

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Instituto de Ciências Biológicas
Programa de Pós-graduação em Biologia Vegetal

Lucas Chagas Oliveira

RESISTÊNCIA DE DUAS ESPÉCIES DE ALGAS VERDES AOS ÍONS Fe^{3+} E Cu^{2+} PARA USO EM PROCESSOS DE BIORREMEDIÇÃO EM AMBIENTES CONTAMINADOS POR METAIS

Belo Horizonte

2023

Lucas Chagas Oliveira

RESISTÊNCIA DE DUAS ESPÉCIES DE ALGAS VERDES AOS ÍONS Fe^{3+} E Cu^{2+} PARA USO EM PROCESSOS DE BIORREMEDIAÇÃO EM AMBIENTES CONTAMINADOS POR METAIS

Versão final

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biologia Vegetal da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biologia Vegetal.

Orientador: Prof. Dr. Cleber Cunha Figueredo

Belo Horizonte

2023

043

Oliveira, Lucas Chagas.

Resistência de duas espécies de algas verdes aos íons $FE3+$ e $CU2+$ para uso em processos de biorremediação em ambientes contaminados por metais [manuscrito] / Lucas Chagas Oliveira. – 2023.

41 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientador: Prof. Dr. Cleber Cunha Figueredo.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal.

1. Biodegradação Ambiental. 2. Metais Pesados. 3. Adsorção. 4. Microalgas. I. Figueredo, Cleber Cunha. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. III. Título.

CDU: 581



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA VEGETAL

FOLHA DE APROVAÇÃO

DEFESA DE DISSERTAÇÃO

LUCAS CHAGAS OLIVEIRA

DATA DA DEFESA: 30/03/2023 NÚMERO DE MATRÍCULA: 2019724612 ENTRADA: 2019/2

CPF:121.464.406-60

TÍTULO "RESISTÊNCIA DE DUAS ESPÉCIES DE ALGAS VERDES AOS ÍONS Fe^{3+} E Cu^{2+} PARA USO EM PROCESSOS DE BIORREMEDIAÇÃO EM AMBIENTES CONTAMINADOS POR METAIS".

Comissão Examinadora

Dr. Cleber Cunha Figueredo (UFMG)

Dra. Gabriela von Rückert Heleno (UEMG)

Dr. Marcel Giovanni Costa França (UFMG)

Belo Horizonte, 03 de março de 2023.

Assinaturas dos membros da comissão:

Assinatura do coordenador do Colegiado:



Documento assinado eletronicamente por **Gabriela von Rückert Heleno, Usuária Externa**, em 30/03/2023, às 17:53, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Danilo Rafael Mesquita Neves, Coordenador(a) de curso de pós-graduação**, em 31/03/2023, às 09:51, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Marcel Giovanni Costa Franca, Professor do Magistério Superior**, em 31/03/2023, às 12:34, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Cleber Cunha Figueredo, Professor do Magistério Superior**, em 31/03/2023, às 14:17, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **2119900** e o código CRC **70732322**.

AGRADECIMENTOS

Ao CNPq e à FAPEMIG, pelo apoio financeiro à realização deste projeto.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal da UFMG, pela oportunidade de realizar o mestrado.

À Professora Queila de Souza Garcia e às alunas da pós-graduação Jessyca Adelle Silva Santos e Talita Raissa Silva dos Santos, pela disponibilização e auxílio no uso o leitor de placas de ELISA para o trabalho.

Ao Professor Luiz Henrique Rosa e à Vívian Nicolau Gonçalves, por emprestarem as microplacas para uso no leitor de placas.

Aos meus amigos e minha família, pelo apoio durante todo o processo do mestrado, em especial minha irmã Débora, pela grande ajuda com a parte química do projeto.

Ao pessoal do laboratório, por todo o tempo que passamos juntos, tendo tanto momentos de grande aprendizado uns com outros quanto momentos de diversão, fazendo do laboratório um ótimo local para se estar. Em especial à Michelle Machado, técnica do laboratório, por toda a ajuda e apoio durante todo o período do mestrado, sem o qual não teria sido possível completar este projeto.

Ao meu psicólogo Gabriel Bassan, que me acompanhou durante boa parte do mestrado, me ajudando a lidar e encarar com mais calma as dificuldades do processo.

Ao meu orientador Cleber Cunha Figueredo, que me acompanha desde meu segundo período, sendo paciente, dando apoio e me ensinando muito ao longo desses anos, me ajudando a melhorar enquanto biólogo, cientista e pessoa. Sem o seu suporte não teria conseguido ter boa parte do conhecimento e habilidades que tenho hoje e nem chegar até o final deste processo.

Resumo

Os metais são bastante utilizados na sociedade e sua extração e/ou descarte incorreto levam à contaminação de ambientes, resultando em um grande problema porque apresentam potencial tóxico para humanos e outros seres vivos. O ferro e o cobre são dois dos metais de maior uso e, conseqüentemente, exploração. A biorremediação é uma técnica para remoção de metais, sendo que algas e cianobactérias são utilizadas para este fim por adsorver, absorver e acumular metais eficientemente devido às suas características morfológicas e estruturais. Como estes organismos devem ser expostos a altas concentrações de metais na biorremediação, é fundamental identificar as espécies mais resistentes. Entretanto, estudos enfocando o cobre geralmente avaliam efeitos de baixas concentrações, enquanto estudos sobre a toxicidade de ferro em algas e cianobactérias são escassos. Neste estudo, foi feita uma comparação de métodos entre estudos que abordaram a toxicidade de Fe ou de Cu sobre algas ou cianobactérias, uma vez que estes podem influenciar na toxicidade dos metais. Foram encontrados 18 artigos sobre cobre e somente 03 sobre ferro e todos divergiram em relação ao meio de cultura, poucos adicionaram EDTA e muitos careciam de informações sobre a correção de pH. Em seguida, foram realizados experimentos quanto aos efeitos de Cu e de Fe sobre *Desmodesmus armatus* e *Monactinus simplex*, avaliando sua resistência a altas concentrações desses metais. As espécies foram cultivadas em meio CHU10 com adição de cinco concentrações de ferro ou de cobre, entre 1 e 81 mg/L, e adição de EDTA proporcional à concentração do metal para evitar sua precipitação, sendo feito também um controle de EDTA. O Fe precipitou, mesmo com EDTA, enquanto o Cu permaneceu diluído. A densidade populacional foi medida em intervalos de 24h por leitura de densidade óptica a 440 nm, durante um período de 72h. Foi possível perceber crescimento de ambas espécies, similarmente ao controle, nos meios com acréscimo de Fe ou Cu. No entanto, a maior concentração de Fe e de Cu geraram resultados similares ao controle de EDTA, com menores crescimentos entre todos os tratamentos. A falta de padronização dos testes dificulta a comparação entre estudos. É fundamental padronizar tanto o meio quanto seu pH, pois ambos podem influenciar na toxicidade dos metais. A grande resistência das algas aos metais possivelmente tem relação com o emprego de EDTA, que diminui a disponibilidade do metal iônico livre e, conseqüentemente, a sua toxicidade. Ambas as espécies parecem ter potencial para o uso em processos de biorremediação.

