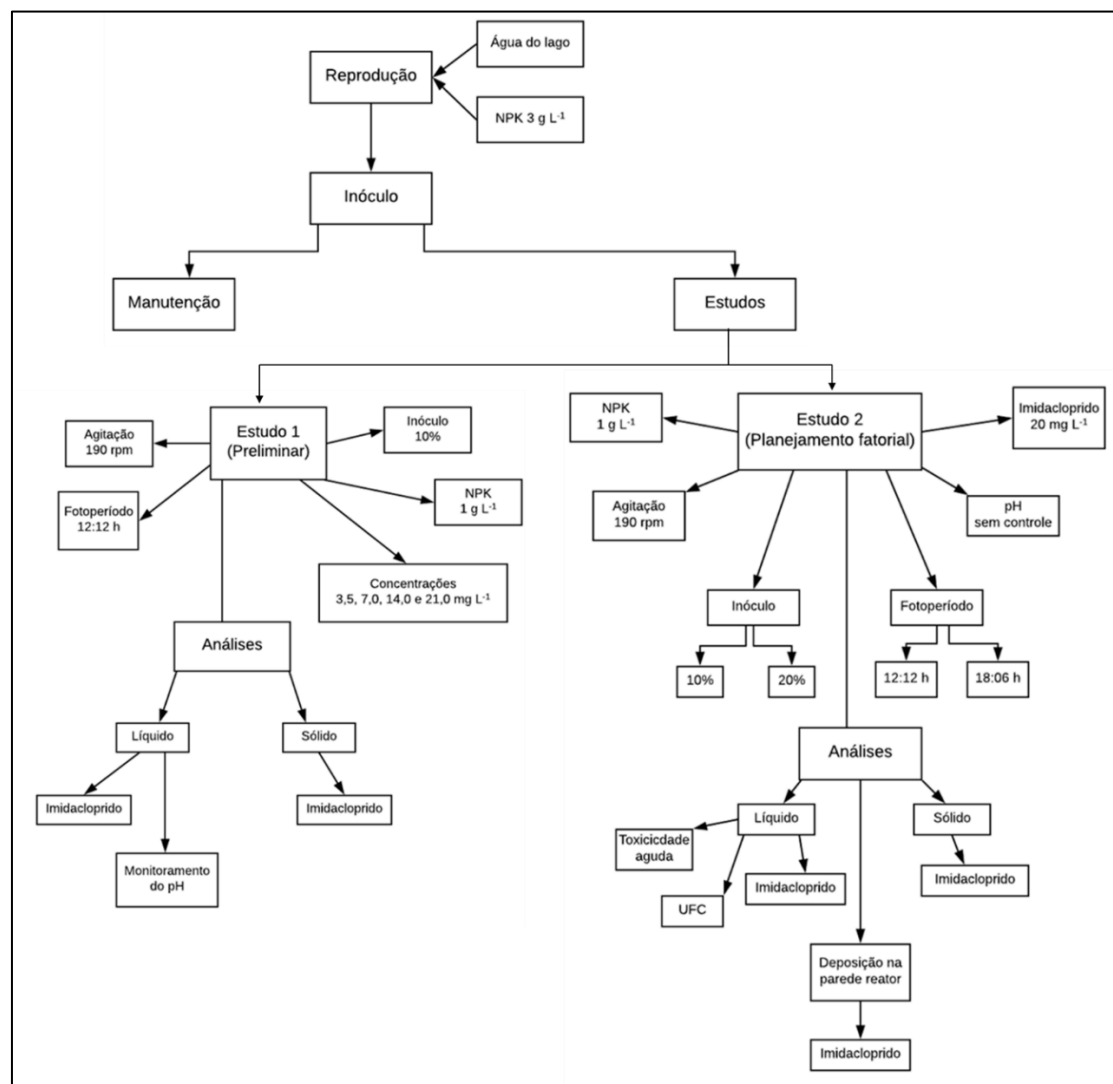


Figura 6 – Fluxograma esquemático do delineamento da pesquisa para o imidacloprido.

Amostras da água do LGD foram coletadas durante um período de eutrofização e floração, em agosto de 2016. A reprodução das microalgas foi conduzida em um fotobiorreator misto (Figura 7), isto é, um sistema de produção de microalgas combinado com formas abertas e fechadas. O fotobiorreator é composto de unidades do tipo colunas/tubos verticais, (Figura 7 – A), representado a forma fechada. A forma aberta é representada por um tanque (Figura 7 – B), que tem a função de reservatório, a partir do qual o meio de cultivo é recalcado e introduzido na base dos tubos verticais, através de uma bomba submersa com vazão de 15 L min^{-1} . Os tubos estão dispostos paralelamente ao longo dos quais, a água segue um fluxo ascendente.

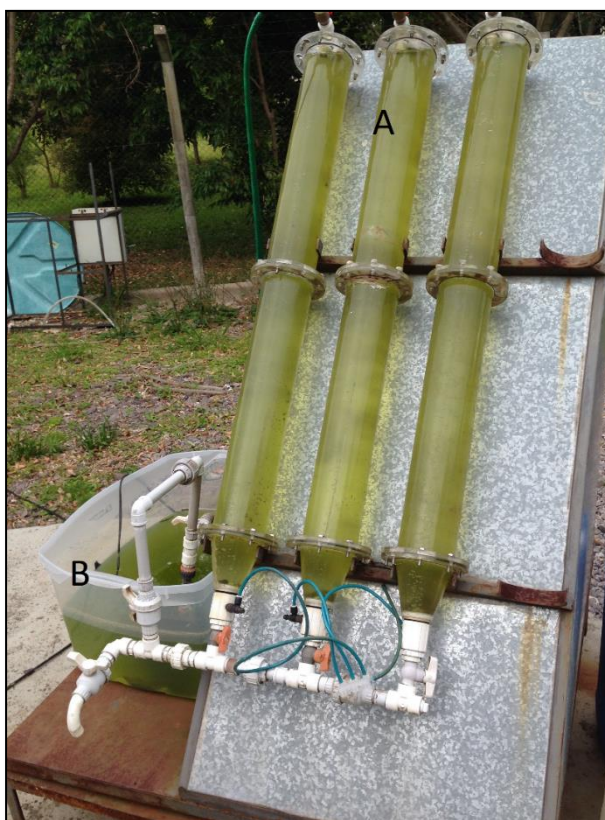


Figura 7 – Fotobiorreator do tipo misto, com colunas verticais (A) e tanque aberto (B).

O sistema está localizado próximo à Estação de Tratamento de Efluentes (ETE) da UNISC. A estação meteorológica automática da UNISC forneceu os dados referentes à irradiação solar incidente e de temperaturas no período em que foi feita a reprodução. A estação é da marca Davis, modelo Vantage Pro Plus. As coordenadas geográficas da ETE são: $29^{\circ}41'55.7''$ latitude sul e $52^{\circ}26'28.0''$ de longitude oeste.

O fotobiorreator misto possui aproximadamente 70 L de volume total. Dois litros de uma solução fertilizante de 3 g L⁻¹, com aproximadamente 17% de nitrogênio, 11% de fósforo e 18% de potássio (NPK), da marca Yara, foi adicionado aos 68 L de água do LGD. O cultivo foi feito nestas condições para garantir que o processo de reprodução ocorresse utilizando as temperaturas e radiações solares naturais. O processo para formação do inóculo levou 7 dias.

4.2 Manutenção do inóculo

O inóculo foi acondicionado em *erlenmeyers* onde foi mantido viável por aproximadamente 17 meses no Laboratório de Microalgas do Centro de Excelência de Produtos e Processos Oleoquímicos e Biotecnológicos (CEPPOB) da UNISC. O inóculo foi mantido sob borbulhamento, luz constante usando lâmpada fluorescente branca de 25 μmol m⁻² s⁻¹ e temperatura de 25 ± 2 °C. A intensidade da luz foi medida utilizando um medidor de luz, modelo 5025, da marca Peak Tech. Repiques foram feitos a cada 14 dias, retirando 2/3 do inóculo e completando com uma solução fertilizante de NPK 3 g L⁻¹.

4.3 Identificação das microalgas reproduzidas a partir da água do LGD

A identificação do gênero predominante no inóculo cultivado a partir da água do LGD foi realizada utilizando o microscópio óptico, modelo BX40, da marca Olympus, com aumento de 400 vezes. O processo foi realizado no Laboratório de Fitopatologia da UNISC. A identificação foi realizada antes de iniciar o processo de fitorremediação com o auxílio de uma chave dicotômica, baseada nas características morfológicas dos organismos [110].

4.3.1 Identificação molecular

A identificação molecular das espécies foi realizada após a identificação microscópica, a fim de confirmar a predominância do gênero encontrado. Esta etapa foi realizada pelo grupo de pesquisa do professor Alexandre Rieger, na UNISC. A

técnica de sequenciamento Sanger foi utilizada seguindo a descrição das etapas, brevemente:

- Extração do DNA;
- Amplificação pela técnica PCR utilizando um par de primers da região 18S rDNA e um par de primers da região ITS1-5.8S-ITS2;
- Sequenciamento utilizando do método de Sanger;
- Análise dos dados moleculares.

O sequenciamento das amostras foi realizado no CEPPOB, utilizando um analisador genético, modelo ABI 3500, um sistema de análise de DNA de 8 capilares de 50 cm com polímero POP-7.

4.4 Estudos de fitorremediação dos inseticidas

4.4.1 Condições dos estudos preliminares do processo de fitorremediação

Estudos preliminares foram conduzidos inicialmente para ambos os inseticidas para a tomada de decisões. Algumas condições foram otimizadas no início e se mantiveram durante todos os experimentos, conforme descrito na Tabela 7.

Tabela 7 – Condições otimizadas para os experimentos de fitorremediação.

Itens	Condições
Rotação do agitador	190 rpm
Luminosidade	20 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$
Temperatura	29 $\pm$ 3 °C
Fotoperíodo	12/12 h (luz/escuro)

Os experimentos foram conduzidos em um agitador automático, marca Marconi (Figura 8). Os inseticidas auxiliaram na fonte de carbono e três pares de lâmpadas fluorescente brancas, como fonte de energia.

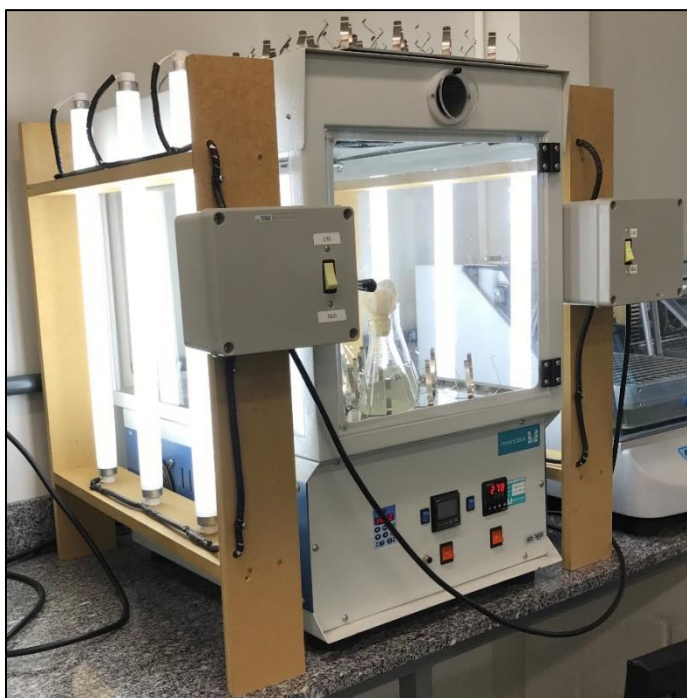


Figura 8 – Agitador automático usado como fotobiorreator.

A quantidade de inóculo utilizada nos ensaios foi calculada de modo que se obtivesse aproximadamente 1×10^4 cel mL⁻¹ (10% de inóculo adicionado) de concentração inicial nos experimentos. A determinação da concentração celular dos inóculos produzidos foi feita através da contagem das células em câmara de Neubauer utilizando microscópio da marca Instrutherm, com aumento de 100 vezes.

As soluções comerciais dos inseticidas bifentrina e imidacloprido, assim como a solução fertilizante de NPK foram preparadas no dia do início do experimento. Bifentrina e imidacloprido foram avaliados em concentrações na ordem de ppm, a fim de que resíduos pudessem ser quantificados dentro das respectivas faixas de trabalho nas técnicas analíticas empregadas, e, todavia, para simular a contaminação de águas em concentrações mais elevadas.

4.4.2 Estudo preliminar do processo de fitorremediação de bifentrina

O agrotóxico comercial utilizado nos experimentos foi da marca Talstar 100 EC, do fabricante FMC, contendo 100 g L⁻¹ (10% m/v) do ingrediente ativo bifentrina, além de outros ingredientes, como emulsionantes e solventes. A Tabela 8 mostra as

condições aplicadas nos testes preliminares avaliando a presença e ausência de microalgas, em *erlenmeyers*, para avaliação do processo de fitorremediação.

Tabela 8 – Composição dos reatores no estudo preliminar do processo de fitorremediação da bifentrina (5 mg L⁻¹).

Composição dos frascos reatores	AMB0	AB0	AMB1	AB1
NPK (g L ⁻¹)	0	0	1	1
Inóculo (%)	10	0	10	0

AMB = amostras com presença de microalgas e bifentrina; AB = amostras com presença de somente bifentrina;

10% de inóculo = 1x10⁴ cel mL⁻¹.

Algumas variáveis foram testadas como: leitura do pH das amostras, bifentrina remanescente nas amostras AMB0 e AMB1 (a cada 5 dias) e AB0 e AB1 (a cada 15 dias), total de biomassa seca; carbono total (TC), nitrogênio total (TN) e potássio (K) (após 15 dias de incubação) na fase aquosa; carbono (C) e nitrogênio (N) na biomassa seca (após 15 dias de incubação).

4.4.3 Estudo do processo de fitorremediação de bifentrina com controle de pH

Valores de pH foram avaliados nos experimentos com a presença de microalgas e bifentrina (AMB), somente com bifentrina (AB) e somente com microalgas (AM). O perfil metabólico fotoheterotrófico foi utilizado como modo de nutrição. Foram utilizados frascos *erlenmeyers* como reatores. A Tabela 9 mostra as condições estudadas.

Tabela 9 – Composição dos reatores no experimento usando bifentrina com controle de pH.

Composição	AM	AMB	AB
Bifentrina comercial (mg L ⁻¹)	0	5	5
NPK (g L ⁻¹)	1	1	1
Inóculo (%)	10	10	0
pH	Sem ajuste	Sem ajuste e 6,5, 7,0 e 7,5	Sem ajuste e 6,5, 7,0 e 7,5

AMB = amostras com a presença de microalgas e bifentrina; AM = amostras com a presença de somente microalgas; AB = amostras com a presença de somente bifentrina; 10% de inóculo = 1×10^4 cel mL⁻¹.

O pH foi monitorado a cada dois dias, em pares, nas amostras com adição de bifentrina, e quando necessário ajustado utilizando uma solução de NaOH 1 mol L⁻¹ e 0,01 mol L⁻¹, conforme descrito abaixo:

- Amostras sem ajuste de pH: AMBS e ABS;
- Amostras com ajuste em pH 6,5: AMB65 e AB65
- Amostras com ajuste em pH 7,0: AMB70 e AB70;
- Amostras com ajuste em pH 7,5: AMB75 e AB75.

Os valores de pH foram ajustados devido ao decréscimo significativo apresentado durante os testes preliminares, ademais visaram também contemplar o faixa ótima de crescimento das microalgas [79]. Os experimentos foram realizados simultaneamente em dias diferentes (inter-dia), e repetidos em triplicata. O período de incubação foi estendido para 20 dias, visando uma maior obtenção de biomassa seca para posterior avaliação.

4.4.4 Estudo preliminar do processo de fitorremediação de imidacloprido

Imidacloprido comercial da marca Evidence 700 WG, do fabricante Bayer, com 700 g kg⁻¹ (70% m/m) de pureza do princípio ativo, foi utilizado nos experimentos. A Tabela 10 mostra as condições aplicadas nos testes preliminares, em *erlenmeyers*. Variáveis foram avaliadas, como: pH das amostras com presença de microalgas e imidacloprido (AMI) e presença de somente imidacloprido (AI), 4 vezes durante os 11

dias, imidacloprido remanescente e o total de biomassa seca, após 11 dias de incubação.

Tabela 10 – Composição dos reatores no estudo preliminar do processo de fitorremediação do imidacloprido.

Amostras	Imidacloprido comercial (mg L ⁻¹)	Inóculo (%)
AMI1	3,5	10
AI1	3,5	0
AMI2	7,0	10
AI2	7,0	0
AMI3	14,0	10
AI3	14,0	0
AMI4	21,0	10
AI4	21,0	0

NPK = 1 g L⁻¹;
10% de inóculo = 1x10⁴ cel mL⁻¹.

4.4.5 Planejamento fatorial da fitorremediação de bifentrina e imidacloprido

O objetivo do planejamento fatorial (2²) foi avaliar a influência de duas variáveis, percentual de inóculo e fotoperíodo, conforme descrito na Tabela 11, no processo de fitorremediação de bifentrina e imidacloprido.

Tabela 11 – Planejamento fatorial dos experimentos.

Fotoperíodo (h)	Inóculo (%)
12:12	10
12:12	20
18:6	10
18:6	20

10% de inóculo = 1x10⁴ cel mL⁻¹;
20% de inóculo = 2x10⁴ cel mL⁻¹.

As condições já otimizadas desde o início dos experimentos se mantiveram fixas, como: rotação do agitador (190 rpm), intensidade da luz ($20 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), pH (sem ajuste) e temperatura ($29 \pm 3 \text{ }^{\circ}\text{C}$). A concentração da solução fertilizante NPK foi de 1 g L^{-1} e a concentração da bifentrina e do imidacloprido utilizada, 5 mg L^{-1} e 20 mg L^{-1} , respectivamente. As amostras com a presença de microalgas e o inseticida (AMB ou AMI), presença somente do inseticida (AB ou AI) e presença somente de microalgas (AM), também chamados de brancos, foram analisados em triplicata, no mesmo período.

Os parâmetros avaliados, rendimento da biomassa algal seca, teor de inseticidas na biomassa, teor de inseticidas depositados na parede do reator e teor de inseticida remanescente no meio aquoso foram determinados no final dos 20 dias de incubação.

4.5 Análises realizadas

4.5.1 Análises preliminares do processo de fitorremediação de bifentrina

Análises preliminares foram realizadas para o composto bifentrina a fim de avaliar alguma relação entre os teores remanescentes do inseticida.

Análise elementar foi utilizada para a determinação do percentual de carbono, hidrogênio e nitrogênio na biomassa seca. Foi utilizado o analisador CHNS, modelo 2400, da marca Perkin Elmer.

A determinação de carbono total e nitrogênio total foi realizada em testes preliminares, na fase aquosa, para a avaliação da necessidade de adição de fertilizante (NPK) no processo de fitorremediação. Para isso foi utilizado o analisador de carbono orgânico total e medição de nitrogênio total, modelo TOC-L e TNM-L acoplados, da marca Shimadzu.

A determinação de potássio foi realizada através da técnica de fotometria de chama, usando fotômetro, modelo B462, da marca Micronal. A curva analítica foi preparada com a faixa de trabalho de $1 - 100 \text{ mg L}^{-1}$.

4.5.2 Determinação de bifentrina na biomassa

A determinação de bifentrina na biomassa microalgal seca foi realizada pesando aproximadamente 10 mg de amostra em um tubo de vidro. Foi adicionado 5 mL de acetato de etila, marca Vetec e levado ao banho ultrassom, da marca Eco-sonisc, durante 15 min. Este processo de extração foi repetido três vezes. O extrato foi evaporado em rotaevaporador da marca Tecnal, usando temperatura e vácuo e reconstituído com 5 mL. Após a bifentrina foi determinada em CG-EM.