Palavras-chave: Bioissorção; microalgas; metais pesados

Abstract

Metals are widely used in society and their extraction and/or incorrect disposal can result in environmental contamination, which can be a big problem since they are potentially toxic to humans and other beings. Iron and copper are two of the most used metals and, therefore, most explored. Bioremediation is a technique to remove metals, with algae and cyanobacteria being used to efficiently adsorb, absorb and accumulate metals due to their morphological and structural characteristics. Since these organisms need to be exposed to high concentrations in bioremediation, it's necessary to identify which species are more resistant. However, studies focusing on copper usually evaluate the effects of low concentrations and the ones focusing on iron are rare. In this study, a comparison of methods in studies about Fe or Cu toxicity on algae and cyanobacteria was made, since those can interfere with the metal toxicity. 18 articles about Cu were found and only 03 about iron. All were different regarding the culture medium, few used EDTA and most lack information about pH correction. Next, experiments related to Fe and Cu toxicity were made with *Desmodesmus armatus* and *Monactinus simplex*, testing their resistance to high concentrations of these metals. The species were cultured in CHU10 medium with the addition of five concentrations of Fe or Cu, between 1 and 81 mg/L, and with addition of EDTA proportional to the metal concentration to avoid its precipitation. An EDTA control was also made. The iron precipitated, even with EDTA, but copper remained dissolved. The cell density was measured every 24h through optical density at 440 nm, for 72h total. Both species grow like in the control in mediums with either Fe or Cu. However, the highest concentration of Fe and Cu resulted in growth similar to the EDTA control, with the lowest growth of all treatments. The lack of standardization in tests makes it harder to compare studies. It is essential to standardize both medium and its pH, since both can interfere with metal toxicity. The great resistance of the algae to the metals is possibly related with the use of EDTA, which diminishes the availability of free ionic metal and, therefore, its toxicity. Both species seem to have potential to be used in the process of bioremediation.

Keywords: Biosorption; microalgae; heavy metals

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1: Regressão linear entre os valores de densidade populacional e absorbância obtida pela leitura em leitor de placas de ELISA nos comprimentos de onda de 440, 540, 630, 680 e 750 nm para as culturas de *Desmodesmus armatus* e *Monactinus simplex*..... 23
- Figura 2: Densidade populacional por mililitro de *Desmodesmus armatus* e *Monactinus simplex* obtida pela leitura de absorbância em leitor de placas de ELISA nos comprimentos de onda de 440 nm para os metais ferro e cobre 26
- Figura 3: Meio de cultura para testes de ferro com material precipitado no fundo..... 26
- Figura 4: Curvas de crescimento logaritmizadas (média \pm desvio-padrão) das espécies *Desmodesmus armatus* e *Monactinus simplex* para os tratamentos com ferro e cobre. Letras iguais ao final da curva indicam semelhança estatística 27

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Levantamento de informações sobre as condições experimentais em estudos que avaliaram a toxicidade de ferro e de cobre sobre microalgas e cianobactérias. (Den. pop. = densidade populacional inicial, NI = Não informado).....	22
---	----

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	10
2. OBJETIVO	16
3. MATERIAIS E MÉTODOS	17
3.1. Análise de estudos prévios	17
3.2. Experimentos	17
3.2.1. Espécies e condições de cultivo	17
3.2.2. Meio de cultura para o teste de toxicidade	18
3.2.3. Realização do teste	19
3.2.4. Quantificação do crescimento populacional	20
3.2.5. Análises estatísticas	20
4. RESULTADOS	21
4.1. Análise de estudos prévios	21
4.2. Densidade óptica	21
4.3. Curvas de crescimento	24
5. DISCUSSÃO	28
6. CONCLUSÃO	34
7. REFERÊNCIAS	35

1. INTRODUÇÃO

O uso de diferentes metais é bastante comum em todos os países, sendo historicamente relacionado ao desenvolvimento industrial e a padrões elevados de qualidade de vida (Wernick e Themelis, 1998). Os metais são elementos cuja utilização é feita amplamente desde a confecção de ferramentas e materiais simples, passando às tecnologias avançadas, como eletroeletrônicos, e chegando até mesmo à construção de edifícios ou outros tipos de grandes estruturas. Essa grande conexão entre a utilização de metais e o desenvolvimento da sociedade faz com que o grande crescimento da população humana nas últimas décadas seja acompanhado de um aumento relevante na demanda por metais (Backman, 2008; Vidal *et al.*, 2013; Watari *et al.*, 2021). Há duas formas principais de obtenção dos metais a serem utilizados na indústria: a extração diretamente da natureza (fontes primárias), por meio da mineração, e a reciclagem de materiais que contêm os metais de interesse (fontes secundárias) (Schäfer e Schmidt, 2021).

O processo de reciclagem de metais é limitado principalmente por dois motivos: a) porque frequentemente este material encontra-se muito diluído nos produtos, principalmente os tecnológicos, que contêm grande quantidade de plásticos ou outros componentes não metálicos (Schäfer e Schmidt, 2021), aumentando os custos para a separação do material de interesse; b) geralmente há pouco incentivo para a coleta de materiais descartados. A ampliação da reciclagem de metais enfrenta várias barreiras, como falhas na percepção dos custos ambientais devido à perda dos serviços ecossistêmicos associados à exploração de metais primários e falta de mudanças tecnológicas que facilitem a reciclagem de vários produtos. É necessário que haja, ainda, políticas de reciclagem com incentivos econômicos, como, por exemplo, sobretaxas às indústrias sobre o descarte de produtos recicláveis, esquemas de crédito negociáveis para reciclagem, subsídios a programas de reciclagem e impostos sobre materiais virgens (Söderholm e Ekvall, 2020). É também necessário um processo de educação da população para evitar o descarte incorreto e uma facilitação, por parte do governo, do acesso da população a

locais que recebam e direcionem os materiais descartados. Além disso, há algumas barreiras para o desenvolvimento da reciclagem de resíduos no Brasil, como falta de conhecimento, necessidade de mais atenção aos aspectos práticos e operacionais do processo (Conke, 2018).

Outros fatores que contribuem para as baixas taxas de reciclagem de metais são as perdas nos processos industriais, outras destinações relacionadas ao descarte dos materiais metálicos, alto custo e baixa eficiência na reciclagem de alguns tipos de metais ou o fato de eles estarem presos em materiais ainda em vida útil (Reck e Graedel, 2012). Para os metais mais comuns, como o ferro, o alumínio e o cobre, a taxa de reciclagem fica em torno de 50 %, enquanto para outros metais, como gálio, pode ficar em até menos de 1 % (Graedel *et al.*, 2011). Esse conjunto de dificultadores do processo de reciclagem implica na necessidade de aumento da extração dos metais diretamente da natureza, o que gera inúmeros problemas ambientais.

Dentre os impactos ambientais causados pelo processo de mineração, destacam-se a alteração da paisagem e a contaminação de ecossistemas, devido à liberação de metais que se encontravam originalmente presos nas rochas para outros locais, como os corpos d'água (Environmental Mining Council Of B.C. 2012). Os impactos das atividades minerárias podem resultar da liberação de partículas provenientes das rochas e da lixiviação do próprio metal durante o processo de extração (Environmental Mining Council Of B.C. 2012), sendo que grandes impactos mais pontuais ocorrem nos eventos de liberação massiva de rejeitos, como, por exemplo, pelo rompimento de barragens (Kossoff, *et al.*, 2014).

Além dos impactos da exploração de metais em fontes naturais, o descarte incorreto de materiais que contêm esses elementos na sua composição também leva à contaminação do ambiente (Ribeiro *et al.*, 2022). O descarte em aterros controlados, lixões ou diretamente em áreas naturais ou espaços públicos é inadequado e pode levar a vazamentos e à lixiviação desses metais, contaminando o solo, o lençol freático e o ambiente aquático (Li e Achal, 2020;

Kalamaras *et al.*, 2021). Diferentemente de impactos nos ecossistemas terrestres, que tendem a ser mais pontuais em termos espaciais, o aspecto fluido do meio líquido faz com que a deterioração de corpos d'água venham a cobrir grandes áreas, podendo prejudicar ambientes localizados a grandes distâncias da fonte de contaminação.

Dentre alguns casos de contaminação de corpos d'água por metais no Brasil, destacam-se dois grandes eventos de rompimento de barragens de rejeitos de mineração de ferro, ocorridos no estado de Minas Gerais: a) rompimento da Barragem de Fundão, em Mariana, resultando na liberação de aproximadamente 50 milhões de m³ de rejeitos na Bacia do Rio Doce (IBAMA, 2015); e b) rompimento da Barragem I, localizada na Mina do Córrego do Feijão, em Brumadinho, contendo 11,7 milhões de m³ de rejeitos que foram liberados na Bacia do Rio Paraopeba, afluente do Rio São Francisco. Os impactos da Barragem de Fundão se estenderam por cerca de 663 km ao longo da rede fluvial (IBAMA, 2015), enquanto os da Barragem I, que foram registrados em termos de área degradada, atingiram pelo menos 2,698 km² nos primeiros dias após o rompimento (IBAMA, 2019).

Após as rupturas dessas barragens, tiveram início vários estudos para avaliar alterações quanto às concentrações de diferentes metais nos corpos d'água impactados em ambas bacias hidrográficas, tendo sido reportados efeitos negativos em alguns casos (Costa *et al.*, 2019; Vergilio *et al.*, 2020; Vergilio *et al.*, 2021). Embora estudos prévios realizados pela Companhia de Pesquisa de Recursos Minerais (CPRM) tenham sido contrastados com dados obtidos após o rompimento da barragem de Fundão e apontado ausência de efeitos deste evento sobre as concentrações arsênio (As), cromo (Cr), cobre (Cu), chumbo (Pb), zinco (Zn) e mercúrio (Hg) dissolvidos na água (CPRM, 2015), alguns pesquisadores reportaram ter ocorrido aumentos nas concentrações de cobalto (Co), Cr, Zn, Cu, Pb, ferro (Fe), manganês (Mn) e níquel (Ni) na água da bacia do Rio Doce (Queiroz *et al.*, 2018; Costa *et al.*, 2019; Vergilio *et al.*, 2021). Uma vez que estes metais apresentam potencial tóxico para humanos e para outras espécies, é necessário

haver esforços voltados desde ao monitoramento das concentrações ao longo do tempo até ao desenvolvimento de ferramentas que possam contribuir para a remoção de metais presentes na água. Várias técnicas convencionais para remoção de metais em corpos d'água, como adsorção, eletro-diálise, precipitação e troca iônica apresentam limitações, fazendo com que técnicas desenvolvidas mais recentemente, como a biorremediação envolvendo algas, bactérias e fungos, passassem a ser mais exploradas e estudadas (Kapahi e Sachdeva, 2019).

O conhecimento sobre métodos para remoção de metais em ecossistemas é relevante em países com ampla tradição em atividades minerárias, como o Brasil. As barragens mencionadas acima, por exemplo, encontram-se em uma região rica em recursos minerais, o Quadrilátero Ferrífero, na qual o ferro é bastante abundante, mas havendo também quantidades relevantes de alumínio e outros metais (OECD, 2022). Dentre as cerca de 207 minas ativas do Brasil, o ferro e o cobre, destacados neste estudo, estão entre os metais explorados (Afonso *et al.*, 2022). Dependendo das concentrações, ambos podem atuar como contaminantes dos corpos d'água, gerando vários efeitos na biota e nos seres humanos expostos.

O excesso de ferro em humanos pode levar a sintomas mais leves, como vômito e diarreia, ou sintomas mais graves, como falência renal (Yuen e Becker, 2022), enquanto o cobre pode levar a sintomas leves, como fadiga, dor de cabeça, ou mais graves, como depressão e necrose hepática (Nolan, 1983; Royer e Sharman, 2022). Em relação à biota, a exposição ao cobre pode gerar alterações comportamentais ou anatômicas e levar à morte em peixes (Tavares-Dias, 2021), diminuição da atividade enzimática e muscular de mexilhões (Naimo, 1995) e também impactos em microrganismos. Em algas, por exemplo, o excesso de ferro resulta em uma menor taxa de crescimento (Arbildua *et al.*, 2017). Entretanto, detalhes sobre mecanismos de ação e até sobre outros efeitos tóxicos de altas concentrações de ferro são pouco conhecidos nas algas, uma vez que é mais comum o foco na deficiência desse metal. Os efeitos da contaminação por cobre, por outro lado, são mais estudados, tendo sido destacados a redução

nas taxas de crescimento, aumento do estresse oxidativo e alterações morfológicas (Cavalletti *et al.*, 2022). O impacto negativo do cobre sobre as algas é um dos motivos pelo qual este elemento faz parte da composição de algicidas frequentemente utilizados nos tratamentos de água para remoção de algas e cianobactérias, como observado na manutenção da qualidade da água de piscinas, aquários ou mesmo em sistemas de maiores dimensões, como reservatórios e lagos (Jančula e Maršálek, 2011; Leal *et al.* 2018).

Os efeitos desses metais sobre microrganismos fotossintetizantes são especialmente importantes, uma vez que alterações nas comunidades formadas por estes organismos (principalmente fitoplâncton e fração autotrófica do perifíton) geram impactos em todo o ecossistema. Isso ocorre porque as algas e cianobactérias, sendo produtores primários e, portanto, estando em um nível basal da cadeia trófica, possuem grande importância em determinar o funcionamento do ecossistema e podem interferir em todos os demais níveis (Elliott *et al.*, 1983; Pickhardt *et al.*, 2002). Assim, estudos sobre os impactos da contaminação por metais sobre algas e cianobactérias são bastante relevantes.

As interações entre os metais e as algas e cianobactérias podem ir além de efeitos deletérios sobre estes microrganismos. Como mencionado acima, acerca dos estudos voltados à biorremediação, há casos em que estes microrganismos podem ser usados como uma ferramenta para a remoção de metais em sistemas aquáticos contaminados (Chandrashekharaiah *et al.*, 2021; Silva e Figueredo, 2023). Algumas características, como suas pequenas dimensões e a presença, em grande quantidade, de moléculas ricas em grupos funcionais com carga negativa em sua superfície celular, permitem uma eficiente adsorção de metais, tanto em células vivas quanto em células mortas, apresentando grande potencial para se tornar uma ferramenta para o tratamento de corpos d'água contaminados por metais (Crist *et al.*, 1981). Estes microrganismos podem, ainda, ser utilizados neste tratamento devido à sua capacidade de absorver e acumular metais no interior das células (bioacumulação) (Lavoie *et*

al., 2009; Du *et al.*, 2022). Uma vantagem adicional da utilização de algas e cianobactérias na remoção de metais na água é relacionada ao rápido crescimento populacional destes microrganismos (Silva e Figueredo, 2023), facilitando o cultivo em massa quando houver necessidade.