Para avaliar se o tempo, volume de solvente e número de extrações seria o suficiente, foi realizada a fortificação com bifentrina a 5 mg L⁻¹. A fortificação foi realizada em meio com biomassa de microalgas com a adição padrão na referida concentração. A recuperação encontrada foi de 96%.

4.5.3 Determinação de bifentrina retida na parede do reator

Adicionalmente um processo de extração para remover a bifentrina depositada na parede do reator (vidro) foi realizada. Após o processo de fitorremediação, no recipiente já vazio, foi adicionado aproximadamente 100 mL acetato de etila, seguido do processo de extração utilizando agitador automático (marca Marconi) com rotação de 250 rpm, durante 15 min. Este processo de extração foi repetido duas vezes. O extrato foi evaporado em rotaevaporador da marca Tecnal, usando temperatura e baixa pressão e reconstituído com 5 mL. Após a bifentrina foi determinada em CG-EM.

Para avaliar se o tempo, volume de solvente e número de vezes seria o suficiente remover toda bifentrina depositada na parede do vidro, cada extração foi injetada separadamente a fim de avaliar se o processo de remoção foi eficiente.

4.5.4 Extração de bifentrina da fase aquosa utilizando extração em fase sólida

Antes de proceder com a determinação de bifentrina em CG-EM, foi necessário realizar uma pré-concentração e remoção dos interferentes do sobrenadante

resultante da separação da biomassa microalgal (meio líquido). Para tal, foi utilizado a extração em fase sólida [111, 112].

Para tanto uma bomba de vácuo e um manifold foi utilizado para auxiliar na extração (Figura 9). O cartucho Strata C18-E (500 mg/6 mL), da marca Phenomenex foi utilizado como fase sólida. Segue abaixo as etapas de extração:

- Ativação do cartucho: 3 mL de metanol, marca J.T. Baker;
- Amostra (sobrenadante): 3 mL;
- Remoção dos interferentes: 5 mL de água ultrapura
- Eluição: 3 mL de acetato de etila;
- Secagem: 1 min, utilizando ar;
- Remoção de moléculas de água: adição de sulfato de sódio anidro.



Figura 9 – Sistema manifold acoplado a bomba de vácuo.

O fluxo de passagem dos solventes e amostra foi de aproximadamente uma gota por segundo. Após o processo de extração, a bifentrina foi determinada em CG-EM. O resultado do teste de recuperação foi de 98% na bifentrina comercial, na concentração de 10 mg L⁻¹.

4.5.5 Determinação de bifentrina utilizando cromatografia gasosa acoplado a espectrometria de massas

O teor de bifentrina foi determinado usando CG-EM, da marca Shimadzu, modelo QP2010 Plus, equipado com injetor automático. As análises foram realizadas com uma coluna capilar DB-5MS (30 m x 0,25 mm x 0,25 μ m) e as condições da corrida estão descritas na Tabela 12.

Tabela 12 – Condições instrumentais da análise de bifentrina por CG-EM [111].

Parâmetro		Condição	
Temperatura injetor		250 °C	
Modo de injeção		Split (razão 1:10)	
Volume de injeção		1 μ L	
	Taxa	Temperatura	Tempo de espera
Rampa de aquecimento do forno	-	100 °C	0 min
	25 °C	250 °C	0 min
	3 °C	260 °C	3 min
Gás arraste		He	
Fluxo da coluna		1 mL min ⁻¹	
Fonte de ionização		Impacto de elétrons, modo positivo	
Energia da fonte		70 eV	
Temperatura da fonte		300 °C	
Tempo de corrida		12,33 min	
Tempo de retenção		9 min	
Modo de aquisição		Monitoramento do íon selecionado	
Corte do solvente		5 min	
Fragmento		181 m/z	

Para a quantificação, a curva de analítica da bifentrina possuiu uma faixa de 0,1 até 25 mg L⁻¹. O coeficiente de determinação (r^2) para curva linear ficou igual 0,999, com seis pontos. A Figura 10 apresenta o espectro de massa e o cromatograma de um ponto da curva (5 mg L⁻¹).

A linearidade da curva de analítica foi avaliada através do teste de Cochran ($\alpha = 0,05$) e a presença de valores aberrantes nas áreas dos pontos através do teste de Grubbs ($\alpha = 0,05$). O limite de detecção (LOD) foi determinado como três vezes a relação do sinal/ruído ($10 \mu\text{g L}^{-1}$). O limite de quantificação (LOQ) foi determinado através da relação sinal/ruído ($30 \mu\text{g L}^{-1}$) multiplicado por dez.

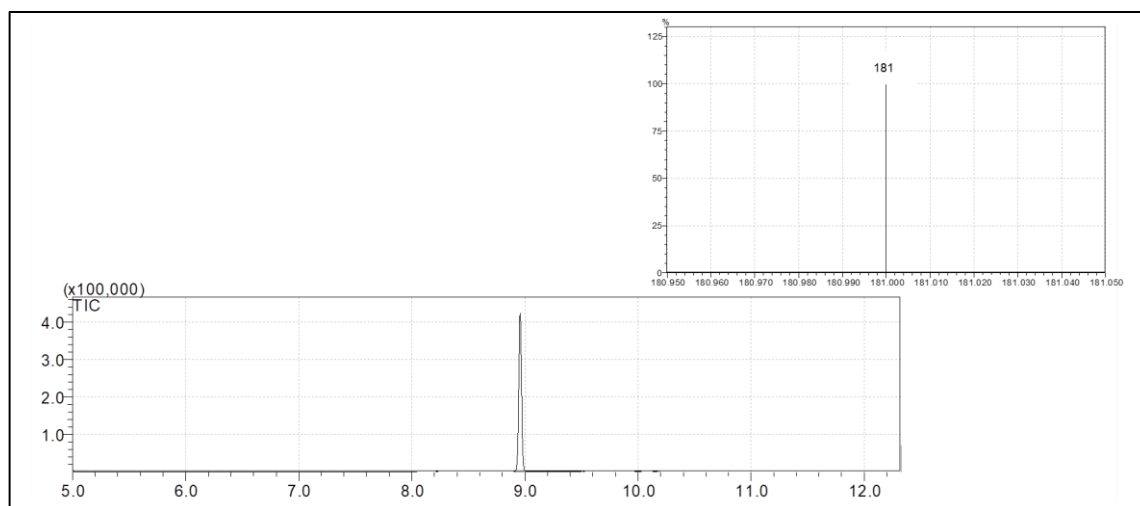


Figura 10 – Espectro de massa do composto bifentrina utilizando $m/z = 181$ e cromatograma, utilizando CG-EM.

4.5.6 Avaliação da presença de metabólitos no processo de fitorremediação de bifentrina

A presença de metabólitos foi avaliada nas amostras com a presença de bifentrina e microalgas, sem ajuste de pH, após 3, 6, e 20 dias de incubação, utilizando CG-EM/EM, da marca Agilent, modelo do cromatógrafo 789B e do espectrômetro 7000C. A fase aquosa das amostras, depois do processo de centrifugação, foi acidificada em torno de pH 2, com solução de HCl 1 mol L^{-1} e após acetato etila foi utilizado para a extração dos metabólitos, em funil de extração. A extração foi repetida 3 vezes e o extrato foi rotaevaporado até a secura e reconstituído com metanol, em 5 mL. Na fase orgânica foi adicionado sulfato de sódio anidro para remoção de possíveis moléculas de água.

Os extratos foram injetados em modo de varredura completa e os espectros foram adquiridos no intervalo de 45 – 500 m/z em 2 segundos por varredura [44, 113].

Após os espectros foram comparados com a biblioteca de espectro de massa NIST. A Tabela 13 evidencia a configuração do equipamento.

Tabela 13 – Condições instrumentais da identificação de metabólitos da bifentrina por CG-EM/EM.

Parâmetro		Condição	
Temperatura injetor		250 °C	
Modo de injeção		Split (razão 1:1)	
Volume de injeção		1 µL	
	Taxa	Temperatura	Tempo de espera
Rampa de aquecimento do forno	-	160 °C	5 min
	10 °C	200 °C	1 min
	10 °C	280 °C	8 min
Gás arraste		He	
Fluxo da coluna		0,5 mL min ⁻¹	
Fonte de ionização		Impacto de elétrons, modo positivo	
Energia da fonte		70 eV	
Temperatura da fonte		280 °C	
Tempo de corrida		26 min	
Modo de aquisição		Varredura	

No processo de fitorremediação do imidacloprido não foi possível avaliar a presença de metabólitos no processo, devido à falta de tecnologia adequada para tal identificação.

4.5.7 Determinação de imidacloprido na biomassa

Imidacloprido foi determinado na biomassa microalgal seca através da pesagem de aproximadamente 10 mg de amostra em um tubo de vidro. Foi adicionado 5 mL da solução acetonitrila:metanol:água (proporção 3:3:2) e levado ao banho ultrassom, da marca Eco-sonisc, durante 15 min. Este processo de extração foi repetido três vezes, somando um total de 15 mL de volume. O sobrenadante da extração foi filtrado com

filtro de seringa de nylon 0,45 μm , da marca Sartorius. Após a filtração o extrato foi levado ao CLAE-DAD para determinação do imidacloprido [58].

Para avaliar se o tempo, volume de solvente e número de extrações seria o suficiente, foi realizada a fortificação com imidacloprido a 20 mg L^{-1} . A fortificação foi realizada em meio com biomassa de microalgas com a adição padrão na referida concentração. A recuperação encontrada foi de 89%.

4.5.8 Determinação de imidacloprido retida na parede do reator

O processo de extração para remover o imidacloprido depositado na parede do reator (vidro) foi realizada. No recipiente já vazio, foi adicionado 20 mL da solução acetonitrila:metanol:água (proporção 3:3:2) e os frascos levados ao agitador automático (marca Marconi) com rotação de 300 rpm, durante 30 min. Após o extrato foi injetado no CLAE-DAD.

Para avaliar se o tempo, volume de solvente e número de vezes seria o suficiente remover todo o imidacloprido depositado na parede do vidro, foram realizadas duas extrações e foi verificado que um processo de extração é o suficiente para remover todo o inseticida da parede.

4.5.9 Determinação de imidacloprido utilizando cromatografia líquida com detector arranjo de diodos

A concentração de imidacloprido foi determinada usando CLAE-DAD da marca Shimadzu, modelo SPD-M20A. A coluna foi do tipo fase reversa Eclipse Plus C18 (150 mm x 4,6 mm x 5 μm). A Tabela 14 mostra a configuração instrumental do cromatógrafo para determinação de imidacloprido. Todos os extratos foram filtrados utilizando filtro de seringa de nylon 0,45 μm , da marca Sartorius, antes da injeção no cromatógrafo.

A faixa de trabalho da curva de analítica do imidacloprido variou de 0,1 até 50 mg L^{-1} . O coeficiente de determinação (r^2) para curva linear ficou igual 0,999, com seis pontos. Os testes de Cochran ($\alpha = 0,05$) e Grubbs ($\alpha = 0,05$) foram usados para

avaliação da linearidade da curva e a presença de valores aberrantes nas áreas dos pontos, respectivamente. O LOD ficou igual a $10 \mu\text{g L}^{-1}$ e o LOQ com o valor de $100 \mu\text{g L}^{-1}$. A Figura 11 apresenta o cromatograma de um ponto da curva analítica (25 mg L^{-1}) e o espectro UV.

Tabela 14 – Condições instrumentais da análise de imidacloprido por CLAE-DAD [114].

Parâmetro	Condição
Volume de injeção	5 μL
Fase móvel	Metanol/Água (65/35) em pH 3
Fluxo da coluna	0,6 mL min^{-1}
Temperatura da coluna	22 $^{\circ}\text{C}$
Tempo de corrida	10 min
Tempo de retenção	3,8 min
Comprimento de onda	270 nm

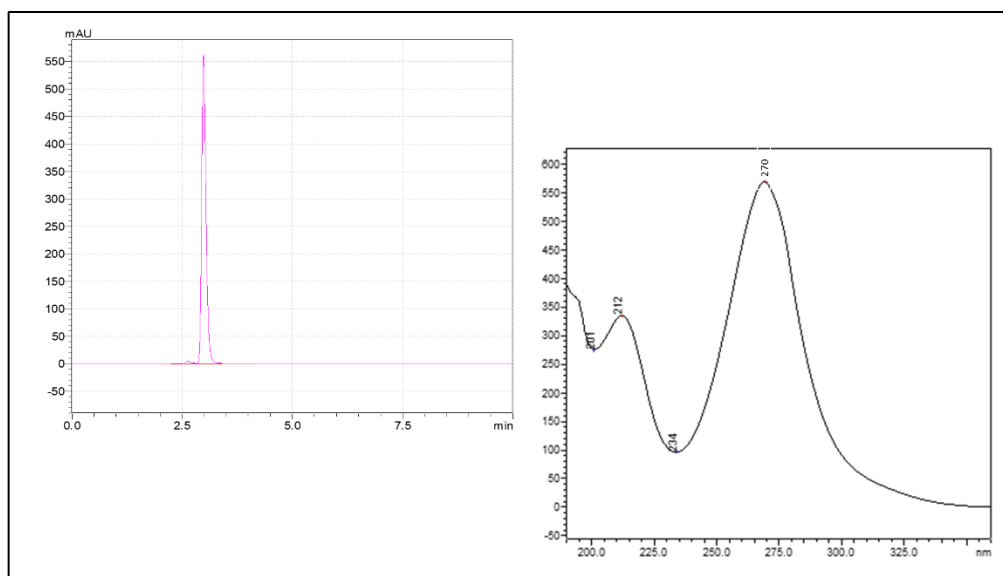


Figura 11 – Cromatograma e espectro UV do imidacloprido, empregando CLAE-DAD.

4.5.10 Determinação do rendimento da biomassa de seca

A recuperação de biomassa de microalgas para os cálculos de rendimento no processo de fitorremediação foi realizada pela centrifugação das amostras, utilizando uma centrífuga da marca Fanem, com rotação de 2500 rpm, durante 15 min.

A análise gravimétrica foi utilizada para a determinação do peso seco da biomassa microalgal separada. Após a decantação, a biomassa foi seca em estufa, da marca Biofoco, a 60 °C, até peso constante, em placas de Petri.

4.5.11 Avaliação da toxicidade aguda de amostras com a presença de bifentrina e imidacloprido usando *Daphnia magna*

Daphnia magna Straus, 1820 (Crustacea, Cladocera), é um microcrustáceo planctônico, de 5 mm a 6 mm de comprimento, que atua como consumidor primário na cadeia alimentar aquática e se alimenta por filtração de material orgânico particulado em suspensão. Os organismos deste gênero são vulgarmente conhecidos como pulga d'água [115]. É um organismo modelo na ecotoxicologia, devido a características como: cultivo fácil, crescimento rápido e fundo genético constante definido com uma reprodução clonal [116].

Os ensaios foram realizados no Laboratório de Ecotoxicologia da UNISC, utilizando neonatos de *Daphnia magna*, com idade entre 2 a 26 horas. O cultivo dos organismos foi realizado em água reconstituída com fotoperíodo de 16:8 horas (luz/escuro). *Desmodesmus subspicatus* é a espécie de microalga utilizada como alimento dos microcrustáceos, com uma temperatura de 20 °C ± 2 °C.

O teste de sensibilidade exigido pela ABNT NBR 12713:2009 foi realizado através da exposição dos indivíduos a substância referência dicromato de potássio, em diferentes concentrações. A duração do teste é de 24 horas com ausência de luz. Todos os resultados foram obtidos a partir da visualização, seguida de contagem, da quantidade de organismo que perderam a mobilidade. O software Spearman-Kärber foi utilizado para calcular o EC50.

A ecotoxicidade das amostras aquosas foi avaliada depois do processo de fitorremediação, utilizando o método de ensaio com *Daphnia magna* para avaliação da toxicidade aguda, seguindo a norma ABNT NBR 12713:2009 [115].

A análise ecotoxicológica consiste na exposição dos organismos a amostra, conforme Figura 12. Amostras antes (AT0) e depois do processo de fitorremediação (AT20) foram avaliadas. O volume de amostra em cada frasco é de aproximadamente

25 mL e são expostos 10 organismos por frasco. O tempo de exposição é de 48 horas. Após a exposição foi realizada a contagem do número de indivíduos mortos.



Figura 12 – Exposição dos filhotes de *Daphnia magna* as amostras.

4.5.12 Quantificação de fungos e bactérias viáveis nos processos de fitorremediação de bifentrina e imidacloprido

Considerando que o inóculo foi produzido a partir de uma fonte ambiental e que os experimentos não foram realizados assepticamente, a população microbiana de fungos e bactérias foi quantificada nas amostras no tempo zero (t_0), início dos experimentos e após os 20 dias de cultivo (t_{20}), sem ajuste de pH e no fotoperíodo 12:12 horas. Para avaliar as unidades formadoras de colônias (UFC mL^{-1}) foi aplicada a técnica de contagem padrão em placa a partir de diluições seriadas.

Para a avaliação de bolores e leveduras, as alíquotas de 100 μL foram espalhadas em placas de Petri contendo Ágar Batata Dextrose e incubadas a 25°C por 5 – 7 dias, em duplicatas. Para a avaliação de bactérias mesófilas aeróbias as alíquotas foram espalhadas em placas de Petri contendo Ágar Nutriente e incubadas a 35 °C por 48 horas, em duplicatas. Após o período de incubação procedeu-se a contagem das colônias desenvolvidas nas placas considerando as diluições que apresentavam entre 25 e 250 colônias. Os resultados foram expressos considerando as respectivas diluições e o volume adicionado.

4.6 Análise de dados

O software Graph Pad Instat, versão 3 de 1997 foi utilizado para avaliação dos dados. Resultados dos experimentos foram obtidos em triplicata ($n = 3$), e os valores expressos como média $\pm$ desvio padrão.

Testes não-paramétricos foram submetidos aos resultados devido ao baixo número de replicatas e ao não atendimento dos requisitos paramétricos. Em função disto, não foi possível verificar a normalidade e homogeneidade dos dados.

Quando três grupos ou mais de dados foram comparados, os mesmos foram submetidos à análise de variância utilizando o teste de Kruskal-Wallis com pós teste de Dunn para comparação das colunas. O nível de confiança foi de 95% ($p < 0,05$).

No planejamento fatorial, o efeito das variáveis foi comparado através do digrama de Pareto, utilizando o software Chemoface, versão 1.61 de 2016. Resultados dos experimentos foram obtidos em triplicata ($n = 3$). O nível de confiança foi de 95% ($p < 0,05$).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Reprodução das microalgas nativas do LGD

No período de crescimento pode-se observar períodos de aumento na temperatura ambiente diurna e irradiação solar acima da média do mês, conforme apresentado nas Figuras 13 e 14. A média de irradiação no mês de agosto foi de aproximadamente $1.384 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, e a temperatura média de aproximadamente 19°C .

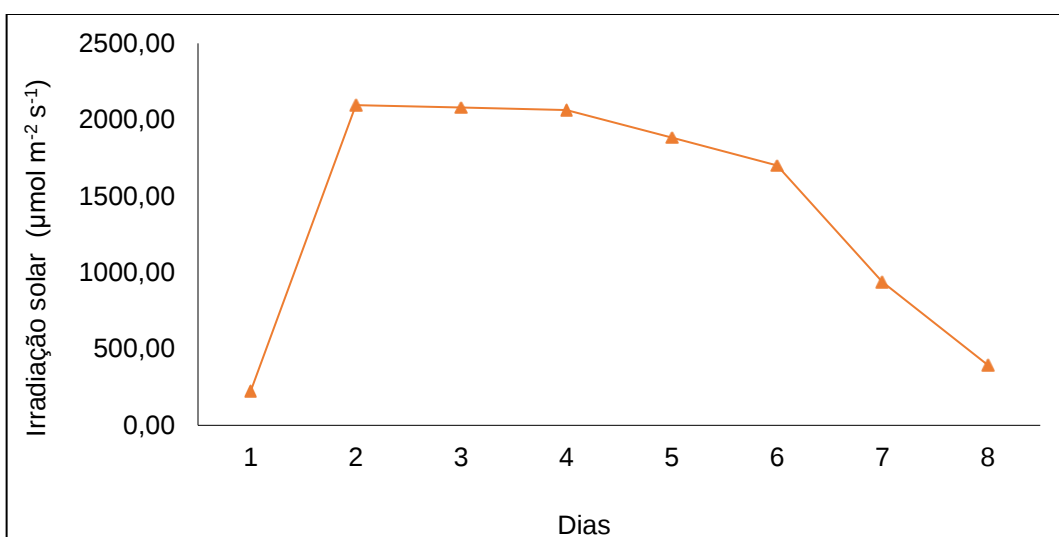


Figura 13 – Dados médios de incidência de irradiação solar (22 a 29 de agosto de 2016).

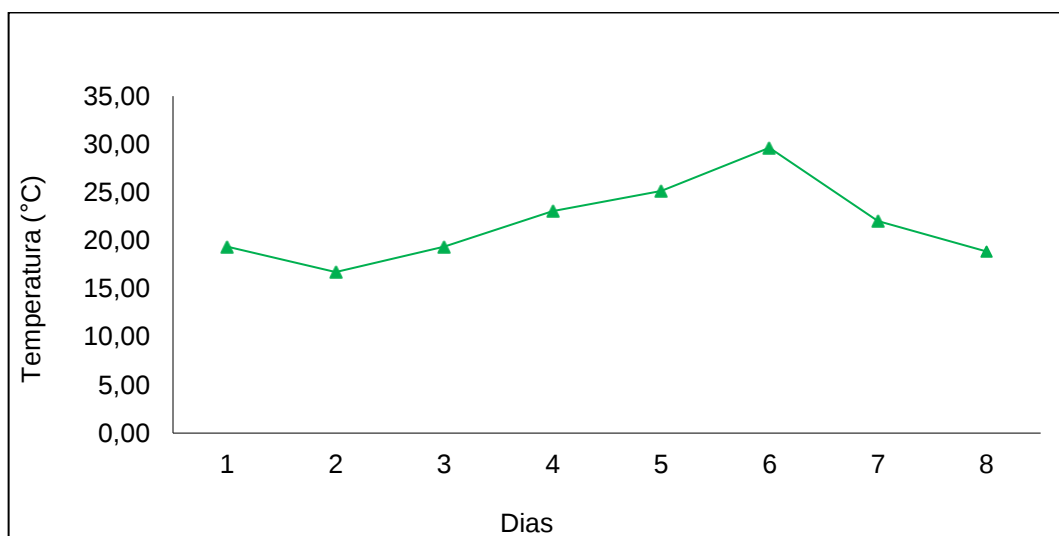


Figura 14 – Temperaturas médias diurnas (22 a 29 de agosto de 2016).

A irradiação solar no verão 2016 e 2017 variou de 2.742 até 5.027 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, dados fornecidos pela estação meteorológica da UNISC. A temperatura média e a incidência de radiação no período de reprodução (22 a 29 de agosto de 2016) favoreceram o processo de fotossíntese. Assim, as microalgas nativas do LGD se desenvolveram de forma satisfatória e o inóculo foi rapidamente obtido.

González-Barreiro e colaboradores [9] avaliaram o crescimento de *Synechococcus elongatus* e *Chlorella vulgaris* em meio enriquecido com os herbicidas atrazina e terbutrina. As culturas foram iluminadas com uma lâmpada fluorescente com uma radiação fotossintética ativa de $70 \pm 2 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e mantida, a qual substitui a irradiação solar presente no ambiente natural, a uma temperatura de incubação de $18 \pm 1 ^\circ\text{C}$.

5.2 Identificação das microalgas reproduzidas a partir da água do LGD

5.2.1 Identificação morfológica

O gênero predominante identificado através da microscopia no inóculo reproduzido a partir da água do LGD foi *Chlorella* sp. (Figura 15).

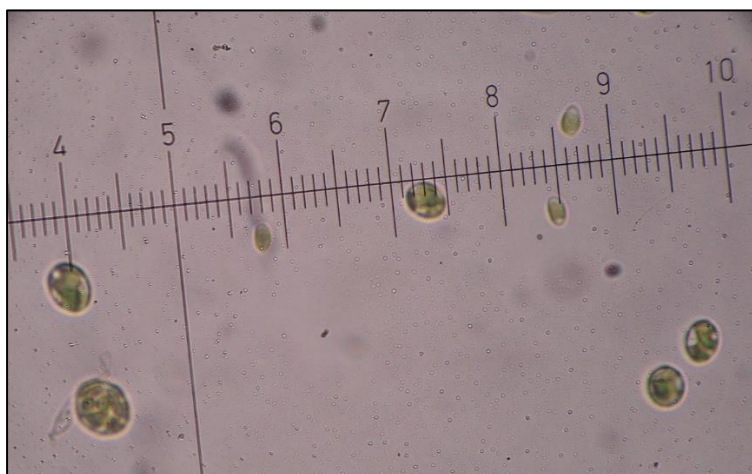


Figura 15 – Identificação morfológica com predominância do gênero *Chlorella*, aumento de 400x.

5.2.2 Identificação molecular

Hebert e colaboradores [117] mostraram que existem limitações significativas na identificação morfológica de espécies. A identificação molecular a nível de DNA, torna-se uma poderosa ferramenta para a discriminação de espécies de microalgas.

A identificação molecular foi realizada no inóculo com a presença das microalgas reproduzidas a partir da água do LGD. As espécies identificadas foram a *Parachlorella kessleri* (classe Trebouxiophyceae) e a *Lobochlamys segnis* (classe Chlorophyceae), Figuras 16 e 17, respectivamente.



Figura 16 – Imagem microscópica da microalga *Lobochlamys segnis*.

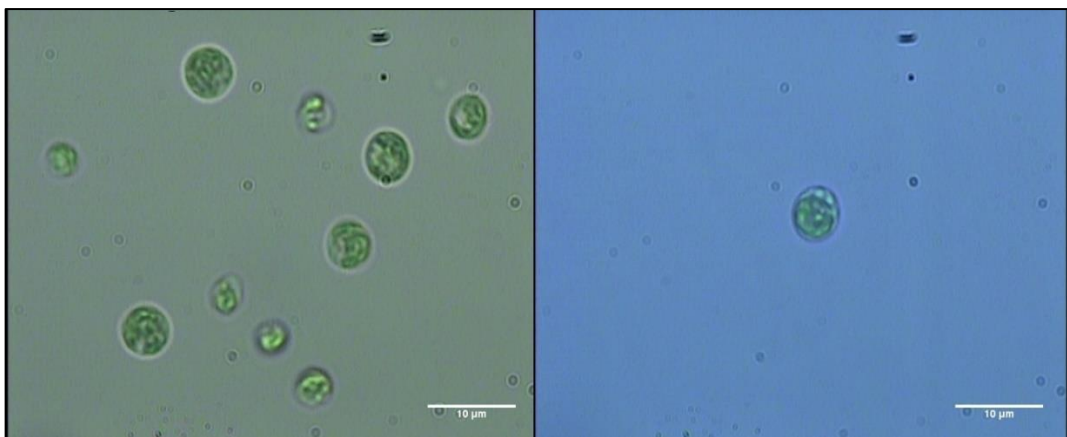


Figura 17 – Imagem microscópica da microalga *Parachlorella kessleri*.

A identificação molecular mostrou que o gênero *Chlorella* identificado, baseado na morfologia das microalgas (item 5.2.1), não é o gênero predominante do meio. O

gênero predominante identificado foi o *Parachlorella*, através da espécie *Parachlorella kessleri*. Essa espécie é reconhecida por conter uma elevada produção de óleo [118].

A espécie *Parachlorella kessleri* foi estudada no processo de biorremediação de retardadores de chama, os éteres difenílicos polibromados, nas seguintes condições: fotoperíodo 16:8 h, intensidade da luz $40 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, temperatura de $22 \pm 1 \text{ }^{\circ}\text{C}$, com rotação de 150 rpm. Percentuais de remoção variaram de 34 a 68% nos três congêneres avaliados, mostrando a capacidade de remediação da espécie [119].

Koutra e coautores [120] usaram a espécie *Parachlorella kessleri* e avaliaram a eficácia do cultivo em efluente de digestão anaeróbica, derivado de produtos lácteos. O estudo visou a remoção de nutrientes na condição estéril e não estéril do efluente. Não foram observadas diferenças entre os dois tipos de efluentes testados. Houve a assimilação de 49,7% de nitrogênio amoniacal e a remoção de aproximadamente 84% de fósforo total após o tratamento. Os resultados mostraram uma performance satisfatória.

5.3 Resultados dos estudos do processo de ficorremediação

Estudos preliminares foram conduzidos inicialmente para ambos os inseticidas, de modos distintos. Os resultados dos testes foram usados para tomada de ações para os experimentos seguintes.

5.4 Ficorremediação da bifentrina

5.4.1 Estudo preliminar do processo de ficorremediação de bifentrina

Testes preliminares foram realizados a fim de avaliar o comportamento das microalgas e avaliar se o processo de ficorremediação estava ocorrendo (Tabela 15). Amostras com a presença de microalgas e bifentrina, e presença de somente bifentrina, foram incubados durante 15 dias. Foi observado que nas amostras com presença de microalgas e bifentrina, e presença e ausência de NPK (AMB1 e AMB0) houve aproximadamente 94% de remoção.

Tabela 15 – Nutrientes remanescentes do meio líquido.

Amostras	COT e NT		Fotometria	CG-EM
	C total (mg L ⁻¹)	N total (mg L ⁻¹)	K (mg L ⁻¹)	Bifentrina remanescente (mg L ⁻¹)
				0,31 ^{b, c}
AMB1	45,41 ± 17,74 ^{a, e}	161,25 ± 61,76 ^{a, e}	229,94 ± 12,18 ^{a, e}	0,26 ^{b, d}
				0,26 ^{b, e}
AB1	35,07 ^{b, e}	127,80 ^{b, e}	134,68 ^{b, c}	0,46 ^{b, e}
				0,30 ^{b, c}
AMB0	45,20 ± 13,71 ^{a, e}	33,55 ± 14,23 ^{a, e}	72,99 ± 5,62 ^{a, e}	0,23 ^{b, d}
				0,36 ^{b, e}
AB0	19,51 ^{b, e}	8,24 ^{b, e}	< LOD ^{b, e}	0,70 ^{b, e}

^a n = 3; ^b n = 1;

^c após 5 dias de incubação; ^d após 10 dias de incubação; ^e após 15 dias de incubação;

AMB1 = amostras com presença de microalgas, bifentrina e NPK; AMB0 = amostras com presença de microalgas e bifentrina; AB1 = amostra com a presença de bifentrina e NPK; AB0 = amostra com a presença de somente bifentrina.

Valores de pH foram avaliados nos experimentos com as amostras com a presença de microalgas e bifentrina (AMB), somente com bifentrina (AB) e somente com microalgas (AM).

Nas amostras com presença de somente bifentrina, e avaliação da presença e ausência de NPK (AB1 e AB0) houve uma remoção que variou entre 86 a 90%. Comparando os resultados de bifentrina remanescentes nas amostras com presença de microalgas e bifentrina (AMB0 e AMB1), em diferentes dias de coleta (5, 10 e 15 dias de incubação) não houve diferença significativa entre as concentrações. Este resultado incitou a investigação da presença de bifentrina na biomassa e na parede do recipiente utilizado como reator dos experimentos.

Os resultados preliminares do total de biomassa seca e o percentual dos elementos C e N nas amostras estão discriminados na Tabela 16, após 15 dias de incubação.

A amostra AMB1 apresentou 50 mg L⁻¹ a mais de biomassa seca. Devido a esta diferença considerável, NPK foi adicionado nos experimentos seguintes. Não houve diferença entre a relação do C/N nas amostras AMB1 e AMB0, demonstrando que a composição deve ser similar apesar da massa obtida na presença de NPK ser maior.

Tabela 16 – Total de biomassa e elementos da biomassa.

Amostras	Gravimetria	Análise elementar (CN)	
	Biomassa (mg L ⁻¹)	C (%)	N (%)
AMB1	310,00 ^a	35,91 ^a	5,70 ^a
AMB0	260,00 ^a	39,75 ^a	6,29 ^a

^a n = 1;

AMB1 = amostras com presença de microalgas, bifentrina e NPK; AMB0 = amostras com presença de microalgas e bifentrina.

Como a manutenção do inóculo durante 17 meses foi feita usando NPK, a adição deste substrato no processo de fitorremediação, auxiliou o crescimento das microalgas, uma vez que já estavam adaptadas à essas condições e pode ter auxiliado no aumento da biomassa.

A Figura 18 apresenta os valores de pH nas amostras durante os dias de incubação. Os valores de pH iniciais para as amostras tiveram um decréscimo significativo durante o processo.

Resultados diferentes foram obtidos no trabalho de Chinnasamy e colaboradores [121], onde algas verdes cresceram em efluente cujo o pH variou de 6,54 para 7,18. A faixa de pH entre 7 e 9 é a condição em que a maioria das algas crescem favoravelmente [67].

Qiu e coautores [79] em seu estudo mostram que as taxas de crescimento caíram significativamente nos cultivos onde o pH foi ajustado acima de 7. O pH neutro foi mais favorável na taxa de crescimento da espécie *Chlorella sorokiniana*. Este resultado afirma que valores de pH perto da neutralidade são ótimos para o crescimento de microalgas.

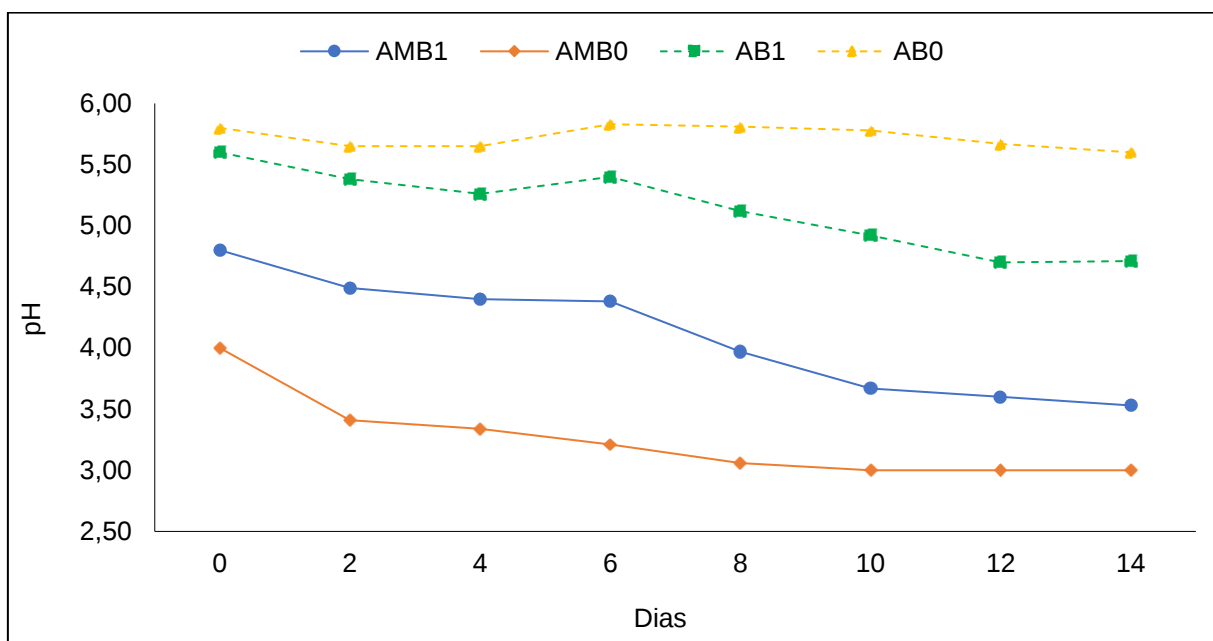


Figura 18 – Monitoramento do pH das amostras dos testes preliminares com bifentrina. AMB1 = amostras com presença de microalgas, bifentrina e NPK; AMB0 = amostras com presença de microalgas e bifentrina; AB1 = amostra com a presença de bifentrina e NPK; AB0 = amostra com a presença de somente bifentrina; n = 1.

5.4.2 Estudo do processo de fitorremediação de bifentrina com controle de pH

Os resíduos de agrotóxicos são comumente encontrados no ambiente aquático como resultado de derrames ou escoamentos de pulverização agrícola e através da indústria e dos esgotos domésticos. Fitorremediação é uma alternativa promissora, usando organismos vivos, as microalgas. Estes microrganismos têm a capacidade de remover agrotóxicos na água [18, 77]. Os experimentos foram conduzidos com o foco na remediação de bifentrina. As microalgas foram expostas ao agrotóxico, em um processo de incubação de 20 dias, para obtenção de uma quantidade de biomassa seca significativa para posterior avaliação.

O monitoramento do pH também foi realizado, conforme a Figura 19. Pode-se observar que a partir do início dos experimentos o pH foi decrescendo tanto nas amostras com a presença de microalgas e bifentrina (AMB) como nas amostras com a presença de somente bifentrina (AB). Nas amostras AMB o pH variou de 5,41 no início do experimento chegando até 3,01 passados 20 dias de cultivo. Nas amostras AB a variação do pH foi de 5,65 até 4,51 após os 20 dias de incubação.

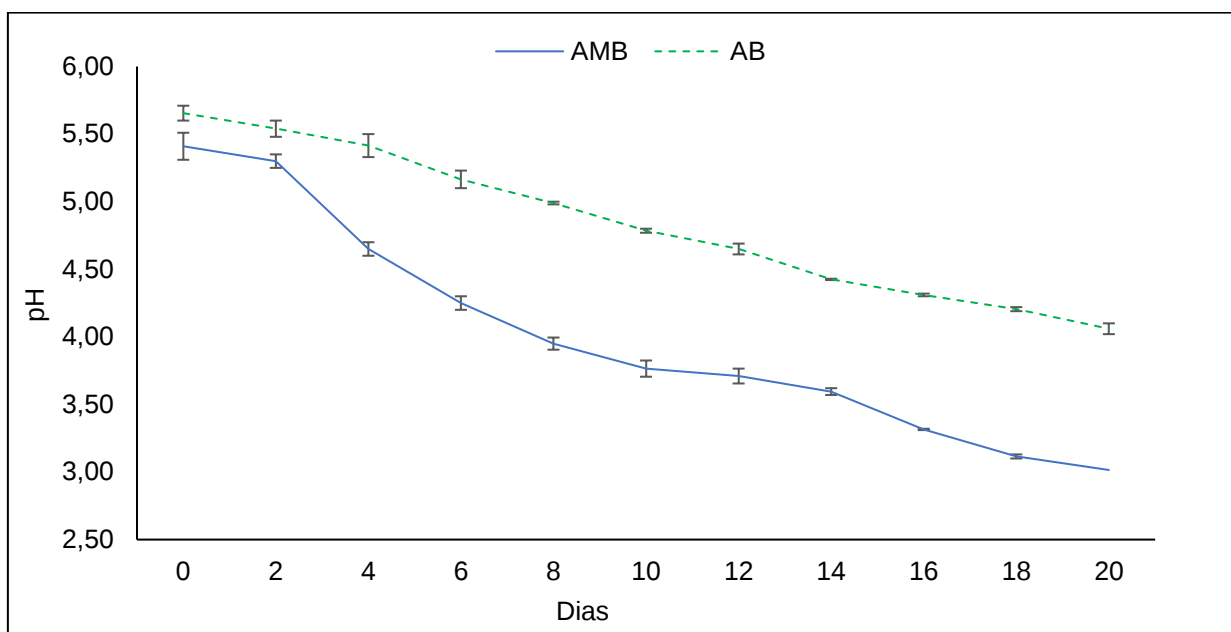


Figura 19 – Monitoramento do pH do meio das amostras.