Considerando os métodos de remoção baseados na utilização de células vivas, como por bioacumulação, ou em certos métodos baseados em adsorção, é fundamental determinar quais espécies são mais resistentes à contaminação por determinados metais para otimizar o seu emprego para essa finalidade. Uma vez que há casos nos quais o processo de descontaminação exige que as células estejam expostas a altas concentrações do metal contaminante, é importante que as espécies utilizadas sejam resistentes a níveis elevados de contaminação. Entretanto, a maioria dos estudos geralmente avalia efeitos de baixas concentrações dos metais, especialmente aqueles focados em cobre (0,01 a 3,00 mg/L), enquanto que para o ferro esse tipo de estudo é bastante escasso. Além disso, é desejável que haja aspectos de padronização entre métodos empregados nos estudos, pois somente assim as espécies poderiam ser comparadas para a identificação daquelas que são mais promissoras para a biorremediação de metais em corpos d'água. Considerando que cada espécie de microalga ou cianobactéria é impactada de modo diferente pelas condições do ambiente em que se encontram (Levy *et al.*, 2007), a ausência de padronização metodológica entre estudos torna-se uma fonte adicional de variabilidade indesejável.

No presente estudo, foram comparadas as taxas de crescimento de duas espécies de algas verdes sob elevadas concentrações de ferro ou de cobre, dois dos três metais mais consumidos pela humanidade (McMillan *et al.*, 2012), com o objetivo de avaliar se há diferenças interespecíficas na resistência a estes metais.

2. OBJETIVO

Este estudo teve o objetivo de avaliar a resistência das microalgas *Desmodesmus armatus* e *Monactinus simplex*, a cinco diferentes concentrações de ferro e cobre, abrangendo concentrações baixas e concentrações bastante elevadas. As hipóteses testadas foram que as concentrações mais elevadas resultarão em um menor crescimento em relação ao controle, enquanto que as mais baixas não afetarão o crescimento, sendo que ambas as espécies deverão apresentar uma resistência similar aos metais.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. *Análise de estudos prévios*

Para avaliar as condições nas quais são realizadas pesquisas sobre efeitos de ferro e de cobre em microalgas e cianobactérias, foi feito um levantamento de artigos científicos em relação à interação destes microrganismos com estes metais. As bases de dados utilizadas foram o Google Acadêmico e o Web of Science, utilizando as palavras-chave (copper or iron), (toxicity or inhibition) e growth, avaliando também as referências dos artigos encontrados. Os estudos foram comparados em relação ao meio de cultura utilizado, às concentrações dos metais que foram testadas, ao valor de pH nas soluções de cultivo, aos reagentes usados para a correção do pH e ao uso de EDTA. Tais informações foram obtidas para identificar se há um padrão nesses estudos em relação a esses parâmetros, uma vez que diferenças quanto a eles podem alterar a resistência das espécies à exposição aos metais.

3.2. *Experimentos*

3.2.1. *Espécies e condições de cultivo*

Os experimentos foram realizados com duas espécies de algas planctônicas: *Desmodesmus armatus* (Chodat) E. H. Hegelwald 2000 e *Monactinus simplex* (Meyen) Corda 1839. Essas espécies são pertencentes ao filo Chlorophyta, um filo com características interessantes em relação ao seu potencial para biorremediação por possuir muitas espécies bastante comuns em ecossistemas aquáticos, por ser de fácil cultivo em laboratório e com crescimento rápido. Elas foram isoladas do Parque Municipal Fazenda Lagoa do Nado (19°49'54,4"S 43°57'35,9"W) em Belo Horizonte, Minas Gerais, um ambiente não impactado por altas concentrações de metais. O cultivo foi feito em tubos de ensaio contendo 20 mL de meio CHU10 (CHU, 1942), um meio de cultura simples, sendo preparado com apenas 6 sais diferentes, o que diminui as chances de interferências dos componentes do meio nos metais

testados. Os tubos foram vedados com rolha de algodão e gaze para permitir trocas gasosas com a atmosfera, mas evitando a contaminação por microrganismos. Os tubos foram mantidos em uma câmara incubadora SOLAB SL-225/364 configurada para a temperatura de $22(\pm 0,5)$ °C, fotoperíodo de 12h claro e 12h escuro e intensidade luminosa de cerca $60 \mu\text{mol}\cdot\text{fótons}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, obtida pelo uso de quatro lâmpadas tubulares de LED brancas.

3.2.2. Meio de cultura para o teste de toxicidade

Os testes de toxicidade dos metais sobre as microalgas foram realizados utilizando meio CHU10 com adição de cloreto de ferro(III) (FeCl_3) ou de sulfato de cobre(II) (CuSO_4). Para cada metal, foram utilizadas cinco concentrações, definidas por uma progressão geométrica de ordem 2,5 para o ferro e de 3 para o cobre, tendo como primeiro valor 0,80 mg/L para o ferro (concentração de ferro já presente no meio CHU10) e 1 mg/L para o cobre (concentração mais baixa utilizada, já que não há cobre na composição do meio CHU10), seguindo as recomendações da OECD (OECD, 2011). As concentrações utilizadas foram: 2,00; 5,00; 12,50; 31,25; 78,13 mg/L de Fe e 1,00; 3,00; 9,00; 21,00 e 81,00 mg/L de Cu, sendo, para cada metal, nomeadas como T1, T2, T3, T4 e T5, respectivamente. As concentrações foram definidas de modo a atingirem níveis bastante elevados quando comparados a vários estudos, mas sendo sempre inferiores a 100 mg/L, limite estabelecido pela OECD para esse tipo de experimento (OECD, 2011).

Para manutenção de condições de cultivo similares quanto a algumas características do meio de cultura, seu pH foi corrigido para $7,39 (\pm 0,07)$ com o uso de cloreto de hidrogênio (HCl) e hidróxido de sódio (NaOH). Antes deste ajuste nos valores de pH, foi adicionado ácido etilenodiaminotetracético dissódico dihidratado (EDTA) na proporção de 1:1 mol para cada metal para evitar que a adição de hidróxido resultasse na precipitação dos metais. Tais concentrações de EDTA foram estabelecidas com base em testes prévios que apontaram que

concentrações menores não foram eficientes em evitar a precipitação dos metais testados. As concentrações de EDTA usadas foram 2,80; 7,00; 17,50; 43,74 e 109,36 mg/L para o ferro e 1,23; 3,69; 11,07; 33,21 e 99,64 mg/L para o cobre, respectivamente para os tratamentos T1, T2, T3, T4 e T5. Para avaliar os efeitos destas concentrações crescentes de metais e também considerando que o EDTA poderia ter algum impacto sobre o crescimento das microalgas, dois controles foram estabelecidos no experimento, um contendo somente o meio CHU10, denominado Cm, e um contendo as maiores concentrações de EDTA testadas, presentes nos respectivos tratamentos T5. Estes controles referentes ao EDTA foram denominados C_{EDTA}. Os tubos com os meios dos tratamentos foram esterilizados em autoclave antes de serem inoculados com as espécies de algas.

3.2.3. Realização do teste

Cada tratamento (Cm, C_{EDTA}, T1, T2, T3, T4 e T5) foi inoculado com 1 mL de uma cultura estoque que foi mantida em crescimento por duas semanas. Na cultura de *D. armatus*, este volume continha aproximadamente $2,0 \times 10^6$ células, enquanto que na cultura de *M. simplex*, esse volume continha $2,0 \times 10^5$ células, resultando em uma concentração de $9,6 \times 10^4$ e $9,6 \times 10^3$ cél/mL, respectivamente. Os tubos com os tratamentos foram dispostos dentro da câmara incubadora (SOLAB SL225/364; $22(\pm 0,5)$ °C, 12h claro e 12h escuro, sob cerca $60 \mu\text{mol} \cdot \text{fótons} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) em uma grade para tubos, uma para o experimento com adição de ferro e uma para aquele com adição de cobre. Foi realizada a agitação de todos os tubos em intervalos de 24h, momento no qual a posição da grade também era modificada, de modo a minimizar a interferência de quaisquer diferenças na disponibilidade de luz no interior da câmara. Cada tratamento foi feito em triplicata. No momento de cada agitação, uma amostra de 300 μL era recolhida de cada tubo e utilizada para quantificar a densidade populacional presente nos tratamentos. O período de duração total do experimento foi de 72h.