AMB = amostras com a presença de microalgas e bifentrina; AB = amostras com a presença de somente bifentrina.

n = 3.

Matamoros e Rodríguez [19] avaliaram a remoção de herbicidas, fungicidas e inseticidas por fitorremediação e observaram que o pH variou de 7,8 a 8,8 nos reatores com alimentação contínua e 8,9 a 9,8 nos em batelada.

Resultados de pH finais estavam ácidos. Os valores nas amostras com presença de microalgas e bifentrina ficaram em torno de 3. Sugere-se que a diminuição do pH pode ter ocorrido devido à presença de metabólitos, conforme evidenciado no estudo de Chen e colaboradores [44], e/ou devido à presença de seres heterótrofos no meio, uma vez que o inóculo não foi esterilizado. Os autores avaliaram a degradação da bifentrina em meio líquido. Para a extração dos metabólitos do meio, foi realizada uma acidificação até pH 2. A avaliação da presença de metabólitos no meio será apresentada no item 5.4.7.

5.4.3 Rendimento de biomassa e percentual de nutrientes remanescentes

A Tabela 17 mostra os resultados de biomassa seca e análise elementar. Não houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre as amostras, como esperado, para estas

análises. Os 20 dias de cultivo aumentaram a concentração de biomassa final, com exceção da amostra AMB75, meio pH 7,5.

Nas amostras com presença de somente bifentrina, nenhuma biomassa foi observada. O resultado das amostras com a presença de somente microalgas (AM) foi igual a $418,75 \pm 119,73 \text{ mg L}^{-1}$ de biomassa seca, não havendo diferença significativa no teor de biomassa seca encontrado com relação as amostras. A média da relação C/N variou de 1,12 a 2,31% nas amostras, não apresentando diferença significativa ($p > 0,05$). Este resultado mostra que deve haver similaridade entre a composição da biomassa obtida nos diferentes meios de pH.

Tabela 17 – Biomassa total e percentual de nutrientes na biomassa.

Amostras	Gravimetria	Análise Elementar (CHN)		
	Biomassa (mg L^{-1})	C (%)	H (%)	N (%)
AMBS, meio sem ajuste	$470,67 \pm 203,87$	$17,63 \pm 3,35$	$4,01 \pm 0,48$	$10,00 \pm 1,79$
AMB65, meio pH 6,5	$500,00 \pm 122,06$	$13,93 \pm 5,28$	$3,33 \pm 0,53$	$9,07 \pm 1,25$
AMB70, meio pH 7,0	$390,48 \pm 115,00$	$10,53 \pm 3,71$	$2,93 \pm 0,29$	$9,32 \pm 0,49$
AMB75, meio pH 7,5	$295,24 \pm 41,00$	$16,44 \pm 2,38$	$3,14 \pm 0,48$	$7,11 \pm 1,21$

AMB = amostras com a presença de microalgas e bifentrina;
 $n = 3$;
 $p > 0,05$.

No estudo de Chinnasamy e coautores [121] a produção de biomassa em águas residuais foi avaliada utilizando um consórcio de microalgas nativas, com duas diferentes doses de CO_2 (ambiente e 6%) e temperatura (15 e 25 °C) utilizando iluminação constante de aproximadamente $81 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, com uma concentração inicial do inóculo de aproximadamente 100 mg L^{-1} . Após 9 dias de incubação a condição de 25 °C prevaleceu combinado com 6% de CO_2 resultando 1427 mg L^{-1} de biomassa. Quando utilizado apenas ar o resultado em biomassa foi menor, 800 mg L^{-1} . Resultado mostra que o perfil fotoautotrófico, com aumento da fonte de carbono, foi essencial para o crescimento das microalgas.

Matamoros e Rodríguez [19] em seu estudo utilizaram reatores de alimentação contínua com predominância de *Chlorella* sp. Uma concentração média de biomassa final foi obtida, com concentrações de $150 \pm 48 \text{ mg L}^{-1}$, $560 \pm 200 \text{ mg L}^{-1}$ e $634 \pm 140 \text{ mg L}^{-1}$ para 2, 4 e 8 dias de incubação, respectivamente, com concentração inicial de 100 mg L^{-1} . Após 10 dias de incubação nos reatores em bateladas, as microalgas cresceram de 500 para 700 mg L^{-1} . Água de escoamento agrícola foi utilizada nos experimentos, como fonte de nutrientes, e foi coletada em canais de drenagem agrícola.

5.4.4 Teor de bifentrina na biomassa seca

A biomassa microalgal tem a capacidade de bioissorver compostos orgânicos, conforme evidencia a Tabela 18. Os resultados de percentual de bifentrina nas amostras variaram de 14 a 26% e não foi observada diferença significativa ($p > 0,05$). O percentual encontrado na biomassa é em relação ao total adicionado no início do ensaio (5 mg L^{-1}). Não foi encontrado teor de bifentrina na biomassa seca do branco (meio sem bifentrina).

Tabela 18 – Percentual de bifentrina na biomassa.

Amostras	Bifentrina (%)
AMB, meio sem ajuste	$26,13 \pm 10,91$
AMB65, meio pH 6,5	$19,23 \pm 6,97$
AMB70, meio pH 7,0	$13,85 \pm 5,70$
AMB75, meio pH 7,5	$15,90 \pm 5,90$

AMB = amostras com a presença de microalgas e bifentrina;
 $n = 3$;
 $p > 0,05$.

Fungicidas foram avaliados em relação ao percentual de remoção na presença de biomassa para avaliação do processo de bioissorção. Para o propamocarbe, a presença de biomassa viva de *Chlorella vulgaris* diminuiu a concentração do meio em

torno de 30% se comparado com o controle sem microalga e a presença de biomassa morta, após 60 min de exposição. Apesar do caráter hidrofílico do fungicida ($\text{Log } K_{ow} = 0,84$), o período curto foi insuficiente para ativar outros processos como biodegradação [18]. O percentual máximo de bifentrina encontrado na biomassa das microalgas nativas do LGD, do presente estudo, foi um pouco menor (26,13%) do que o encontrado para o fungicida propamocarbe. Uma vez que a bifentrina possui um valor de $\text{Log } K_{ow} > 6$, ela poderia ter apresentado um percentual de bioissorção maior, devido à maior afinidade com a biomassa (fase orgânica).

Bioissorção envolve um metabolismo físico-químico independente, que inclui outros processos como absorção e adsorção. Estudos revelam que o primeiro passo na absorção de compostos orgânicos é principalmente um processo envolvendo uma partição química na biomassa hidrofóbica [18].

A primeira etapa para a absorção de herbicidas na sorção de compostos orgânicos é um processo passivo envolvendo a partição de um composto químico para a biomassa hidrofóbica. Baseado no coeficiente de partição da bifentrina (> 6), ela tem caráter hidrofóbico, o que explica o percentual significativo encontrado na biomassa das amostras. González-Barreiro e colaboradores [9] evidenciaram a partir de um outro herbicida (terbutrina), com um coeficiente de partição intermediário (3,49), que esta condição é favorável a retirada do meio pelas células algais.

5.4.5 Teor de bifentrina nas amostras com a presença de somente bifentrina

Amostras com presença de somente bifentrina foram avaliadas a fim de verificar se havia algum processo de degradação. Na Figura 20 é possível verificar que um percentual significativo de bifentrina foi biodegradada, seguida pela deposição no vidro do reator. Não houve diferença significativa entre o percentual de bifentrina entre as amostras ($p > 0,05$), nas três fontes avaliadas (meio líquido, vidro e biomassa), uma vez que os desvios elevados foram o padrão.

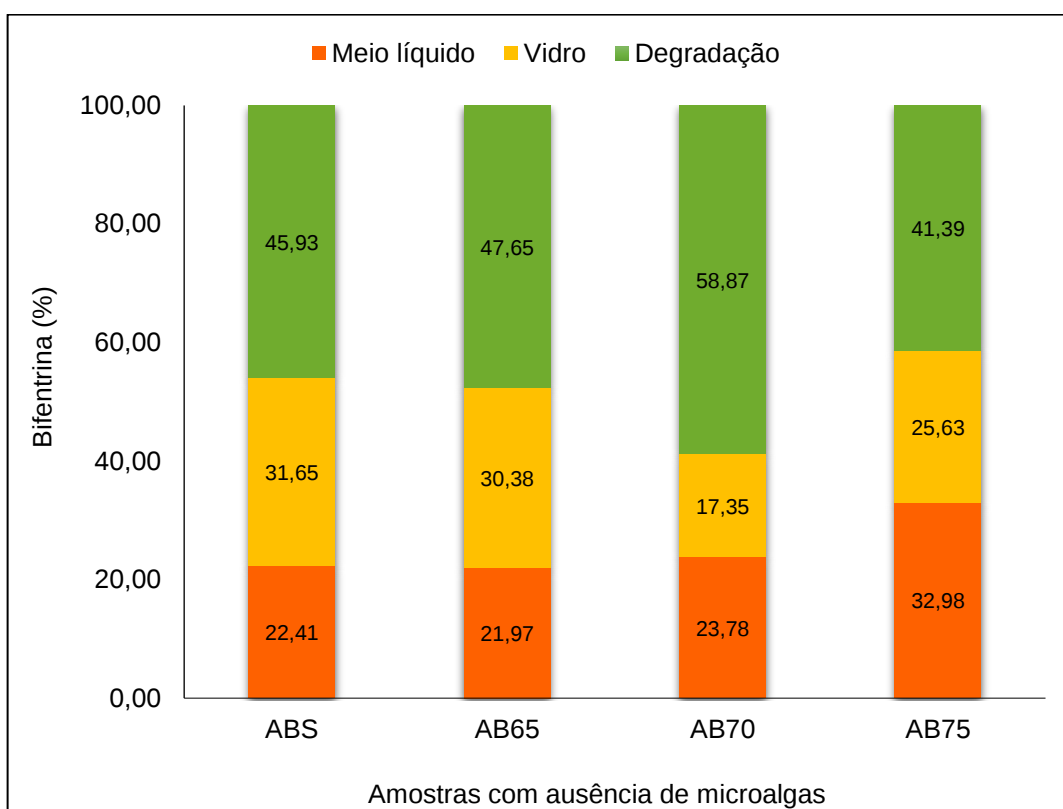


Figura 20 – Percentual de bifentrina nas amostras com a presença de somente bifentrina.

ABS = presença de somente bifentrina sem ajuste de pH;

AB65 = presença de somente bifentrina com meio pH 6,5;

AB70 = presença de somente bifentrina com meio pH 7,0;

AB75 = presença de somente bifentrina com meio pH 7,5;

n = 3;

p > 0,05.

Os resultados obtidos mostraram que um percentual significativo de bifentrina (41,39 – 58,87%) foi degradada sem a presença de microalgas no meio. A fotodegradação é um processo que, sob condições naturais simuladas, estimula a degradação de piretróides. Fatores como concentração, sistema de exposição, tempo de irradiação, fonte e intensidade da luz, podem interferir e acelerar o processo [40, 122].

Chen e colaboradores [44] realizaram um estudo, onde não foi observada degradação significativa de bifentrina na água sem microalgas, sem a presença de luz, utilizando meio de sal mineral como solução nutritiva. Todavia o presente estudo com bifentrina encontrou percentuais de degradação que variaram de 41,39 a 58,87%. Os ensaios de fitorremediação de bifentrina usaram lâmpadas fluorescentes com

intensidade da luz de aproximadamente $20 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Este tipo de luz pode ser um fator que contribuiu para a degradação de bifentrina nas amostras com a presença de somente bifentrina.

Houve diferença de degradação entre as amostras com presença de somente bifentrina e as amostras com presença de microalgas e bifentrina, na remoção do meio. O percentual de degradação nas amostras com presença apenas da bifentrina foi de 15 a 37% menor, nos diferentes meios avaliados.

Em um estudo realizado por Ardal Ardal [18], a concentração de metalaxil encontrada após o tratamento não apresentou diferença entre a amostra e o controle (ausência de microalgas). Neste caso a presença das microalgas não aumentou a remoção do fungicida no meio, mostrando com isso a indiferença delas.

O percentual de bifentrina depositada na parede do reator alterou entre as amostras com presença de apenas bifentrina (AB) e as amostras com presença de microalgas e bifentrina (AMB). O percentual encontrado nas amostras AB foi 2 a 8 vezes maior que as amostras AMB, em todos os meios com diferentes pH.

Segundo Albaseer e coautores [123], os piretróides são fortemente adsorvidos na parede de materiais orgânicos, do recipiente, recolhimento e armazenamento. Alguns fatores, como a concentração da amostra, material do recipiente (vidro) e o período de espera, podem aumentar a perda do analito.

5.4.6 Teor de bifentrina nas amostras com presença de microalgas e bifentrina

As amostras com a presença de microalgas e bifentrina foram comparadas as amostras com presença de somente bifentrina a fim de verificar uma vantagem no uso destes microrganismos na remoção de bifentrina da água. Resultados entre as diferentes condições de pH testadas não apresentaram diferenças significativas ($p > 0,05$), conforme Figura 21. Os desvios padrões variaram de 9 a 47% na quantidade encontrada na biomassa e meio líquido, portanto, torna-se difícil encontrar diferença

entre as amostras. Em relação à quantidade depositada na parede do vidro, a variação chegou em 70%.

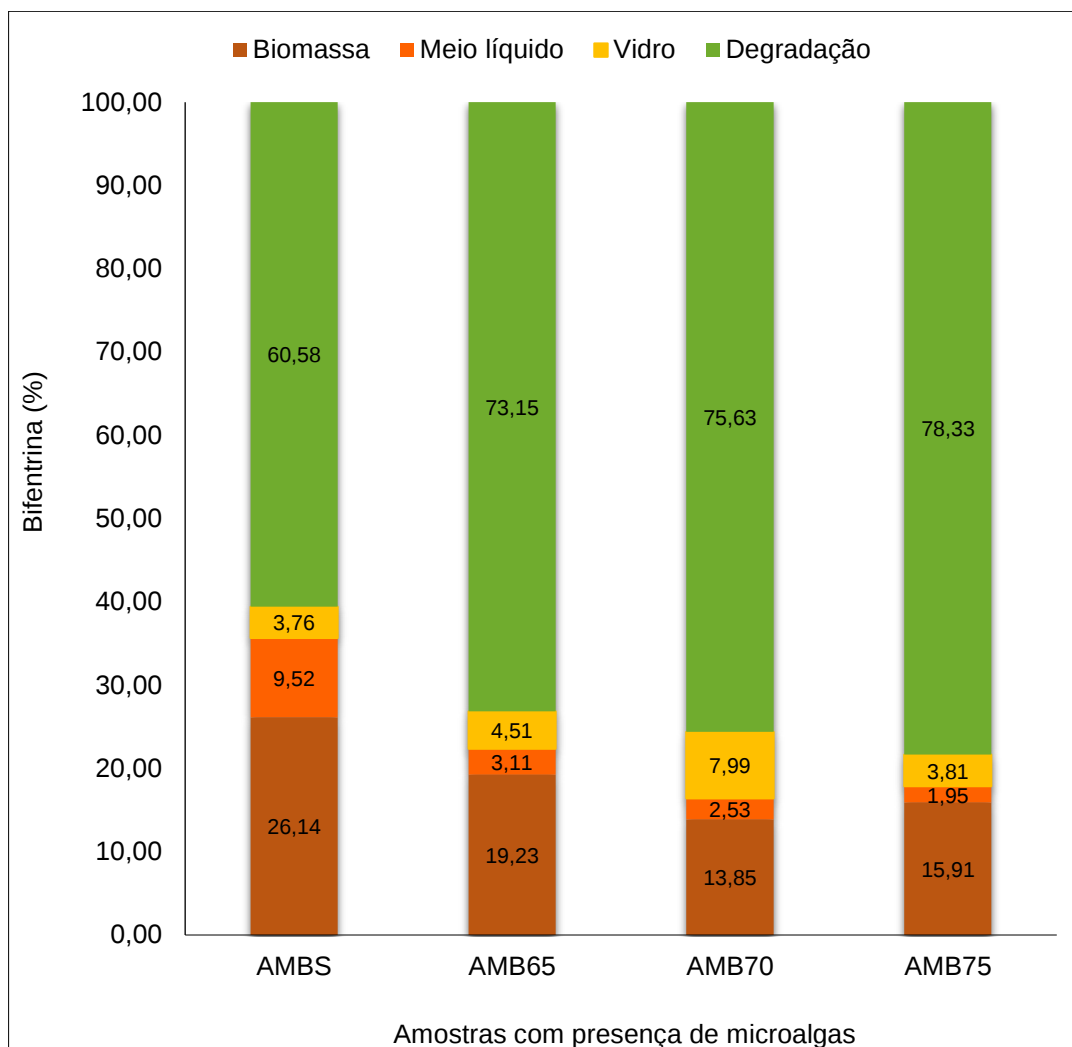


Figura 21 – Percentual de bifentrina nas amostras com presença de microalgas e bifentrina. AMBS = presença de microalgas e bifentrina sem ajuste de pH; AMB65 = presença de microalgas e bifentrina com meio pH 6,5; AMB70 = presença de microalgas e bifentrina com meio pH 7,0; AMB75 = presença de microalgas e bifentrina com meio pH 7,5; n = 3; p > 0,05.

Com base nas diferenças positivas observadas em relação ao percentual de degradação (> 60%), podemos afirmar que as microalgas reproduzidas a partir do reservatório de água doce aumentaram o percentual de degradação. Em relação ao meio aquoso e parede do reator, não foi encontrada concentração significativa de bifentrina nas amostras com a presença de somente microalgas (branco). Resultados encontrados ficaram abaixo do LOQ.

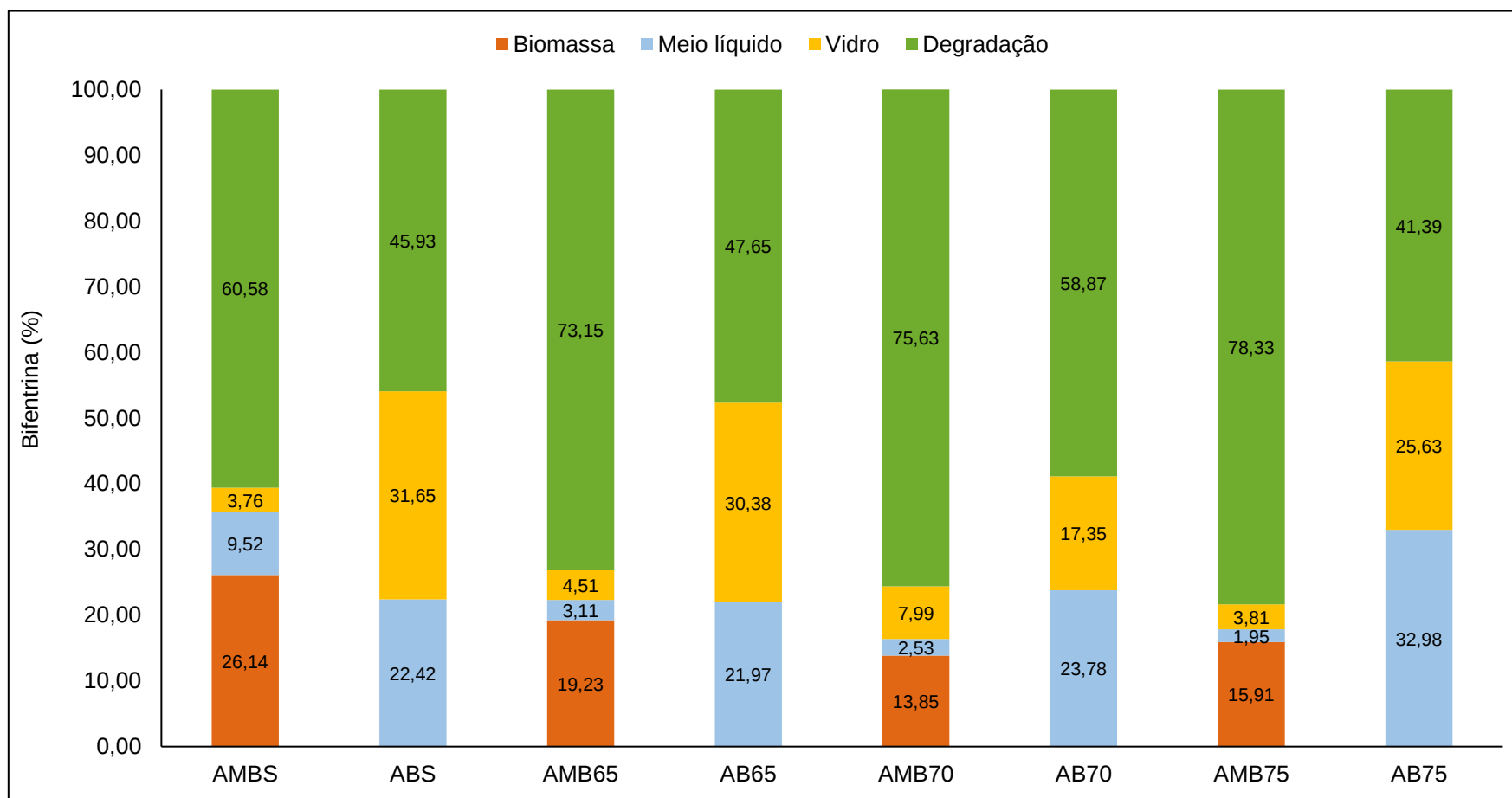


Figura 22 – Percentual de bifentrina nas amostras com a presença e ausência de microalgas e presença de bifentrina.

ABS = presença de somente bifentrina sem ajuste de pH; AMBS = presença de microalgas e bifentrina sem ajuste de pH;
 AB65 = presença de somente bifentrina com meio pH 6,5; AMB65 = presença de microalgas e bifentrina com meio pH 6,5;
 AB70 = presença de somente bifentrina com meio pH 7,0; AMB70 = presença de microalgas e bifentrina com meio pH 7,0;
 AB75 = presença de somente bifentrina com meio pH 7,5; AMB75 = presença de microalgas e bifentrina com meio pH 7,5;
 n = 3;
 p > 0,05.

A Figura 22 contempla os resultados das amostras com a presença de microalgas e bifentrina e as amostras com a presença de somente bifentrina, nos diferentes meios avaliados, a fim de facilitar visualmente as diferenças.

Bifentrina foi removida com um percentual acima de 85%, contemplando os processos de biodegradação (meio líquido) e bioissorção (biomassa), além de um pequeno percentual aderido na parede do vidro. Um percentual significativo presente na biomassa é característico do valor de $\text{Log } K_{ow} > 6$, mostrando a grande afinidade com a fase orgânica (Figura 23). Este resultado é explicado da mesma forma que Matamoros e Rodríguez [19] relataram para a fitorremediação do clorpirifós. Este inseticida possui um $\text{Log } K_{ow} > 4$ e em função disso foi removido da água e biomassa, totalizando 50% de remoção.

Relatos da eficiência das microalgas na mitigação de agrotóxicos em água associado a bioissorção também envolvem o herbicida fluroxipir utilizando *Chlamydomonas reinhardtii* [107] e o herbicida isoproturon utilizando *Scenedesmus obliquus* e *Scenedesmus quadricauda* [77]. Para o fluroxipir, no primeiro dia foi encontrado 35 ng mg^{-1} e no último dia (5º dia) foi encontrado aproximadamente $3,5 \text{ ng mg}^{-1}$. Determinações do herbicida em meio aquoso confirmaram o aumento do percentual de biodegradação com o passar dos cinco dias (14 – 57%). Para o isoproturon, após 4 dias de incubação nenhuma diferença significativa foi observada entre as espécies. No total 58%, do herbicida foi removido do meio líquido, contemplando a quantidade que desapareceu e a que foi quantificada dentro da biomassa. Em nenhum dos estudos acima foi avaliado o pH do meio.

5.4.7 Avaliação de presença de metabólitos no processo de fitorremediação com bifentrina

O meio das amostras com bifentrina e microalgas, foram analisadas quanto a presença de metabólitos empregando a técnica analítica de alta resolução (CG-EM/EM). Os cromatogramas obtidos não apresentaram indícios da presença de moléculas já identificadas por Chen e coautores [44] como produtos de degradação. Os picos foram comparados à biblioteca NIST, e ácidos e ésteres metílicos de ácidos

graxos de cadeia longa foram identificados com uma probabilidade baixa que variou de 18 a 83%. Entende-se que estes compostos não poderiam ser provenientes da degradação da bifentrina, e uma possível contaminação das vidrarias utilizadas não pode ter ocorrido, porque todas foram enxaguadas com acetona após a lavagem. A Figura 23 mostra o cromatograma após 3 dias de cultivo, o qual foi similar aos outros (6 e 20 dias), porém a intensidade dos picos foi um pouco maior.

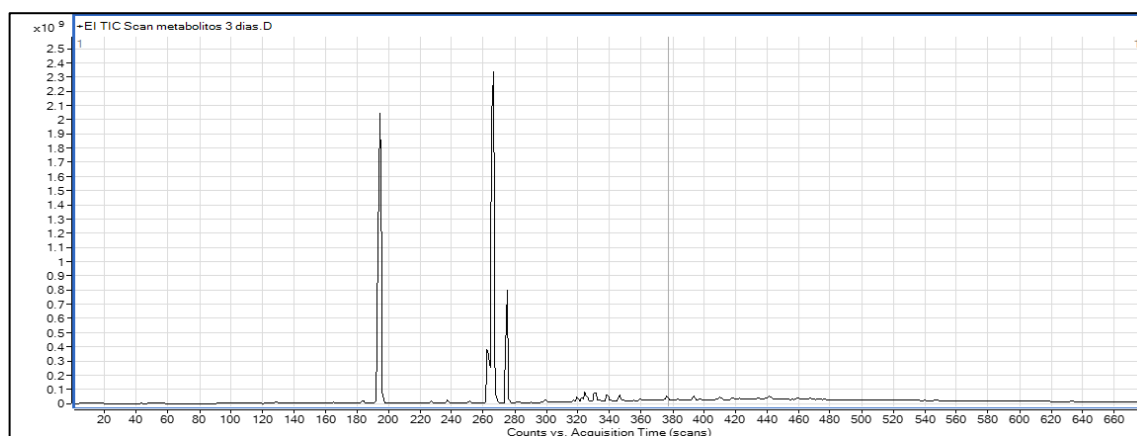


Figura 23 – Cromatograma da identificação dos metabólitos formadas a partir da degradação da bifentrina (3 dias de cultivo).

Os produtos de degradação da bifentrina identificados por Chen e colaboradores [44] foram provenientes da quebra e rearranjos da estrutura da bifentrina, utilizando uma concentração inicial de 50 mg L⁻¹. O presente estudo utilizou o processo com uma concentração de 5 mg L⁻¹, e esta concentração foi avaliada. A concentração 10 vezes menor pode ter levado a não identificação dos metabólitos.

5.4.8 Resultados do processo de fitorremediação com planejamento fatorial para bifentrina

A Tabela 19 mostra os resultados de biomassa seca e percentual de bifentrina determinado após o processo de fitorremediação do planejamento fatorial 2², contemplando as variáveis percentual de inóculo (10 e 20%) e fotoperíodo (12:12 e 18:6 h).

Nas amostras com presença de somente bifentrina, nenhuma biomassa foi observada, conforme era de se esperar. Não houve diferença significativa ($p > 0,05$)

na biomassa obtida entre as amostras com somente microalgas (AM1012, AM2012, AM1018 e AM1018) se comparadas com as amostras com microalgas e bifentrina (AMB1012, AMB2012, AMB1018 e AMB2018) nos dois fotoperíodos testados.

Tabela 19 – Resultados do planejamento fatorial da bifentrina.

Amostras	Gravimetria		CG-EM		
	(mg L ⁻¹)		Bifentrina (%)		
	Biomassa	Biomassa	Meio líquido	Vidro	Degradação
AMB1012	212,50 ± 16,54	3,76 ± 0,71	0,87 ± 0,35	1,09 ± 0,10	94,28 ± 0,70
AMB2012	418,75 ± 43,75	4,79 ± 1,06	0,95 ± 0,28	1,54 ± 0,60	92,72 ± 0,56
AB12	< LOD	< LOD	39,73 ± 1,51	9,96 ± 0,18	50,32 ± 1,49
AM1012	210,00 ± 20,34	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD
AM2012	387,67 ± 34,87	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD
AMB1018	341,67 ± 3,61	3,42 ± 1,05	0,90 ± 0,19	0,71 ± 0,03	94,96 ± 1,20
AMB2018	435,42 ± 23,66	2,90 ± 0,78	0,58 ± 0,30	0,33 ± 0,05	96,19 ± 0,76
AB18	< LOD	< LOD	15,07 ± 2,69	7,28 ± 2,25	77,65 ± 1,24
AM1018	339,00 ± 5,60	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD
AM2018	440,65 ± 17,56	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD

AMB1012 = presença de microalgas (10%) e bifentrina na condição de fotoperíodo 12:12 h;

AMB2012 = presença de microalgas (20%) e bifentrina na condição de fotoperíodo 12:12 h;

AB12 = presença de somente bifentrina na condição de fotoperíodo 12:12 h;

AM1012 = presença de somente microalgas (10%) na condição de fotoperíodo 12:12 h;

AM2012 = presença de somente microalgas (20%) na condição de fotoperíodo 12:12 h;

AMB1018 = presença de microalgas (10%) e bifentrina na condição de fotoperíodo 18:6 h;

AMB2018 = presença de microalgas (20%) e bifentrina na condição de fotoperíodo 18:6 h;

AB18 = presença de somente bifentrina na condição de fotoperíodo 18:6 h;

AM1018 = presença de somente microalgas (10%) na condição de fotoperíodo 18:6 h;

AM2018 = presença de somente microalgas (20%) na condição de fotoperíodo 18:6 h;

LOD = Limite de detecção;

n = 3.

As variáveis avaliadas foram testadas e os efeitos avaliados. Em relação ao total de biomassa obtida (Figura 24), houve diferença significativa ($p < 0,05$) no efeito observado na variável inóculo, fotoperíodo e também na combinação entre ambas.

O maior efeito observado foi na variação do inóculo. O efeito foi positivo e mostrou que 20% de inóculo adicionado no início do processo de fitorremediação, aumentou a quantidade de biomassa obtida no final em 27% no fotoperíodo 18:6 h e 100% no fotoperíodo 12:12 h, se comparado com 10% de inóculo adicionado.

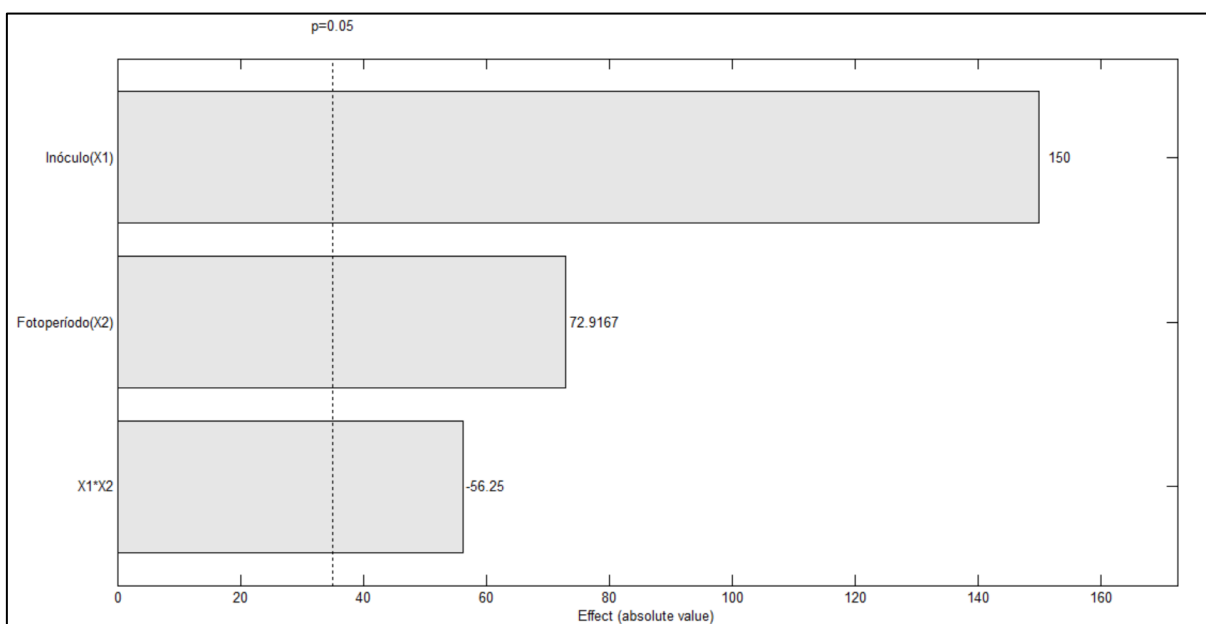


Figura 24 – Diagrama de Pareto dos efeitos das variáveis no total de biomassa (mg L^{-1}) para a bifentrina.

González-Fernández e colaboradores [124] estudaram os cenários I ($23\text{ }^{\circ}\text{C}/14\text{ h}$ luz), II $15\text{ }^{\circ}\text{C}/14\text{ h}$ luz) e III ($15\text{ }^{\circ}\text{C}/11\text{ h}$ luz) com variação de temperatura e fotoperíodo ($74\text{ }\mu\text{mol m}^{-2}\text{ s}^{-1}$), e avaliaram como estas condições influenciaram o crescimento de microalgas. Durante os 9 dias de incubação, a biomassa dobrou em todos os cenários. Porém no cenário I as microalgas cresceram mais rapidamente, alcançando no sexto dia, o crescimento máximo. Temperatura e tempo de exposição na luz podem ter interferido positivamente no crescimento. No processo de fitorremediação da bifentrina, no presente estudo, a biomassa aumentou aproximadamente 130 mg L^{-1} , no fotoperíodo 18:6 h se comparado ao 12:12 h, no percentual menor de inóculo adicionado.

Em relação ao percentual de degradação da bifentrina, o diagrama de Pareto (Figura 25) mostra que houve diferença significativa ($p < 0,05$) na variável fotoperíodo e na combinação das duas. Todavia na variável inóculo não houve diferença significativa ($p > 0,05$) nos percentuais 10 e 20% adicionados no início da fitorremediação.

Os gêneros *Chlorella* e *Scenedesmus* foram usados para fitorremediar pentaclorobenzeno e o endossulfan no estudo de Matamoros e Rodríguez [19]. O processo utilizou fotoperíodo de 12:12 h e uma concentração inicial de inóculo de 100

mg L⁻¹. Além disso foi avaliado a presença de microalgas e do composto e também a presença isolada dos compostos. O fungicida apresentou melhores resultados de remoção na presença isolada (99%) do que na presença de microalgas (55%). A presença de microalgas pode reduzir a foto-oxidação e fotodegradação do composto através da bioissorção nas microalgas. O inseticida apresentou melhores resultados de remoção na presença de microalgas, de 91 para 99%.

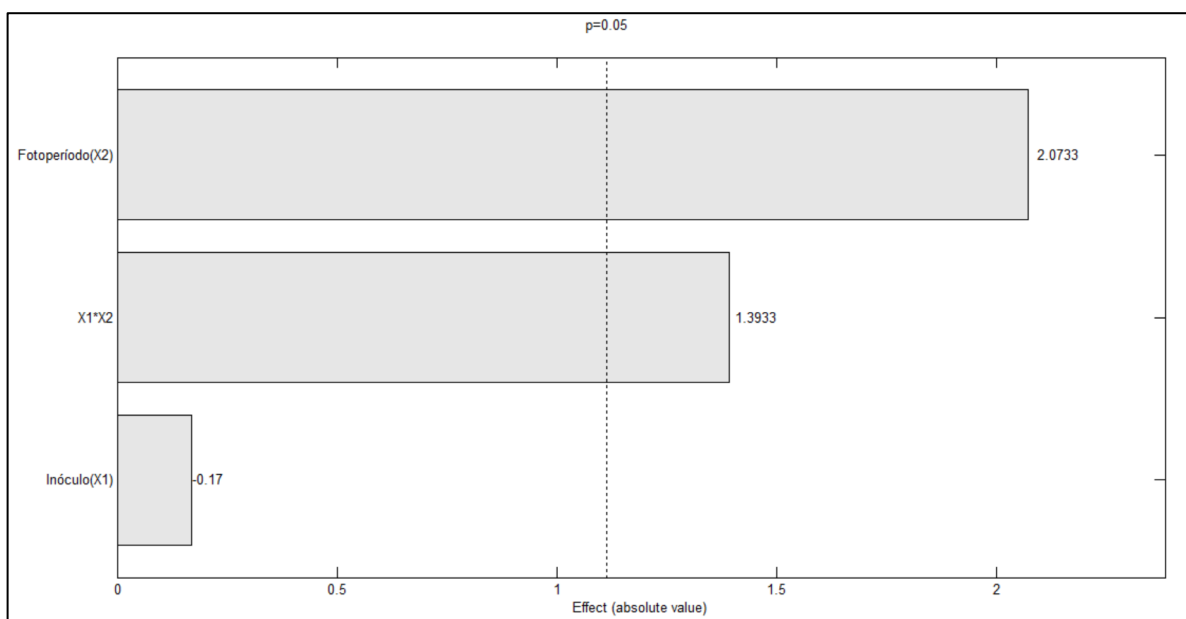


Figura 25 – Diagrama de Pareto dos efeitos das variáveis na degradação (%) para a bifentrina.

No caso da bifentrina avaliada no presente estudo, 50% e 77% foram removidos nas amostras com a presença apenas da bifentrina, nos fotoperíodos 12:12 e 18:6 h, respectivamente. Sugere-se que o processo de fotodegradação pode ter ocorrido com a bifentrina, conforme os estudos anteriores e observado por Tariq e colaboradores [40].

Na presença das microalgas, bifentrina teve um percentual de biodegradação elevado, acima de 90%. O percentual presente na biomassa variou de 2,90 – 4,79% em todas as variáveis. Devido à grande afinidade com a fase orgânica ($\text{Log } K_{ow} > 6$), o percentual baixo bioissorvido pode ter ocorrido devido aos 20 dias de incubação. Longos dias de incubação podem favorecer o desprendimento do composto da biomassa. Esperava-se encontrar mais bifentrina bioissorvida na biomassa.

Um estudo realizado por Zhang e coautores mostrou que com o passar dos dias de cultivo (5 dias), o percentual de fluroxipir ($\text{Log } K_{ow} = 5,04$) acumulado na biomassa reduziu 90%.

5.5 Ficorremediação do imidacloprido

5.5.1 Estudo preliminar do processo de ficorremediação de imidacloprido

A Tabela 20 evidencia que mais que 60% do total de imidacloprido adicionado nas diferentes concentrações testadas, foi encontrado no meio aquoso, e menos que 10% bioissorvido na biomassa seca.

Tabela 20 – Total de biomassa seca e percentual de imidacloprido encontrado em cada meio.