3.2.4. Quantificação do crescimento populacional

A quantificação da densidade populacional foi feita por meio de curva de densidade óptica, resultante da relação entre a quantidade de células e o valor de absorvância. Essa relação foi feita a partir de oito diluições da cultura estoque, feitas com acréscimo de água destilada, sendo essas concentrações 100,0; 87,5; 75,0; 62,5; 50,0; 37,5; 25,0 e 12,5 % de cultura estoque. A quantidade de células foi obtida pela contagem em câmara de Fuchs-Rosenthal e a absorvância foi obtida com o uso de um leitor de placa de ELISA (Multiskan GO, ThermoScientific). Cinco comprimentos de onda, estabelecidos com base na literatura voltada à avaliação da densidade populacional em culturas de algas (Griffiths et al., 2011; Nielsen e Hansen, 2019), foram testados quanto à absorvância: 440, 540, 630, 680 e 750 nm.

3.2.5. Análises estatísticas

A relação entre densidade de células nas culturas e a absorvância em cada comprimento de onda testado foi previamente estabelecida por meio de análise de regressão linear, resultando em modelos que foram empregados para deduzir a densidade de células a partir do valor de absorvância da amostra de cada tratamento. Estes dados permitiram estabelecer o ajuste mais adequado para determinação das curvas de crescimento sob cada condição experimental. As curvas de crescimento foram comparadas por meio de ANOVA de medidas repetidas, realizadas no programa Statistica. Previamente à realização destas análises, todos os dados foram logaritmizados, sendo em seguida avaliada a homogeneidade de variâncias pelo teste de Brown-Forsythe. Alguns valores da densidade populacional foram negativos, provavelmente por terem ocorrido quedas abaixo do limite de detecção do leitor de placa de ELISA. Assim, devido à impossibilidade de existência de densidade negativa, todos esses valores foram sempre ajustados para a densidade mínima quantificada para os experimentos, ou seja, o mesmo valor de densidade observado no primeiro dia.

4. RESULTADOS

4.1. *Análise de estudos prévios*

Foram encontradas 21 publicações nas quais os autores realizaram experimentos para testar a toxicidade de ferro ou cobre em microalgas e cianobactérias (Tabela 1), havendo um maior número enfocando os efeitos do cobre (18 estudos) do que aqueles avaliando os efeitos do ferro (somente 03 estudos). O meio de cultura diferiu entre praticamente todos os estudos avaliados, sendo encontrados 19 meios diferentes. As concentrações testadas para avaliação da toxicidade do ferro foram mais altas do que as concentrações de cobre testadas (mediana de 9,95 e 0,67 mg/L, respectivamente). Os valores de pH comumente foram de 7 e 8, com algumas exceções, geralmente em estudos realizados com espécies acidófilas (Nishikawa e Tominaga, 2001; Spijkerman *et al.*, 2018) ou quando o foco estava relacionado a testes sobre o efeito do pH na toxicidade dos metais (Buayam *et al.*, 2019). Quanto à clareza em relação ao método empregado para o ajuste do pH do meio, apenas quatro publicações continham informação sobre como foi feita a correção para os valores de teste (Nishikawa e Tominaga, 2001; Arbildua *et al.*, 2017; Buayam *et al.*, 2019; Pascual *et al.*, 2020). Somente quatro dos 21 estudos levantados foram realizados com a adição de EDTA ao meio de cultura, sendo para testar o efeito do metal na presença do EDTA (Ma *et al.*, 2003; Pascual *et al.*, 2020) ou para garantir a disponibilização de metal de ferro para o crescimento das algas (Nielsen e Wium-Andersen, 1970; Fawaz *et al.*, 2018).

4.2. *Densidade óptica*

As análises de regressão linear mostraram que a densidade populacional e os valores de absorvância obtidos pelo leitor de placas de ELISA possuíram um ajuste adequado para as culturas de *D. armatus* ($R^2 > 0,98$) nos comprimentos de onda de 440, 630 e 680 nm, enquanto

Tabela 1: Levantamento de informações sobre as condições experimentais em estudos que avaliaram a toxicidade de ferro e de cobre sobre microalgas e cianobactérias. (Den. pop. = densidade populacional inicial, NI = Não informado).