Amostras	Concentração inicial adicionada (mg L ⁻¹)	Gravimetria Biomassa (mg L ⁻¹)	CLAE-DAD		
			Imidacloprido (%)		
			Meio aquoso	Biomassa	Parede do reator
AMI1	3,50	156,25	80,00	7,79	< LOD
AI1	3,50	0,00	71,01	0,00	< LOD
AMI2	7,00	175,00	74,82	8,94	< LOD
AI2	7,00	0,00	68,12	0,00	< LOD
AMI3	14,00	187,50	78,87	8,70	< LOD
AI3	14,00	0,00	66,11	0,00	< LOD
AMI4	21,00	187,50	79,45	8,69	< LOQ
AI4	21,00	0,00	77,63	0,00	< LOQ

AMI = amostras com a presença de microalgas e imidacloprido; AI = amostras com a presença de somente imidacloprido
n = 1.

O percentual de degradação nas amostras (AI e AMI) variou de 12 a 33%. O total de biomassa seca foi maior nas amostras com maior concentração de imidacloprido e o percentual de inseticida na biomassa ficou similar entre as amostras. Como os resultados de imidacloprido entre as amostras (meio aquoso e biomassa) não apresentaram diferenças significativas, optou-se para os experimentos seguintes, pela utilização de uma maior concentração, devido à necessidade de obtenção de

maior concentração de biomassa final e resultados analíticos dentro da faixa de trabalho da curva analítica.

A Figura 26 evidencia o monitoramento do pH das amostras durante o período de incubação. É possível visualizar que diferente do comportamento do inseticida bifentrina, nos experimentos com imidacloprido a variação do pH ocorreu de maneira não significativa, tornando-se desnecessário fazer ajustes no processo.

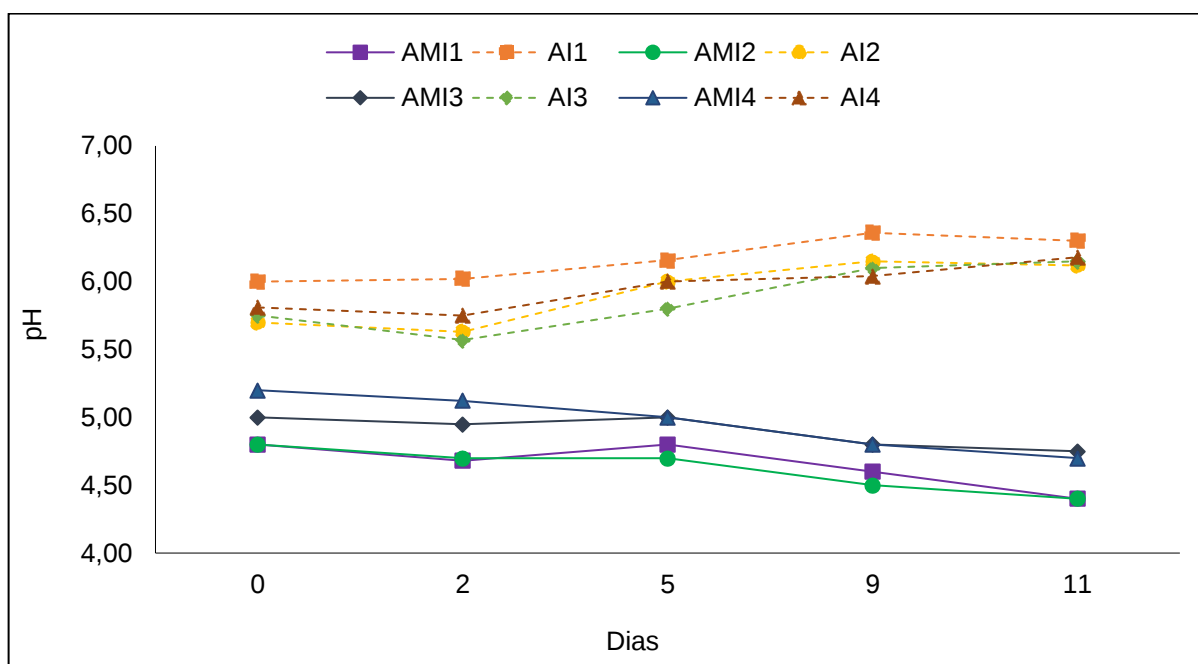


Figura 26 – Monitoramento do pH dos testes preliminares com imidacloprido.

AMI1, AMI2, AMI3 e AMI4 = amostras com a presença de microalgas e imidacloprido; AI1, AI2, AI3 e AI4 = amostras com a presença apenas do imidacloprido; n = 1.

O teste preliminar do imidacloprido apresentou valores de pH final ácido. Os valores nas amostras com presença de microalgas e imidacloprido ficaram em torno de 4,5. Isso pode ter ocorrido devido à presença de seres heterótrofos no meio, uma vez que o inóculo não foi esterilizado. pH diferentes foram encontrados por Ardal [18] em seu estudo de biorremediação. Ele avaliou o processo de biodegradação com microalgas da espécie *Chlorella vulgaris* e monitorou o pH apenas no final do experimento. Após o processo de biodegradação os valores de pH encontrados para os tratamentos com microalgas (amostra) e sem microalgas (controles) foram os seguintes: $9,30 \pm 0,06$ e $7,43 \pm 0,06$, respectivamente.

5.5.2 Resultados do processo de fitorremediação com planejamento fatorial para imidacloprido

Na Tabela 21 os resultados de biomassa seca e percentual de imidacloprido estão apresentados. Ambos foram determinados após o processo de fitorremediação do planejamento fatorial 2², contemplando as variáveis percentual de inóculo (10 e 20%) e fotoperíodo (12:12 e 18:6 h).

Tabela 21 – Resultados do planejamento fatorial do imidacloprido.

Amostras	Gravimetria		CLAE-DAD		
	(mg L ⁻¹)		Imidacloprido (%)		
	Biomassa	Biomassa	Meio Líquido	Vidro	Degradação
AMI1012	258,33 ± 32,07	0,39 ± 0,25	73,87 ± 2,36	0,15 ± 0,03	25,59 ± 2,57
AMI2012	314,58 ± 38,19	0,79 ± 0,25	75,97 ± 1,44	0,12 ± 0,01	23,12 ± 1,27
AI12	< LOD	< LOD	76,11 ± 2,32	0,09 ± 0,01	23,79 ± 2,31
AM1012	210,00 ± 20,34	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD
AM2012	387,67 ± 34,87	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD
AMI1018	391,67 ± 7,22	4,15 ± 1,50	78,02 ± 1,66	0,52 ± 0,08	17,31 ± 2,31
AMI2018	441,67 ± 52,42	7,30 ± 0,85	82,75 ± 0,09	0,71 ± 0,06	9,19 ± 0,98
AI18	< LOD	< LOD	84,31 ± 2,12	0,64 ± 0,08	15,05 ± 2,07
AM1018	339 ± 5,60	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD
AM2018	440,65 ± 17,56	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD

AMI1012 = presença de microalgas (10%) e imidacloprido na condição de fotoperíodo 12:12 h;

AMI2012 = presença de microalgas (20%) e imidacloprido na condição de fotoperíodo 12:12 h;

AI12 = presença de somente imidacloprido na condição de fotoperíodo 12:12 h;

AM1012 = presença de somente microalgas (10%) na condição de fotoperíodo 12:12 h;

AM2012 = presença de somente microalgas (20%) na condição de fotoperíodo 12:12 h;

AMI1018 = presença de microalgas (10%) e imidacloprido na condição de fotoperíodo 18:6 h;

AMI2018 = presença de microalgas (20%) e imidacloprido na condição de fotoperíodo 18:6 h;

AI18 = presença de somente imidacloprido na condição de fotoperíodo 18:6 h;

AM1018 = presença de somente microalgas (10%) na condição de fotoperíodo 18:6 h;

AM2018 = presença de somente microalgas (20%) na condição de fotoperíodo 18:6 h;

LOD = Limite de detecção;

n = 3.

Nas amostras com presença de apenas imidacloprido, nenhuma biomassa foi observada, conforme esperado. Não houve diferença significativa ($p > 0,05$) de biomassa entre as amostras com apenas microalgas (AM1012, AM2012, AM1018 e AM2018) se comparadas com as amostras com a presença de microalgas e

imidacloprido (AMI1012, AMI2012, AMI1018 e AMI2018), nos dois fotoperíodos testados.

A Figura 27 mostra o diagrama de Pareto que compara os efeitos das variáveis em relação ao total de biomassa obtida. Houve diferença significativa ($p < 0,05$) no efeito das variáveis de modo individual para o fotoperíodo e inóculo. Em relação a combinação das variáveis, não houve diferença significativa ($p > 0,05$).

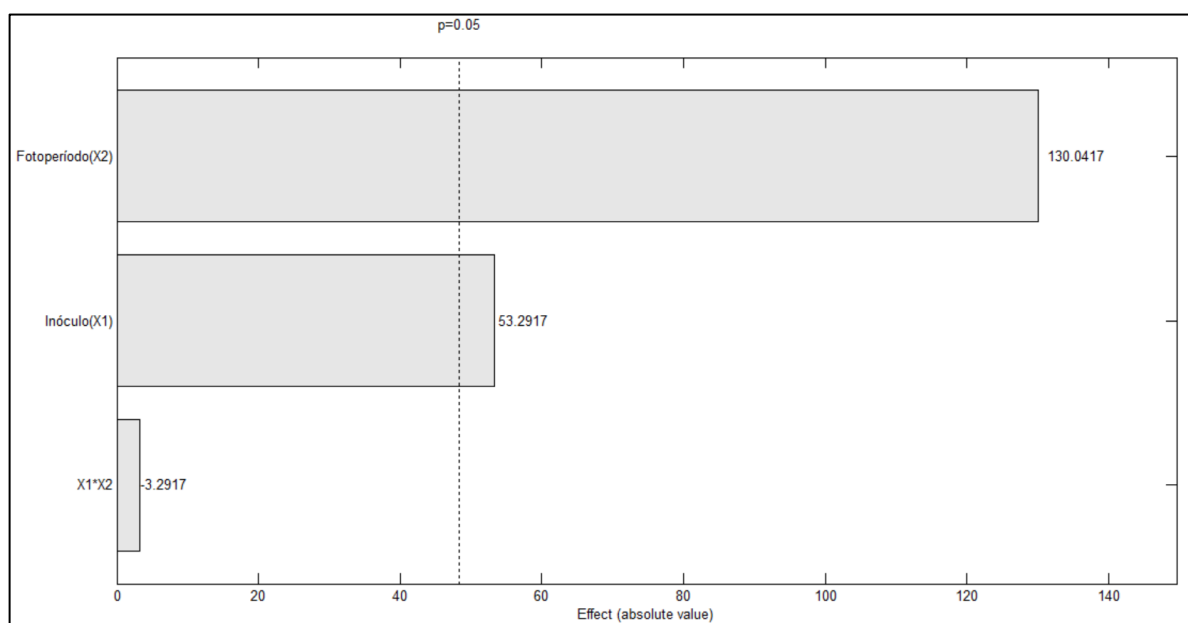


Figura 27 – Diagrama de Pareto dos efeitos das variáveis no total de biomassa (mg L^{-1}) para o imidacloprido.

Fotoperíodo foi a variável que apresentou a maior variação. O efeito foi positivo e mostrou que o aumento da irradiação da luz (18:6 h) apresentou um teor de biomassa 50% maior para 10% de inóculo e 40% maior para 20% de inóculo, se comparado ao fotoperíodo 12:12 h.

Um estudo realizado por Holdmann e colaboradores [125] investigou o crescimento da *Chlorella sorokiniana* em diferentes fotoperíodos (24:0, 16:8 e 12:12 h). Um maior rendimento de biomassa na luz durante os fotoperíodos mais curtos, levou a uma melhor produtividade se comparada com a iluminação contínua. O processo foi avaliado sempre combinando a produção de biomassa na luz e a produtividade. A combinação ótima poderia ser alcançada em uma concentração inferior a 4 g L^{-1} durante a iluminação 24:0 h e uma concentração inferior a 7 g L^{-1}

durante os demais fotoperíodos. No estudo do imidacloprido, assim como no da bifentrina, um aumento de 130 mg L^{-1} na concentração da biomassa foi observado no fotoperíodo 18:6 h, se comparado ao 12:12 h, nos 10% de inóculo adicionado.

Em alguns casos, concentrações mais elevadas de agrotóxicos no meio podem afetar a concentração de biomassa seca total. Um estudo realizado com a exposição de atrazina e terbutrina a espécie *Chlorella vulgaris* em diferentes concentrações ($0,025$, $0,1$ e $0,75 \text{ mol L}^{-1}$) mostrou que teor o de biomassa decresceu significativamente conforme aumento da concentração. Terbutrina reduziu duas vezes o teor de biomassa seca nas amostras (60 mg L^{-1}) se comparado ao branco (120 mg L^{-1}) [9].

Em relação ao percentual de degradação do imidacloprido, o diagrama de Pareto (Figura 28) mostra que houve diferença significativa ($p < 0,05$) nas duas variáveis e na combinação de ambas. Neste caso o efeito foi negativo, ou seja, mudando as variáveis para nível positivo (+1), uma diminuição dos percentuais de degradação do inseticida foi observada.

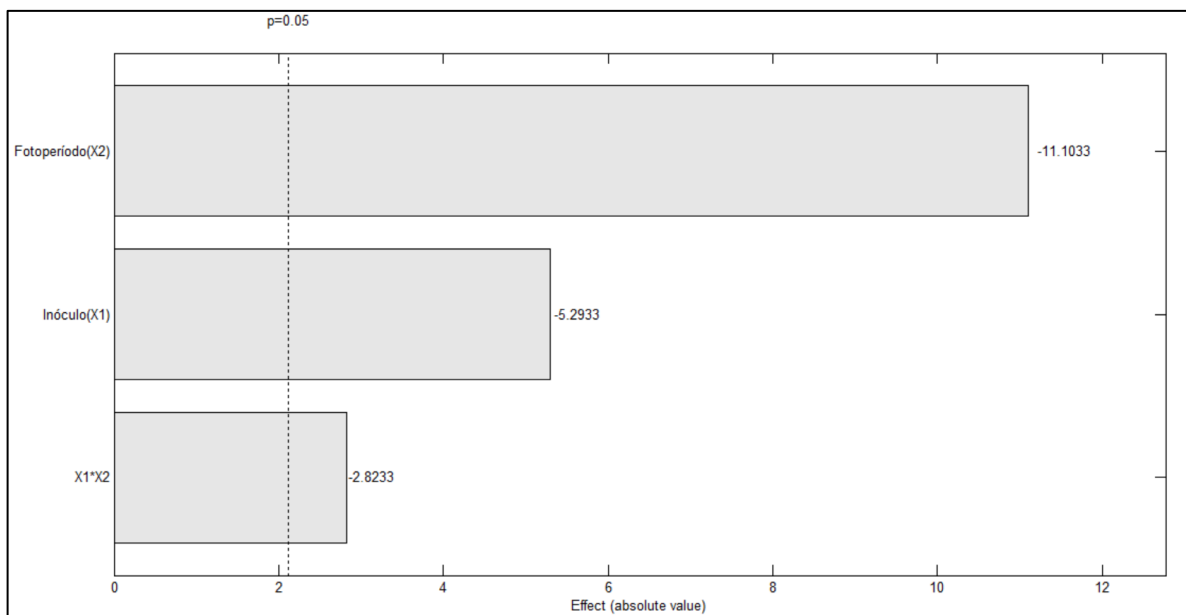


Figura 28 – Diagrama de Pareto dos efeitos das variáveis na degradação (%) para o imidacloprido.

Amostras com a presença de somente imidacloprido apresentaram percentuais de degradação similares as amostras com presença de microalgas e imidacloprido. Nas amostras avaliadas no fotoperíodo 12:12 h não houve diferença entre os

percentuais. No fotoperíodo 18:6 h, houve diferença entre as amostras, porém o percentual de degradação foi inferior.

O fungicida mandipropamida foi avaliado no processo de fitorremediação com a espécie *Chlorella vulgaris* no fotoperíodo 18:6 h. O percentual de redução ficou 65% menor que a concentração inicial. Porém não foi observada diferença entre a concentração na presença e ausência de microalgas. Todavia, isso pode ser justificado devido a rápida capacidade de degradação do composto [18].

A Figura 29 mostra os efeitos das variáveis avaliadas em relação ao percentual de imidacloprido presente na biomassa. Houve diferença significativa ($p < 0,05$) no efeito das variáveis de modo individual e na combinação, com um efeito positivo. O percentual de bioabsorção aumentou aproximadamente 10 vezes quando houve a troca de fotoperíodo para 18:6 h. Em relação ao aumento do inóculo para 20%, nos fotoperíodos 12:12 e 18:6 h, o percentual aumentou em torno de 100 e 75%, respectivamente.

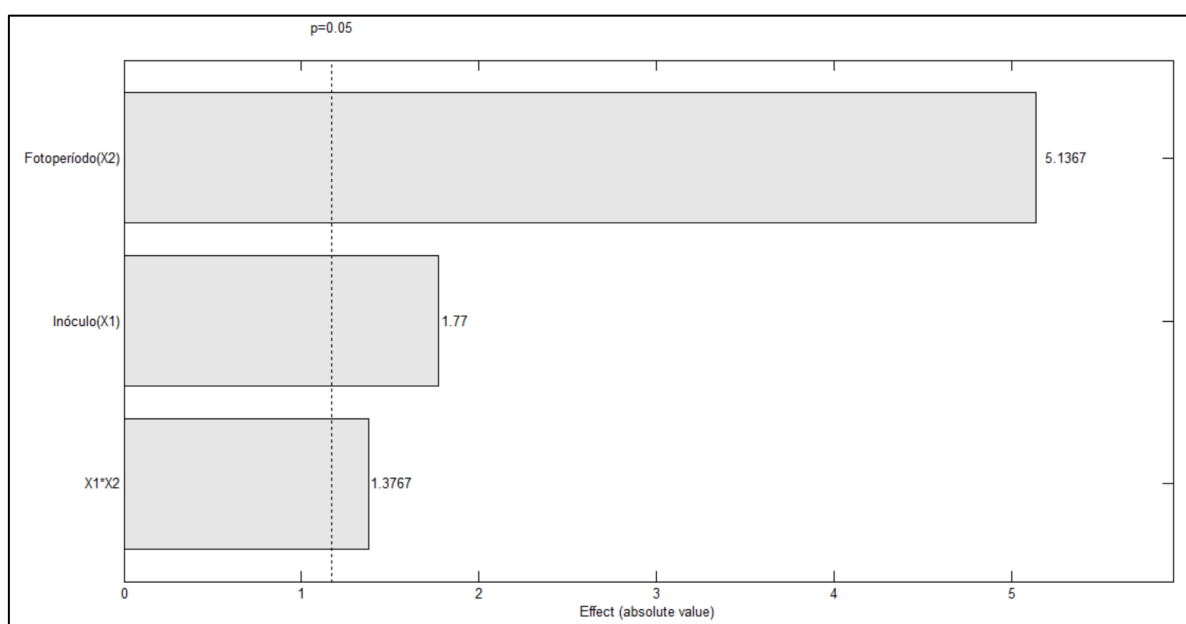


Figura 29 – Diagrama de Pareto dos efeitos das variáveis no percentual de imidacloprido na biomassa.

O fungicida dimetomorfe foi fitorremediado com a presença de microalgas no estudo realizado por Dosnon-Olette e colaboradores [77], e 24% do total adicionado foi bioabsorvido na biomassa, após 4 dias de incubação com iluminação permanente.

O coeficiente água-octanol varia de 2,63 – 2,73, o que lhe dá um caráter mais hidrofóbico.