Metal	Espécies	Filo	Den. pop. (cél/mL)	Meio de cultura	Reagente	Concentração metal (mg/L)	EDTA (mg/L)	pH	Correção do pH	Referência
Ferro	<i>Chlorella</i> sp.; <i>Chlamydomonas</i> sp.; <i>Chlorococcum</i> sp.	Chlorophyta	1x10 ⁵	Bold's Basal Medium	FeSO ₄ ; FeCl ₂ ; Fe(NO ₃) ₃	5 a 50	0	NI	NI	Subramaniyam <i>et al.</i> , 2016
	<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	Chlorophyta	1x10 ⁴	OECD	Fe ₂ (SO ₄) ₃ ·nH ₂ O	1,25 a 14,9	0	6,3; 8	MES; HEPES	Arbildua <i>et al.</i> , 2017
	<i>Chlamydomonas acidophila</i>	Chlorophyta	1–2x10 ⁷	Lake water	Fe ₂ (SO ₄) ₃	1 a 1200	0	~2,36	NI	Spijkerman <i>et al.</i> , 2018
Cobre	<i>Microcystis aeruginosa</i> ; <i>Chlorella pyrenoidosa</i>	Cyanobacteria; Chlorophyta	1,5x10 ⁶ 3x10 ⁶	Allen's; Gorham's	CuSO ₄ ; 1 parte CuSO ₄ 2 partes ácido cítrico; Algeeclear; Cuprose (Texas); Cuprose (Nalco)	0,25 a 3,00	0	7; 9	NI	Fitzgerald e Faust, 1963
	<i>Chlorella pyrenoidosa</i> ; <i>Nitzschia palea</i>	Chlorophyta; Bacillariophyta	1x10 ⁵	Osterlind B	CuSO ₄	0,001 a 0,005	0,250	8	NI	Nielsen e Wiium-Andersen, 1970
	<i>Selenastrum capricornutur</i>	Chlorophyta	1x10 ⁷ 0,001 mL de volume condensado	AAPBT	CuCl ₂	<0,05 a >0,30	0	~7	NI	Bartlett e Rabe, 1974
	<i>Chlorella vulgaris</i>	Chlorophyta	-0,2x10 ⁶	Bold's Basal Medium modificado	CuSO ₄	0,2 e 0,4	0	6,2	NI	Butler <i>et al.</i> , 1980
	<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	Bacillariophyta	24x10 ⁴	Água do mar filtrada	CuCl ₂	0,05 a 1,00	0	7,6	NI	Cid <i>et al.</i> , 1995
	<i>Chlamydomonas acidophila</i>	Chlorophyta	5x10 ⁵	Modified Sager-granick	CuCl ₂ ·2H ₂ O	6,35 a 63,55	0	4	NaOH	Nishikawa e Tominaga, 2001
	<i>Scenedesmus subspicatus</i>	Chlorophyta	2x10 ⁴	OECD	CuSO ₄ ·5H ₂ O	~0,67 a 9,92	6328 e 12656	8	NI	Ma <i>et al.</i> , 2003
	<i>Chlorella kessleri</i> ; <i>Scenedesmus acutus</i> ; <i>Coelastrum sphaericum</i>	Chlorophyta	1,5x10 ⁶	Bold's Basal Medium	CuCl ₂ ·2H ₂ O	17,4 e 34,8	> 0	NI	NI	Schiariti <i>et al.</i> , 2004
	<i>Nitzschia closterium</i> ; <i>Chlorella</i> sp.	Bacillariophyta; Chlorophyta	2-4x10 ⁴	água do mar filtrada; água mole sintética	CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,010 a 0,160; 0,002 a 0,020	0	8; 7,5	NI	Johnson <i>et al.</i> , 2007
	<i>Minutocellus polymorphus</i> ; <i>Phaeodactylum tricornutum</i> ; <i>Nitzschia closterium</i> ; <i>Dunaliella tertiolecta</i> ; <i>Micromonas pusilla</i> ; <i>Tetraselmis</i> sp.; <i>Heterocapsa niei</i> ; <i>Isochrysis</i> sp.; <i>Gephyrocapsa oceanica</i> ; <i>Emiliana huxleyi</i> ; <i>Proteomonas sulcata</i> <i>Odontella mobiliensis</i>	Bacillariophyta; Chlorophyta; Miozoa; Prymnesiophyta; Cryptista	1–2x10 ³	Água do mar filtrada	CuSO ₄ ·5H ₂ O	máximo de 1	0	NI	NI	Levy <i>et al.</i> , 2007
	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	Chlorophyta	~1.8 x10 ⁴	Água do mar filtrada + f2	CuCl ₂ ·2H ₂ O	0,052 a 0,926	0	8	NI	Manimaran <i>et al.</i> , 2012
	<i>Chlorella sorokiniana</i> ; <i>Scenedesmus acuminatus</i>	Chlorophyta; Cyanobacteria	1x10 ⁴ 48x10 ⁵ ; 25x10 ⁵	Tris–Acetate–Phosphate (TAP) optimized culture medium (OCM)	CuSO ₄ CuCl ₂ ·2H ₂ O	0,5 a 7,9 1,59 a 25,42	0	NI 7	NI	Jamers <i>et al.</i> , 2013 Hamed <i>et al.</i> , 2017
	<i>Scenedesmus quadricauda</i> ; <i>Scenedesmus subspicatus</i> ; <i>Oscillatoria agardhii</i>		1x10 ⁴	standard EPA	CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,05 a 2,00	0,3	7,2; 7,5	NI	Fawaz <i>et al.</i> , 2018
	<i>Desmodesmus</i> sp.	Chlorophyta	~10 ⁵	Jaworski's	CuSO ₄ ·5H ₂ O	2 a 50	0	4; 6	HCl	Buayam <i>et al.</i> , 2019
<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	Chlorophyta	1x10 ⁴	OECDm; AAPm; BBm	CuCl ₂ ·2H ₂ O	0,0001 a 10	0,1 a 10,0; 5,0 a 50,0	6,5	MOPS e NaOH; HCl e NaOH	Pascual <i>et al.</i> , 2020	
<i>Chaetoceros calcitrans</i> ; <i>Nitzschia closterium</i>	Bacillariophyta	1x10 ⁴	f2	CuCl ₂ ·2H ₂ O	0,095 a 0,76	0	8	NI	Neethu <i>et al.</i> , 2021	
<i>Selenastrum gracile</i>	Chlorophyta	~5x10 ⁴	L.C. Oligo	CuCl ₂ Titrisol	0,04 a 0,51	0	7	NI	Rocha <i>et al.</i> , 2021	

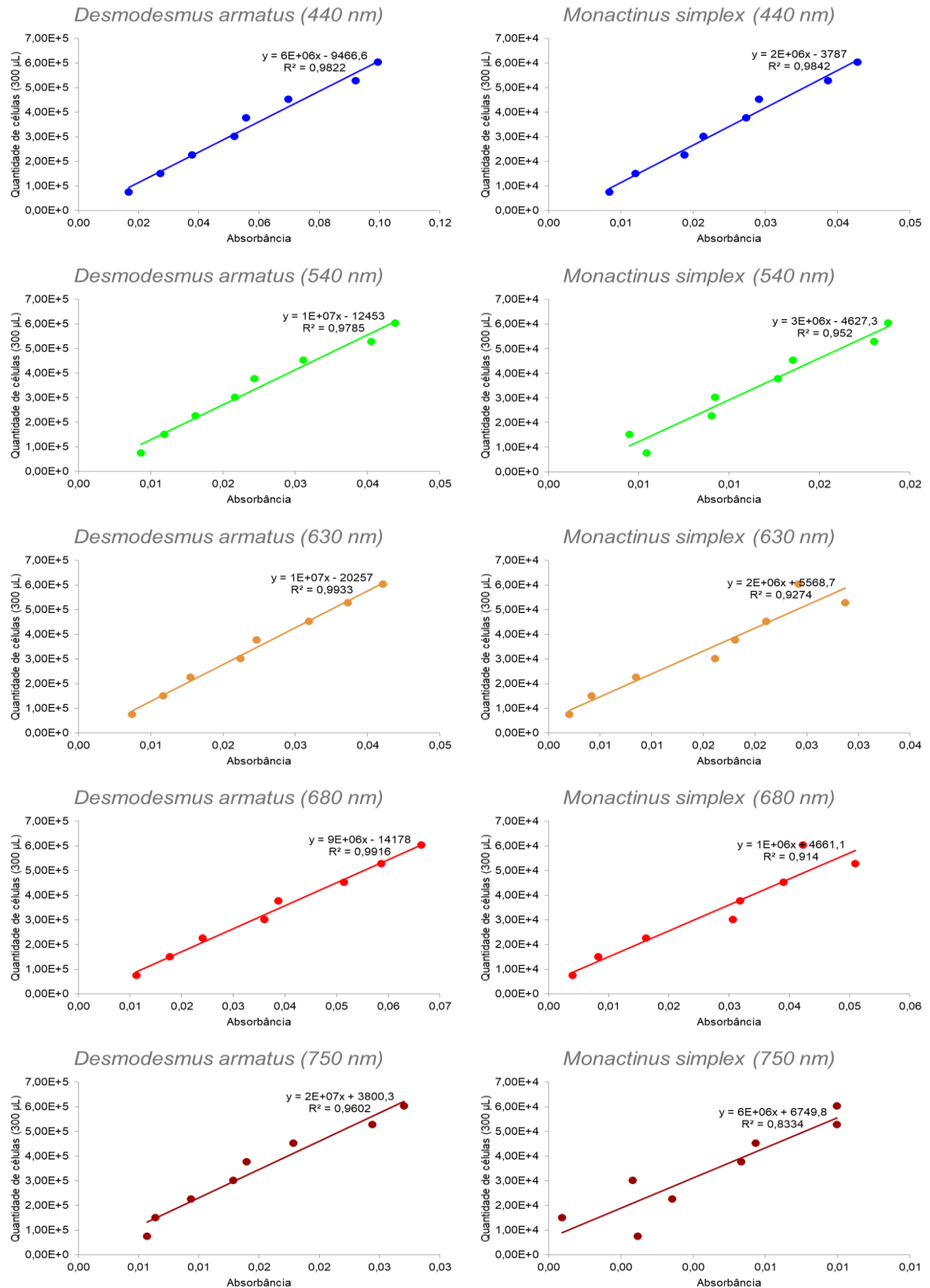


Figura 1: Regressão linear entre os valores de densidade populacional e absorvância para as culturas estoque de *Desmodesmus armatus* e *Monactinus simplex*.

que o ajuste para *M. simplex* foi adequado ($R^2 > 0,98$) somente no comprimento de onda de 440 nm (Figura 1). Dessa forma, como estratégia de padronização de métodos, as equações obtidas pelas regressões lineares para 440 nm foram utilizadas para a quantificação do número de células nos dois experimentos.

4.3. Curvas de crescimento

Com base na leitura de absorbância, algumas amostras apresentaram valores negativos para *M. simplex*, fazendo com que a aplicação do modelo obtido na análise de regressão resultasse em densidade populacional com valor negativo (Figura 2). Como não é possível que a densidade populacional seja realmente negativa, esses valores foram substituídos pelo mesmo valor de densidade populacional do inóculo, considerando apenas que não teria ocorrido crescimento populacional nesses tratamentos e respectivas datas de amostragens. Sendo possível que os valores negativos pudessem estar relacionados a uma diminuição da densidade populacional das culturas a níveis mais baixos do que o limite de detecção do leitor de placas ELISA, não haveria confiabilidade nos valores exatos negativos para as comparações por ANOVA, sendo preferível substituir as densidades negativas pelas menores densidades conhecidas, ou seja, aquelas detectadas no início dos experimentos.

Apesar de haver o acréscimo de EDTA em elevadas proporções para evitar a precipitação de metais, ao menos parte do Fe presente nos meios usados para os testes do Fe precipitou em todos os tubos após a esterilização em autoclave, mantendo-se como partículas insolúveis durante todo o período experimental (Figura 3). Ainda que isto possa representar um artefato experimental, foi possível detectar diferença no crescimento entre os tratamentos para ambas as espécies (Figura 4). O crescimento de *D. armatus* foi mais alto na concentração T3, seguido pelo crescimento observado nos tratamentos T1, T2 e T4, que não diferiram entre si e exibiram maiores valores de crescimento do que aqueles observados no controle para o meio

de cultura (Cm) e no tratamento T5, ambos também não diferindo entre si. O controle de EDTA foi o que apresentou crescimento mais baixo (Figura 4). O crescimento de *M. simplex* foi maior nos tratamentos T3 e T2. O crescimento no tratamento T2 também foi igual ao crescimento observado no controle para o meio de cultura e nos tratamentos T1 e T4. Os menores valores de crescimento foram observados no tratamento T5 e no controle para EDTA (Ce), que não diferiram entre si (Figura 4).

Ajustado ao método proposto, não houve precipitação de cobre após a esterilização em autoclave. O experimento realizado para avaliar os efeitos deste metal no crescimento das algas mostrou padrões similares àqueles observados no experimento feito para avaliar os efeitos do ferro (Figura 4). Para *D. armatus*, não houve diferenças entre o crescimento observado no controle do meio de cultura e em todas as concentrações de cobre. Algumas diferenças foram detectadas entre tratamentos, com as concentrações nos tratamentos T1 e T3 resultando em maior crescimento do que o observado no tratamento T5. Nas concentrações de T2, T4 e T5, o crescimento também não foi diferente do crescimento detectado no controle para EDTA (Figura 4). Para *M. simplex*, o crescimento populacional nas concentrações de T1, T2, T3 e T4 foi igual ao registrado no controle para o meio de cultura e mais alto do que aquele registrado em T5 e no controle para EDTA, que foram iguais entre si (Figura 4).

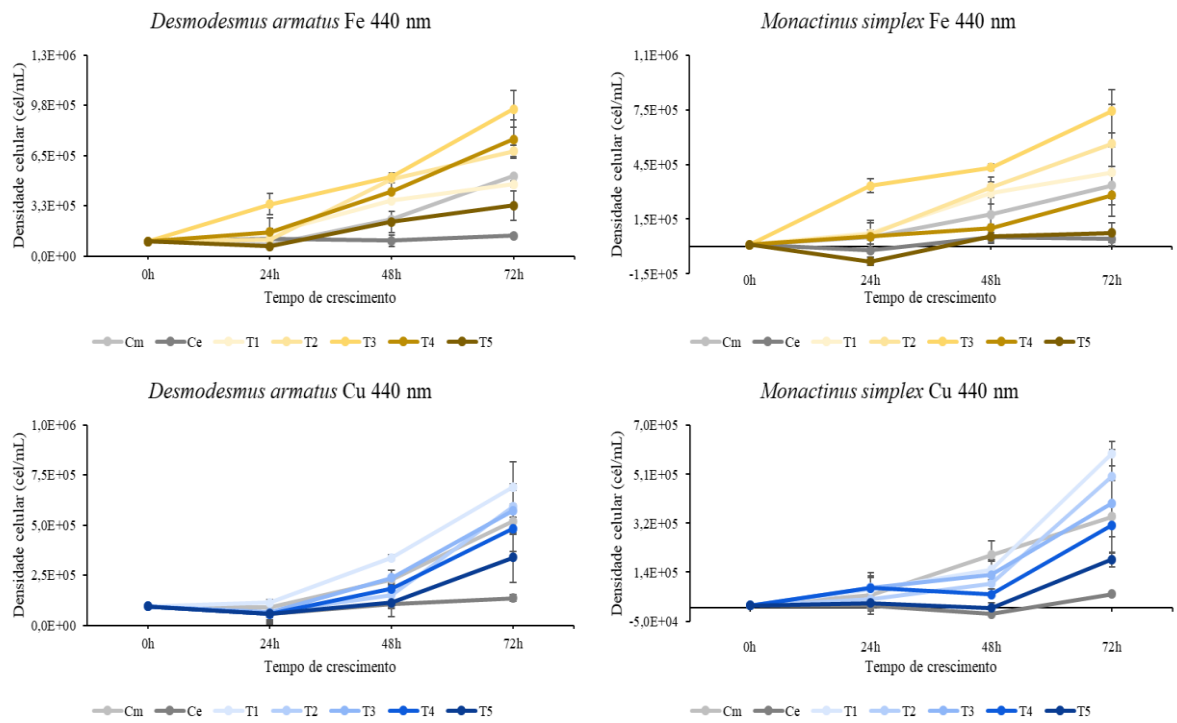


Figura 2: Curvas de crescimento de *Desmodesmus armatus* e *Monactinus simplex* nos tratamentos com ferro e cobre. Valores em média \pm desvio-padrão.



Figura 3: Meio de cultura para testes de ferro com material precipitado no fundo.