Imidacloprido avaliado no presente estudo, possui um Log K_{ow} igual a 0,57 e em função disso, o percentual do inseticida na biomassa foi baixo. No fotoperíodo 12:12 h, o percentual variou de 0,39 – 0,79%, todavia no aumento da quantidade de luz (18:6 h), o percentual aumentou variando entre 4,15 e 7,30%. O caráter hidrofílico e o aumento da exposição na luz podem ter contribuído para este aumento no processo de bioacumulação.

5.6 Resultados de toxicidade aguda

Os resultados do teste de sensibilidade dos organismos-teste, validaram a utilização dos mesmos em ensaios toxicológicos. Com relação a sensibilidade de *Daphnia magna*, a faixa ideal varia de 0,56 – 0,81 mg L⁻¹ para CE50 de 24 horas, usando a substância referência dicromato de potássio. O resultado de sensibilidade obtida foi de 0,65 mg L⁻¹, conforme solicitado pela norma ABNT 12713 de 2009.

5.6.1 Bifentrina

A ecotoxicidade do meio aquoso foi avaliada depois do processo de fitorremediação, sem ajuste de pH, utilizando *Daphnia magna* para avaliação da toxicidade aguda, utilizando diluições da amostra bruta conforme Tabela 22.

O resultado encontrado para a amostra fitorremediada foi EC50 = 2,04 µg L⁻¹ e para a amostra sem processo de fitorremediação foi EC50 = 1,06 µg L⁻¹. A literatura mostra resultados diferentes de EC50 usando *Daphnia magna* para o princípio ativo com pureza elevada (> 90%), como: 0,86 µg L⁻¹ [127] e 12,40 µg L⁻¹ [126].

A toxicidade da AT20 foi menor se comparada a AT0. Sugere-se que a existência de toxicidade na amostra tratada pode ser devido à presença de metabólitos que podem ter sido gerados durante o processo de biodegradação, porém não foram identificados neste estudo. Chen e colaboradores [44] identificaram a presença de cinco metabólitos totais da degradação da bifentrina, todavia dois destes foram

provenientes da degradação inicial, os compostos ácido ciclopropanocarboxílico e 2-metil-3-bifenil metanol.

Tabela 22 – Mortalidade dos indivíduos de *Daphnia magna* após 48 h de exposição em bifentrina remanescente do processo de fitorremediação

Solução-teste (%)	Mortalidade da amostra	Mortalidade da amostra não
	fitorremediada (AT20) (indivíduos)	fitorremediada (AT0) (indivíduos)
3,12	17	20
1,56	12	18
0,78	8	13
0,39	5	7
0,20	2	3
0,10	1	1

Concentração das amostras: 0,20 mg L⁻¹;
Inóculo usado na amostra = 10%;
Fotoperíodo: 12/12 h.

5.6.2 Imidacloprido

A toxicidade aguda do meio aquoso foi avaliada depois do processo de fitorremediação do imidacloprido, utilizando *Daphnia magna*, seguindo as diluições da amostra bruta conforme Tabela 23.

O resultado encontrado para a amostra fitorremediada e não fitorremediada foi EC50 = 7,25 mg L⁻¹. A literatura mostra resultados mais elevados de EC50 usando *Daphnia magna*, como: 56,60 mg L⁻¹ [31] e 85,00 mg L⁻¹ [127]. A toxicidade aguda superior encontrada pode ser devido a outros compostos que estão na formulação comercial. Lembrando que os resultados da literatura são do composto puro (pureza > 90%) e não do produto comercial, que por sua vez possui 30% de outros componentes.

Tabela 23 – Mortalidade dos indivíduos de *Daphnia magna* após 48 h de exposição em imidacloprido remanescente do processo de fitorremediação.

Solução-teste (%)	Mortalidade da amostra	Mortalidade da amostra não
	fitorremediada (AT20) (indivíduos)	fitorremediada (AT0) (indivíduos)
50,00	10	10
25,00	6	8
12,50	4	5
6,20	2	2
3,12	0	0

Concentração das amostras: 14,5 mg L⁻¹;
Inóculo usado na amostra = 10%;
Fotoperíodo: 12/12 h.

5.7 Quantificação de fungos e bactérias nos processos de fitorremediação de bifentrina e imidacloprido

Avaliação de fungos e bactérias foi realizada antes (t_0) e após o processo de fitorremediação (t_{20}) de bifentrina. Para bactérias mesófilas aeróbias, nos experimentos com bifentrina, foram obtidas $3,3 \times 10^3$ e $4,0 \times 10^2$ UFC mL⁻¹ (est.) nos tempos t_0 e t_{20} , respectivamente. Para os fungos, foram obtidas $3,1 \times 10^4$ e $1,3 \times 10^5$ UFC mL⁻¹ (est.) nos tempos t_0 e t_{20} , respectivamente. Avaliação de fungos e bactérias foi realizada antes e após o processo de fitorremediação com bifentrina sem ajuste de pH.

Para o imidacloprido a avaliação de fungos e bactérias foi realizada antes (t_0) e após o processo de fitorremediação (t_{20}). Para bactérias mesófilas aeróbias, nos experimentos com imidacloprido, foram obtidas $2,3 \times 10^3$ e $4,5 \times 10^2$ UFC mL⁻¹ (est.) nos tempos t_0 e t_{20} , respectivamente. Para os fungos, foram obtidas $2,8 \times 10^4$ e $1,4 \times 10^5$ UFC mL⁻¹ (est.) nos tempos t_0 e t_{20} , respectivamente. Avaliação de fungos e bactérias foi realizada antes e após o processo de fitorremediação com imidacloprido.

O inóculo utilizado no processo de fitorremediação, por ser uma amostra ambiental não esterilizada, tinha a presença de outros microrganismos, como fungos

e bactérias. As UFC de bactérias diminuíram após os 20 dias de cultivo. Todavia as UFC de fungos aumentaram em quase 5 vezes. Porém, à luz do conhecimento atual, não foram encontrados estudos de remediação de compostos orgânicos em água utilizando fungos.

O consórcio de microalgas utilizado no processo de fitorremediação de agrotóxicos realizado por Matamoros e Rodríguez [19], tinha como população principal *Chlorella* sp. e *Scenedesmus* sp. Todavia o inóculo também continha 10% do seu total em bactérias, porque foi utilizado água de escoamento agrícola como fonte de nutrientes.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Considerando os resultados obtidos neste estudo, a fitorremediação utilizando microalgas nativas a partir da água do LGD se mostrou um processo promissor para a remoção de bifentrina e imidacloprido, tendo como espécie predominante *Parachlorella kessleri*, contemplando o processo de biossorção e biodegradação.

Bifentrina apresentou um percentual de máximo remoção de 99%, utilizando 20% de inóculo no início do experimento, fotoperíodo de 18:6 h e sem ajuste de pH. A toxicidade aguda foi menor após o processo de fitorremediação. Os metabólitos não foram encontrados no meio utilizando CG-EM/EM.

Quanto ao imidacloprido, o processo de fitorremediação, utilizando 10% de inóculo, fotoperíodo de 12:12 h e sem ajuste de pH no processo, apresentou uma remoção de 26%, com uma toxicidade aguda igual a encontrada no início do processo.

Por mais que o meio não estava livre de fungos e bactérias, acredita-se que as microalgas foram responsáveis pela diminuição dos princípios ativos no meio.

7. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

No que diz respeito aos agrotóxicos estudados:

- Avaliar outros agrotóxicos com grau de toxicidade intermediário a elevado, utilizados na cultura do tabaco na região;
- Avaliar ecotoxicidade usando *Daphnia magna* entre o produto comercial e o princípio ativo puro para bifentrina e imidacloprido.

Em relação as microalgas:

- Otimizar o processo de centrifugação da biomassa obtida e reduzir o tempo de secagem;
- Testar cepa pura de *Parachlorella kessleri* e comparar com as microalgas reproduzidas a partir da água do LGD.

No que diz respeito ao fotobiorreator:

- Aprimorar o sistema de iluminação dentro do fotobiorreator (agitador);
- Avaliar a possibilidade do uso da luz solar;
- Avaliar se existe diferença entre a agitação mecânica e por coluna de bolhas.

Quanto as variáveis testadas:

- Reduzir o tempo do processo de fitorremediação;
- Avaliar a genotoxicidade com *Daphnia magna*;
- Avaliar diferentes concentrações dos inseticidas a fim de verificar se o sistema de fitorremediação possui a mesma eficácia em concentrações mais baixas.

8. REFERÊNCIAS

1. De Gerónimo, E., V.C. Aparicio, S. Bárbaro, R. Portocarrero, S. Jaime, and J.L. Costa, *Presence of pesticides in surface water from four sub-basins in Argentina*. Chemosphere, 2014. 107(Supplement C): p. 423-431.
2. Schneider, R.C., E.A. Lobo, M.P. Souza, P.D. Gressler, T.R. Bjerk, and V.A. Corbellini, *Potential production of biofuel from microalgae biomass produced in wastewater*. 2012: INTECH Open Access Publisher.
3. Lecours, N., G.E. Almeida, J.M. Abdallah, and T.E. Novotny, *Environmental health impacts of tobacco farming: a review of the literature*. Tobacco control, 2012. 21(2): p. 191-196.
4. SINDITABACO. *Infográficos*. 2016 ; Disponível em: <http://www.sinditabaco.com.br/sobre-o-setor/infograficos/>. Acesso em 12/12/2017.
5. Sequinatto, L., J.M. Reichert, D.R.d. Santos, D.J. Reinert, and A.C.C. Copetti, *Occurrence of agrochemicals in surface waters of shallow soils and steep slopes cropped to tobacco*. Química Nova, 2013. 36(6): p. 768-772.
6. CONAMA, *Resolução CONAMA 357.*, in *Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências*. 2005: Diário Oficial da União.
7. Fulekar, M., *Bioremediation of fenvalerate by Pseudomonas aeruginosa in a scale up bioreactor*. Rom Biotechnol Lett, 2009. 14: p. 4900-4905.
8. Dosnon-Olette, R., M. Couderchet, and P. Eullaffroy, *Phytoremediation of fungicides by aquatic macrophytes: toxicity and removal rate*. Ecotoxicology and environmental safety, 2009. 72(8): p. 2096-2101.
9. González-Barreiro, O., C. Rioboo, C. Herrero, and A. Cid, *Removal of triazine herbicides from freshwater systems using photosynthetic microorganisms*. Environmental pollution, 2006. 144(1): p. 266-271.
10. Gao, J. and J. Chi, *Biodegradation of phthalate acid esters by different marine microalgal species*. Mar Pollut Bull, 2015. 99(1-2): p. 70-5.
11. Rosa, A.P.C.d., L.F. Carvalho, L. Goldbeck, and J.A.V. Costa, *Carbon dioxide fixation by microalgae cultivated in open bioreactors*. Energy Conversion and Management, 2011. 52(8–9): p. 3071-3073.
12. Parjo, K. and R.A. Razak, *Phycoremediation of Wastewaters and Potential Hydrocarbon from Microalgae: A*. 2015.
13. Guschina, I.A. and J.L. Harwood, *Lipids and lipid metabolism in eukaryotic algae*. Progress in Lipid Research, 2006. 45(2): p. 160-186.
14. RATH, B., *Microalgal bioremediation: Current practices and perspectives*. Journal of Biochemical Technology, 2012. 3(3): p. 299-304.

15. Singh, R.N. and S. Sharma, *Development of suitable photobioreactor for algae production – A review*. Renewable and Sustainable Energy Reviews, 2012. 16(4): p. 2347-2353.
16. Rawat, I., R. Ranjith Kumar, T. Mutanda, and F. Bux, *Dual role of microalgae: Phycoremediation of domestic wastewater and biomass production for sustainable biofuels production*. Applied Energy, 2011. 88(10): p. 3411-3424.
17. Xin, L., H. Hong-ying, G. Ke, and Y. Jia, *Growth and nutrient removal properties of a freshwater microalga Scenedesmus sp. LX1 under different kinds of nitrogen sources*. Ecological Engineering, 2010. 36(4): p. 379-381.
18. Ardal, E. *Phycoremediation of pesticides using microalgae*. 2014 12/12/2017]; Disponível em: <https://stud.epsilon.slu.se/7343/>.
19. Matamoros, V. and Y. Rodriguez, *Batch vs continuous-feeding operational mode for the removal of pesticides from agricultural run-off by microalgae systems: A laboratory scale study*. J Hazard Mater, 2016. 309: p. 126-32.
20. Renuka, N., A. Sood, R. Prasanna, and A.S. Ahluwalia, *Influence of seasonal variation in water quality on the microalgal diversity of sewage wastewater*. South African Journal of Botany, 2014. 90: p. 137-145.
21. Begum, G., *Carbofuran insecticide induced biochemical alterations in liver and muscle tissues of the fish Clarias batrachus (linn) and recovery response*. Aquat Toxicol, 2004. 66(1): p. 83-92.
22. Becker, A.G., B.S. Moraes, C.C. Menezes, V.L. Loro, D.R. Santos, J.M. Reichert, and B. Baldisserotto, *Pesticide contamination of water alters the metabolism of juvenile silver catfish, Rhamdia quelen*. Ecotoxicol Environ Saf, 2009. 72(6): p. 1734-9.
23. Chekroun, K.B., E. Sánchez, and M. Baghour, *The role of algae in bioremediation of organic pollutants*. International Research Journal of Public and Environmental Health, 2014. 1(2): p. 19-32.
24. Frazar, C., *The bioremediation and phytoremediation of pesticide-contaminated sites*. US Environmental Protection Agency, Office of Solid Waste and Emergency Response Technology Innovation Office, Washington DC, 2000.
25. BRASIL, *Dispõe sobre a pesquisa, a experimentação, a produção, a embalagem e rotulagem, o transporte, o armazenamento, a comercialização, a propaganda comercial, a utilização, a importação, a exportação, o destino final dos resíduos e embalagens, o registro, a classificação, o controle, a inspeção e a fiscalização de agrotóxicos, seus componentes e afins, e dá outras providências, Lei Nº 7.802*. 1989, Diário Oficial da União.
26. Jennings, A.A. and Z. Li, *Scope of the worldwide effort to regulate pesticide contamination in surface soils*. J Environ Manage, 2014. 146: p. 420-443.
27. Rousis, N.I., E. Zuccato, and S. Castiglioni, *Wastewater-based epidemiology to assess human exposure to pyrethroid pesticides*. Environ Int, 2017. 99: p. 213-220.

28. Al Hattab, M.T. and A.E. Ghaly, *Disposal and treatment methods for pesticide containing wastewaters: Critical review and comparative analysis*. Journal of Environmental Protection, 2012. 3(05): p. 431.
29. Campo, J., A. Masia, C. Blasco, and Y. Pico, *Occurrence and removal efficiency of pesticides in sewage treatment plants of four Mediterranean River Basins*. J Hazard Mater, 2013. 263 Pt 1: p. 146-57.
30. Weston, D.P., D. Chen, and M.J. Lydy, *Stormwater-related transport of the insecticides bifenthrin, fipronil, imidacloprid, and chlorpyrifos into a tidal wetland, San Francisco Bay, California*. Sci Total Environ, 2015. 527-528: p. 18-25.
31. Tišler, T., A. Jemec, B. Mozetič, and P. Trebše, *Hazard identification of imidacloprid to aquatic environment*. Chemosphere, 2009. 76(7): p. 907-914.
32. Atwood, D. and C. Paisley-Jones, *Pesticides industry sales and usage: 2008-2012 market estimates*. Biological and Economic Analysis Division. Office of Pesticide Programs. Office of Chemical Safety and Pollution Prevention. Washington, DC: US Environmental Protection Agency, 2017: p. 1-24.
33. Taha, S.M., M.E. Amer, A.E. Elmarsafy, and M.Y. Elkady, *Adsorption of 15 different pesticides on untreated and phosphoric acid treated biochar and charcoal from water*. Journal of Environmental Chemical Engineering, 2014. 2(4): p. 2013-2025.
34. Doulia, D.S., E.K. Anagnos, K.S. Liapis, and D.A. Klimentzos, *Effect of clarification process on the removal of pesticide residues in white wine*. Food Control, 2017. 72(Part A): p. 134-144.
35. Helbling, D.E., *Bioremediation of pesticide-contaminated water resources: the challenge of low concentrations*. Current Opinion in Biotechnology, 2015. 33(Supplement C): p. 142-148.
36. Bortoluzzi, E.C., D.D.S. Rheinheimer, C.S. Gonçalves, J.B. Pellegrini, R. Zanella, and A.C. Copetti, *Contaminação de águas superficiais por agrotóxicos em função do uso do solo numa microbacia hidrográfica de Agudo, RS*. Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental, 2006. 10(4): p. 881-887.
37. Liu, Y., F. Wei, Y. Wang, and G. Zhu, *Studies on the formation of bifenthrin oil-in-water nano-emulsions prepared with mixed surfactants*. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, 2011. 389(1-3): p. 90-96.
38. Bieńkowski, A.O. and M.J. Orlova-Bienkowskaja, *Key to Holarctic species of Epitrix flea beetles (Coleoptera: Chrysomelidae: Galerucinae: Alticini) with review of their distribution, host plants and history of invasions*. Zootaxa, 2016. 4175(5): p. 401-435.
39. Gabarty, A., H.M. Salem, M.A. Fouda, A.A. Abas, and A.A. Ibrahim, *Pathogenicity induced by the entomopathogenic fungi Beauveria bassiana and Metarhizium anisopliae in Agrotis ipsilon (Hufn.)*. Journal of Radiation Research and Applied Sciences, 2014. 7(1): p. 95-100.

40. Tariq, S.R., D. Ahmed, A. Farooq, S. Rasheed, and M. Mansoor, *Photodegradation of bifenthrin and deltamethrin-effect of copper amendment and solvent system*. Environ Monit Assess, 2017. 189(2): p. 71.
41. WHO, W.H.O., *The WHO recommended classification of pesticides by hazard and guidelines to classification 2009*. 2010.
42. Greenberg, L., M.K. Rust, J.H. Klotz, D. Haver, J.N. Kabashima, S. Bondarenko, and J. Gan, *Impact of ant control technologies on insecticide runoff and efficacy*. Pest management science, 2010. 66(9): p. 980-987.
43. Beggel, S., R. Connon, I. Werner, and J. Geist, *Changes in gene transcription and whole organism responses in larval fathead minnow (Pimephales promelas) following short-term exposure to the synthetic pyrethroid bifenthrin*. Aquatic Toxicology, 2011. 105(1): p. 180-188.
44. Chen, S., J. Luo, M. Hu, P. Geng, and Y. Zhang, *Microbial detoxification of bifenthrin by a novel yeast and its potential for contaminated soils treatment*. PLoS One, 2012. 7(2): p. e30862.
45. Hintzen, E.P., M.J. Lydy, and J.B. Belden, *Occurrence and potential toxicity of pyrethroids and other insecticides in bed sediments of urban streams in central Texas*. Environmental Pollution, 2009. 157(1): p. 110-116.
46. Weston, D.P., A.M. Asbell, S.A. Hecht, N.L. Scholz, and M.J. Lydy, *Pyrethroid insecticides in urban salmon streams of the Pacific Northwest*. Environmental Pollution, 2011. 159(10): p. 3051-3056.
47. Siegfried, B.D., *Comparative toxicity of pyrethroid insecticides to terrestrial and aquatic insects*. Environmental Toxicology and Chemistry, 1993. 12(9): p. 1683-1689.
48. Weston, D.P., A.M. Asbell, S.A. Lesmeister, S.J. Teh, and M.J. Lydy, *Urban and agricultural pesticide inputs to a critical habitat for the threatened delta smelt (Hypomesus transpacificus)*. Environmental toxicology and chemistry, 2014. 33(4): p. 920-929.
49. Yang, W., J. Gan, W. Hunter, and F. Spurlock, *Effect of suspended solids on bioavailability of pyrethroid insecticides*. Environmental toxicology and chemistry, 2006. 25(6): p. 1585-1591.
50. Fojut, T.L. and T.M. Young, *Pyrethroid sorption to Sacramento River suspended solids and bed sediments*. Environmental toxicology and chemistry, 2011. 30(4): p. 787-792.
51. Li, H., Y. Wei, M.J. Lydy, and J. You, *Inter-compartmental transport of organophosphate and pyrethroid pesticides in South China: implications for a regional risk assessment*. Environmental Pollution, 2014. 190: p. 19-26.
52. Moreira, A.A.G., P. De Lima-Neto, E.W.S. Caetano, I.L. Barroso-Neto, and V.N. Freire, *The vibrational properties of the bee-killer imidacloprid insecticide: A molecular description*. Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, 2017. 185(Supplement C): p. 245-255.

53. Ohashi, D.V. and J. Urdampilleta, *Interacción entre insectos perjudiciales y benéficos en el cultivo de tabaco de Misiones, Argentina*. RIA. Revista de Investigaciones Agropecuarias, 2003. 32(2).
54. Lai, R., M. You, C. Zhu, G. Gu, Z. Lin, L. Liao, L. Lin, and X. Zhong, *Myzus persicae and aphid-transmitted viral disease control via variety intercropping in flue-cured tobacco*. Crop Protection, 2017. 100: p. 157-162.
55. Gervais, J., B. Luukinen, K. Buhl, and D. Stone, *Imidacloprid technical fact sheet*. National Pesticide Information Center, Oregon State University Extension Services. 2010.
56. Jemec, A., T. Tišler, D. Drobne, K. Sepčić, D. Fournier, and P. Trebše, *Comparative toxicity of imidacloprid, of its commercial liquid formulation and of diazinon to a non-target arthropod, the microcrustacean Daphnia magna*. Chemosphere, 2007. 68(8): p. 1408-1418.
57. Kim, S., H.-S. Lee, and Y. Park, *Perinatal exposure to low-dose imidacloprid causes ADHD-like symptoms: Evidences from an invertebrate model study*. Food and Chemical Toxicology, 2017. 110(Supplement C): p. 402-407.
58. Moghaddam, N.S., M.P. Zakaria, D. Omar, and K. Sijam, *Extraction efficiency and HPLC determination of imidacloprid in soil*. Soil and Sediment Contamination: An International Journal, 2012. 21(8): p. 985-995.
59. Mata, T.M., A.A. Martins, and N.S. Caetano, *Microalgae for biodiesel production and other applications: A review*. Renewable and Sustainable Energy Reviews, 2010. 14(1): p. 217-232.
60. Ullah, K., M. Ahmad, Sofia, V.K. Sharma, P. Lu, A. Harvey, M. Zafar, S. Sultana, and C.N. Anyanwu, *Algal biomass as a global source of transport fuels: Overview and development perspectives*. Progress in Natural Science: Materials International, 2014. 24(4): p. 329-339.
61. Ohse, S., R.B. Derner, R.Á. Ozório, M.V.D.C. Braga, P. Cunha, C.P. Lamarca, and M.E.D. Santos, *Produção de biomassa e teores de carbono, hidrogênio, nitrogênio e proteína em microalgas*. Ciência Rural, 2009. 39(6).
62. Lam, M.K., K.T. Lee, and A.R. Mohamed, *Current status and challenges on microalgae-based carbon capture*. International Journal of Greenhouse Gas Control, 2012. 10: p. 456-469.
63. Pratoomyot, J., P. Srivilas, and T. Noiraksar, *Fatty acids composition of 10 microalgal species*. Songklanakarin J Sci Technol, 2005. 27(6): p. 1179-1187.
64. Grobbelaar, J.U. and C.H. Bornman, *Algal biotechnology: real opportunities for Africa*. South African Journal of Botany, 2004. 70(1): p. 140-144.
65. Parlevliet, D. and N.R. Moheimani, *Efficient conversion of solar energy to biomass and electricity*. Aquatic biosystems, 2014. 10(1): p. 4.
66. Pacheco, M.M., M. Hoeltz, M.S.A. Moraes, and R.C.S. Schneider, *Microalgae: Cultivation techniques and wastewater phycoremediation*. Journal of Environmental Science and Health - Part A Toxic/Hazardous Substances and Environmental Engineering, 2015. 50(6): p. 585-601.

67. Price, K. and I.H. Farag, *Resources Conservation in Microalgae Biodiesel Production*. International Journal of Engineering and Technical Research, 2013: p. 49-56.
68. Pancha, I., K. Chokshi, R. Maurya, K. Trivedi, S.K. Patidar, A. Ghosh, and S. Mishra, *Salinity induced oxidative stress enhanced biofuel production potential of microalgae Scenedesmus sp. CCNM 1077*. Bioresource Technology, 2015. 189(Supplement C): p. 341-348.
69. Xiong, J.Q., M.B. Kurade, R.A. Abou-Shanab, M.K. Ji, J. Choi, J.O. Kim, and B.H. Jeon, *Biodegradation of carbamazepine using freshwater microalgae Chlamydomonas mexicana and Scenedesmus obliquus and the determination of its metabolic fate*. Bioresour Technol, 2016. 205: p. 183-90.
70. Moreno-Garcia, L., K. Adjallé, S. Barnabé, and G. Raghavan, *Microalgae biomass production for a biorefinery system: Recent advances and the way towards sustainability*. Renewable and Sustainable Energy Reviews, 2017. 76: p. 493-506.
71. Suh, I.S. and C.-G. Lee, *Photobioreactor engineering: design and performance*. Biotechnology and Bioprocess Engineering, 2003. 8(6): p. 313.
72. Ho, S.-H., M.-C. Chan, C.-C. Liu, C.-Y. Chen, W.-L. Lee, D.-J. Lee, and J.-S. Chang, *Enhancing lutein productivity of an indigenous microalga Scenedesmus obliquus FSP-3 using light-related strategies*. Bioresource Technology, 2014. 152(Supplement C): p. 275-282.
73. Sutherland, D.L., C. Howard-Williams, M.H. Turnbull, P.A. Broady, and R.J. Craggs, *Enhancing microalgal photosynthesis and productivity in wastewater treatment high rate algal ponds for biofuel production*. Bioresource Technology, 2015. 184(Supplement C): p. 222-229.
74. Zhang, Q., J.-j. Zhan, and Y. Hong, *The effects of temperature on the growth, lipid accumulation and nutrient removal characteristics of Chlorella sp. HQ*. Desalination and Water Treatment, 2016. 57(22): p. 10403-10408.
75. Xin, L., H. Hong-ying, and Z. Yu-ping, *Growth and lipid accumulation properties of a freshwater microalga Scenedesmus sp. under different cultivation temperature*. Bioresource Technology, 2011. 102(3): p. 3098-3102.
76. Eriksen, N.T., *The technology of microalgal culturing*. Biotechnology letters, 2008. 30(9): p. 1525-1536.
77. Dosnon-Olette, R., P. Trotel-Aziz, M. Couderchet, and P. Eullaffroy, *Fungicides and herbicide removal in Scenedesmus cell suspensions*. Chemosphere, 2010. 79(2): p. 117-123.
78. Lima, S.A.C., M.F.J. Raposo, P.M.L. Castro, and R.M. Morais, *Biodegradation of p-chlorophenol by a microalgae consortium*. Water Research, 2004. 38(1): p. 97-102.
79. Qiu, R., S. Gao, P.A. Lopez, and K.L. Ogden, *Effects of pH on cell growth, lipid production and CO₂ addition of microalgae Chlorella sorokiniana*. Algal Research, 2017. 28(Supplement C): p. 192-199.

80. Cho, H.U., Y.M. Kim, and J.M. Park, *Enhanced microalgal biomass and lipid production from a consortium of indigenous microalgae and bacteria present in municipal wastewater under gradually mixotrophic culture conditions*. Bioresource Technology, 2017. 228(Supplement C): p. 290-297.
81. Maza-Márquez, P., M.V. Martinez-Toledo, M. Fenice, L. Andrade, A. Lasserrot, and J. Gonzalez-Lopez, *Biotreatment of olive washing wastewater by a selected microalgal-bacterial consortium*. International Biodeterioration & Biodegradation, 2014. 88(Supplement C): p. 69-76.
82. Choi, H.J. and S.M. Lee, *Effect of the N/P ratio on biomass productivity and nutrient removal from municipal wastewater*. Bioprocess and biosystems engineering, 2015. 38(4): p. 761-766.
83. Markou, G., D. Vandamme, and K. Muylaert, *Microalgal and cyanobacterial cultivation: The supply of nutrients*. Water research, 2014. 65: p. 186-202.
84. Kaewpintong, K., A. Shotipruk, S. Powtongsook, and P. Pavasant, *Photoautotrophic high-density cultivation of vegetative cells of Haematococcus pluvialis in airlift bioreactor*. Bioresource Technology, 2007. 98(2): p. 288-295.
85. Chojnacka, K. and F.-J. Marquez-Rocha, *Kinetic and stoichiometric relationships of the energy and carbon metabolism in the culture of microalgae*. Biotechnology, 2004. 3(1): p. 21-34.
86. Perez-Garcia, O., F.M. Escalante, L.E. de-Bashan, and Y. Bashan, *Heterotrophic cultures of microalgae: metabolism and potential products*. Water research, 2011. 45(1): p. 11-36.
87. Zhang, L., J. Cheng, H. Pei, J. Pan, L. Jiang, Q. Hou, and F. Han, *Cultivation of microalgae using anaerobically digested effluent from kitchen waste as a nutrient source for biodiesel production*. Renewable Energy, 2018. 115(Supplement C): p. 276-287.
88. Kim, J., J.-Y. Lee, and T. Lu, *Effects of dissolved inorganic carbon and mixing on autotrophic growth of Chlorella vulgaris*. Biochemical Engineering Journal, 2014. 82(Supplement C): p. 34-40.
89. Sigee, D.C., *Microbial Diversity and Freshwater Ecosystems*. Freshwater Microbiology: Biodiversity and Dynamic Interactions of Microorganisms in the Aquatic Environment, 2004: p. 1-46.
90. Sigee, D.C., *Freshwater Environments: The Influence of Physico-Chemical Conditions on Microbial Communities*. Freshwater Microbiology: Biodiversity and Dynamic Interactions of Microorganisms in the Aquatic Environment, 2005: p. 47-103.
91. Sigee, D.C., *Algae: The Major Microbial Biomass in Freshwater Systems*. Freshwater Microbiology: Biodiversity and Dynamic Interactions of Microorganisms in the Aquatic Environment: p. 105-180.
92. Torres, M.A., M.P. Barros, S.C.G. Campos, E. Pinto, S. Rajamani, R.T. Sayre, and P. Colepicolo, *Biochemical biomarkers in algae and marine pollution: A review*. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2008. 71(1): p. 1-15.

93. Suresh Kumar, K., H.U. Dahms, E.J. Won, J.S. Lee, and K.H. Shin, *Microalgae - A promising tool for heavy metal remediation*. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2015. 113: p. 329-352.
94. Boduroğlu, G., N. Kılıç, and G. Dönmez, *Bioremoval of Reactive Blue 220 by Gonium sp. biomass*. Environmental technology, 2014. 35(19): p. 2410-2415.
95. Ding, T., K. Lin, B. Yang, M. Yang, J. Li, W. Li, and J. Gan, *Biodegradation of naproxen by freshwater algae Cymbella sp. and Scenedesmus quadricauda and the comparative toxicity*. Bioresour Technol, 2017. 238: p. 164-173.
96. Gani, P., N. Mohamed Sunar, H.M. Matias Peralta, A. Latiff, A. Aziz, U.K. Parjo, A. Razak, and A. Rafiq, *Phycoremediation of wastewaters and potential hydrocarbon from microalgae: a review*. Advances in Environmental Biology, 2015. 9(20): p. 1-8.
97. Olguín, E.J., *Phycoremediation: Key issues for cost-effective nutrient removal processes*. Biotechnology Advances, 2003. 22(1-2): p. 81-91.
98. Hanumantha Rao, P., R. Ranjith Kumar, B. Raghavan, V. Subramanian, and V. Sivasubramanian, *Application of phycoremediation technology in the treatment of wastewater from a leather-processing chemical manufacturing facility*. Water Sa, 2011. 37(1): p. 07-14.
99. Subashchandrabose, S.R., B. Ramakrishnan, M. Megharaj, K. Venkateswarlu, and R. Naidu, *Mixotrophic cyanobacteria and microalgae as distinctive biological agents for organic pollutant degradation*. Environment International, 2013. 51: p. 59-72.
100. Gao, J. and J. Chi, *Biodegradation of phthalate acid esters by different marine microalgal species*. Marine Pollution Bulletin, 2015. 99(1): p. 70-75.
101. Richards, R.G. and B.J. Mullins, *Using microalgae for combined lipid production and heavy metal removal from leachate*. Ecological Modelling, 2013. 249: p. 59-67.
102. Ji, M.-K., A.N. Kabra, J. Choi, J.-H. Hwang, J.R. Kim, R.A. Abou-Shanab, Y.-K. Oh, and B.-H. Jeon, *Biodegradation of bisphenol A by the freshwater microalgae Chlamydomonas mexicana and Chlorella vulgaris*. Ecological engineering, 2014. 73: p. 260-269.
103. Whitton, R., A. Le Mevel, M. Pidou, F. Ometto, R. Villa, and B. Jefferson, *Influence of microalgal N and P composition on wastewater nutrient remediation*. Water Res, 2016. 91: p. 371-8.
104. Ansari, F.A., P. Singh, A. Guldhe, and F. Bux, *Microalgal cultivation using aquaculture wastewater: Integrated biomass generation and nutrient remediation*. Algal Research, 2017. 21: p. 169-177.
105. Gong, N., K. Shao, W. Feng, Z. Lin, C. Liang, and Y. Sun, *Biotoxicity of nickel oxide nanoparticles and bio-remediation by microalgae Chlorella vulgaris*. Chemosphere, 2011. 83(4): p. 510-6.
106. García de Llasera, M.P., M. León Santiago, E.J. Loera Flores, D.N. Bernal Toris, and M.R. Covarrubias Herrera, *Mini-bioreactors with immobilized microalgae for*

- the removal of benzo(a)anthracene and benzo(a)pyrene from water*. Ecological Engineering, 2018. 121: p. 89-98.
107. Zhang, S., C.B. Qiu, Y. Zhou, Z.P. Jin, and H. Yang, *Bioaccumulation and degradation of pesticide fluroxypyr are associated with toxic tolerance in green alga Chlamydomonas reinhardtii*. Ecotoxicology, 2011. 20(2): p. 337-347.
 108. Vendruscolo, F., G.L. da Rocha Ferreira, and N.R. Antoniosi Filho, *Biosorption of hexavalent chromium by microorganisms*. International Biodeterioration & Biodegradation, 2017. 119(Supplement C): p. 87-95.
 109. Buratto, A.P., R.D. Costa, and E.d.S. Ferreira, *Aplicação de biomassa fúngica de Pleurotus ostreatus em processo de bio sorção de íons cobre (II)*. Revista Brasileira de Engenharia Sanitária e Ambiental, 2012. 17(4): p. 413-420.
 110. Whitton, B.A., A.J. Brook, and D.M. John, *The freshwater algal flora of the British Isles: An identification guide to freshwater and terrestrial algae*. 2002: Cambridge University Press.
 111. Mimbs, W.H., J.P.W. Cusaac, L.M. Smith, S.T. McMurry, and J.B. Belden, *Occurrence of current-use fungicides and bifenthrin in Rainwater Basin wetlands*. Chemosphere, 2016. 159(Supplement C): p. 275-281.
 112. Savi, G.D., K.C. Piacentini, T. Bortolotto, and V.M. Scussel, *Degradation of bifenthrin and pirimiphos-methyl residues in stored wheat grains (Triticum aestivum L.) by ozonation*. Food Chemistry, 2016. 203(Supplement C): p. 246-251.
 113. Zhang, S., L. Yin, Y. Liu, D. Zhang, X. Luo, J.e. Cheng, F. Cheng, and J. Dai, *Cometabolic biotransformation of fenpropathrin by Clostridium species strain ZP3*. Biodegradation, 2011. 22(5): p. 869-875.
 114. Mahapatra, B., T. Adak, N.K.B. Patil, G.P. Pandi G, G.B. Gowda, N.N. Jambhulkar, M.K. Yadav, P. Panneerselvam, U. Kumar, S. Munda, and M. Jena, *Imidacloprid application changes microbial dynamics and enzymes in rice soil*. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2017. 144(Supplement C): p. 123-130.
 115. ABNT, *NBR 12713: Ecotoxicologia aquática - Toxicidade aguda - Método de ensaio com Daphnia spp. (Cladóceras, Crustácea)*. 2009, ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS.
 116. Garreta-Lara, E., B. Campos, C. Barata, S. Lacorte, and R. Tauler, *Combined effects of salinity, temperature and hypoxia on Daphnia magna metabolism*. Science of The Total Environment, 2018. 610-611(Supplement C): p. 602-612.
 117. Hebert, P.D., A. Cywinska, and S.L. Ball, *Biological identifications through DNA barcodes*. Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences, 2003. 270(1512): p. 313-321.
 118. Li, X., P. Přibyl, K. Bišová, S. Kawano, V. Cepák, V. Zachleder, M. Čížková, I. Brányíková, and M. Vítová, *The microalga Parachlorella kessleri—A novel highly efficient lipid producer*. Biotechnology and Bioengineering, 2013. 110(1): p. 97-107.

119. Deng, D. and N.F.Y. Tam, *Isolation of microalgae tolerant to polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) from wastewater treatment plants and their removal ability*. Bioresource Technology, 2015. 177: p. 289-297.
120. Koutra, E., G. Grammatikopoulos, and M. Kornaros, *Microalgal post-treatment of anaerobically digested agro-industrial wastes for nutrient removal and lipids production*. Bioresource Technology, 2017. 224: p. 473-480.
121. Chinnasamy, S., A. Bhatnagar, R.W. Hunt, and K.C. Das, *Microalgae cultivation in a wastewater dominated by carpet mill effluents for biofuel applications*. Bioresource Technology, 2010. 101(9): p. 3097-3105.
122. Burrows, H.D., L.M. Canle, J.A. Santaballa, and S. Steenken, *Reaction pathways and mechanisms of photodegradation of pesticides*. J Photochem Photobiol B, 2002. 67(2): p. 71-108.
123. Albaser, S.S., K. Mukkanti, R.N. Rao, and Y. Swamy, *Analytical artifacts, sample handling and preservation methods of environmental samples of synthetic pyrethroids*. TrAC Trends in Analytical Chemistry, 2011. 30(11): p. 1771-1780.
124. González-Fernández, C., A. Mahdy, I. Ballesteros, and M. Ballesteros, *Impact of temperature and photoperiod on anaerobic biodegradability of microalgae grown in urban wastewater*. International Biodeterioration & Biodegradation, 2016. 106(Supplement C): p. 16-23.
125. Holdmann, C., U. Schmid-Staiger, H. Hornstein, and T. Hirth, *Keeping the light energy constant — Cultivation of Chlorella sorokiniana at different specific light availabilities and different photoperiods*. Algal Research, 2018. 29(Supplement C): p. 61-70.
126. Ye, W.H., Y.Z. Wen, W.P. Liu, and Z.Q. Wang, *Effects of bifenthrin on Daphnia magna during chronic toxicity test and the recovery test*. J Environ Sci (China), 2004. 16(5): p. 843-6.
127. Agatz, A., T.A. Cole, T.G. Preuss, E. Zimmer, and C.D. Brown, *Feeding inhibition explains effects of imidacloprid on the growth, maturation, reproduction, and survival of Daphnia magna*. Environmental science & technology, 2013. 47(6): p. 2909-2917.