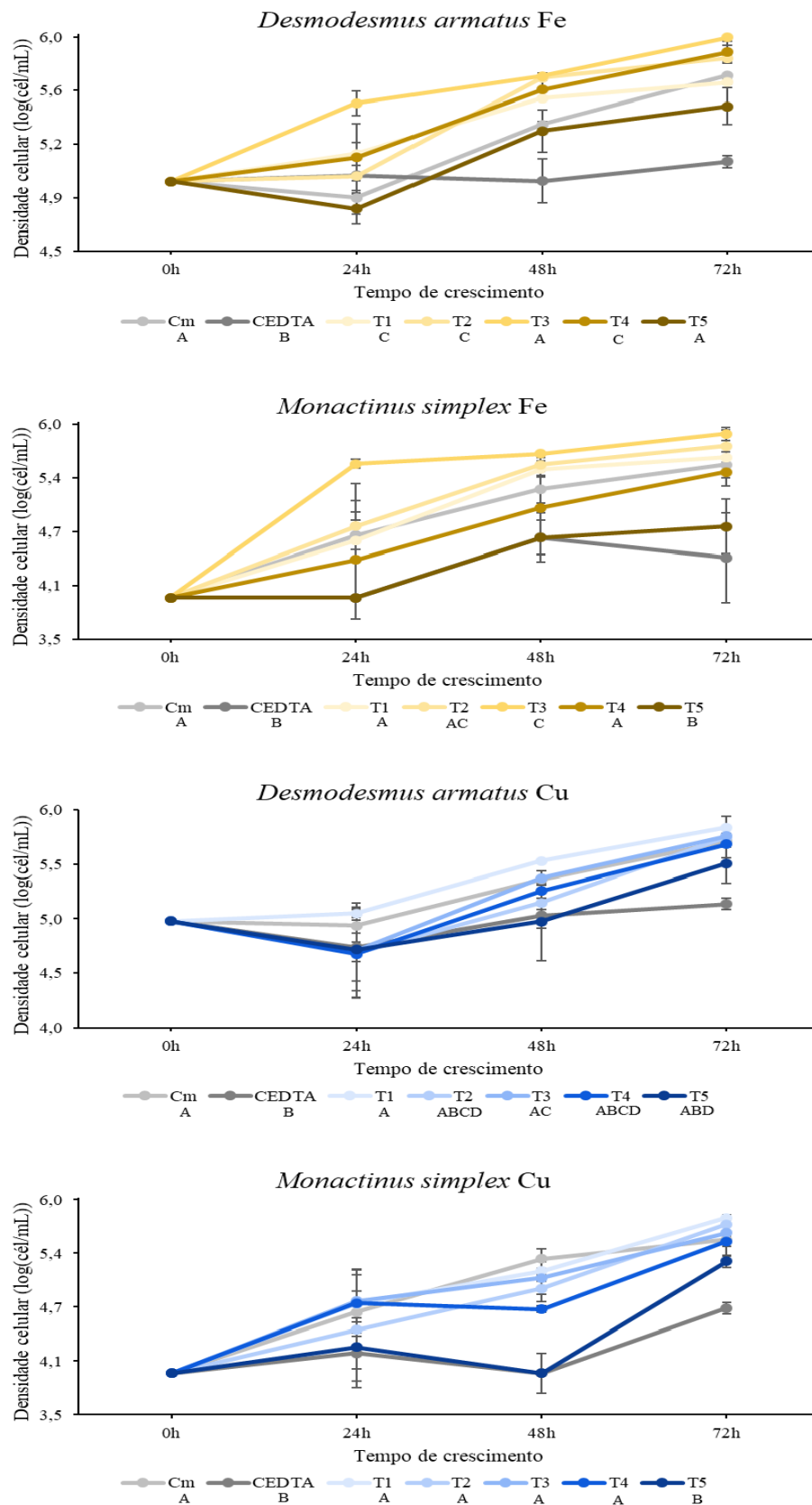


Figura 4: Curvas de crescimento das espécies *Desmodesmus armatus* e *Monactinus simplex* para os tratamentos com ferro e cobre. Letras iguais abaixo das legendas indicam semelhança estatística. Valores logaritmizados de média \pm desvio-padrão.

5. DISCUSSÃO

Embora não tenha sido o principal objetivo do presente estudo e de não ser uma proposta original do trabalho, ao longo de seu desenvolvimento foi necessário verificar a eficiência de alguns aspectos metodológicos que foram aplicados. Essa comparação foi importante justamente porque não há padronização entre os estudos publicados, dificultando o estabelecimento de condições experimentais. Uma vez que tais informações podem ser úteis a outros pesquisadores e que geralmente não são encontradas comparações deste tipo na literatura, estas serão debatidas aqui de modo a esclarecer e justificar as escolhas adotadas para a realização dos experimentos. A partir da análise da Tabela 1, foi possível perceber que não há padronização ou clareza de informações quanto aos testes de toxicidade de ferro e de cobre sobre microalgas e cianobactérias. Alguns estudos não informam o valor de pH no meio utilizado e muitos dos que informam o valor não mencionam de maneira clara como foi feito o ajuste para que o meio atingisse esse valor. Essas informações são relevantes porque o pH do meio pode interferir na toxicidade de metais (Skowroński *et al.*, 1991; Buayam *et al.*, 2019). Além disso, no presente estudo foi detectado que a adição de soluções com altas concentrações de metais nos meios de cultura usados nos tratamentos T4 e T5 pode resultar em uma diminuição do valor de pH, de cerca de 9 para cerca de 3, tanto para o ferro quanto para o cobre. Assim, a correção do pH do meio CHU10, geralmente para passar de 9 para 7,4 a partir da adição de HCl, sofre uma drástica modificação e passa a necessitar da adição de compostos alcalinos. Entretanto, esse ajuste de pH é um processo que pode levar à precipitação dos metais no meio de cultura, especialmente se feito com o uso de hidróxidos, que são utilizados, em outras aplicações, justamente com a finalidade de precipitar metais (Blais *et al.*, 2008). Isso geralmente é evitado com a adição de quelantes, como o EDTA, ao meio de cultura. O raro uso de EDTA nos estudos, somado a ausência de informação sobre a correção do pH, gera a dúvida se o metal presente no meio desses estudos realmente estava dissolvido. De modo

sintético, a grande variedade de valores de pH que podem ser atingidos (na dependência do tipo de meio de cultura, do tipo metal ou do sal contendo o metal, por exemplo) faz com que uma padronização por meio de um ajuste inicial do pH nos testes seja importante para permitir comparações entre estudos. É fundamental que seja mencionado nos textos referentes aos estudos não apenas o valor de pH, mas qual composto químico foi utilizado para a correção e, ainda, se foi necessário utilizar agentes quelantes para evitar a precipitação do metal, qual foi o quelante usado e em que concentração.

O meio de cultura utilizado nos trabalhos encontrados é o parâmetro que mais diverge entre os estudos. A padronização dele também é relevante, uma vez que particularidades em suas composições poderiam influenciar na toxicidade dos metais (Fitzgerald e Faust, 1963). Considerando essas diferenças entre os meios, fica difícil de se ter uma comparação confiável entre os resultados obtidos nos estudos, pois as diferenças observadas na resistência das espécies poderiam estar mais relacionadas ao meio de cultura do que às características dos metais ou da própria espécie. É possível que essas diferenças e a ausência de clareza sobre os métodos empregados contribua para a manutenção da ausência de padronização entre estudos, pois dificulta o estabelecimento de protocolos mais definitivos e que seriam mais eficientes em quantificar os efeitos dos metais sobre as algas e cianobactérias. Além dos protocolos padronizados facilitarem a realização de outros estudos, apresentam a vantagem de permitir comparações mais seguras entre estudos, pois os resultados seriam obtidos sob condições similares (Taylor e Scroggins, 2013).

Comumente, a densidade óptica é considerada uma forma adequada para estimar a densidade populacional em culturas de algas ou cianobactérias, sendo que os comprimentos de onda utilizados variam entre os que coincidem com os picos de absorção das clorofilas (440, 630 e 680 nm) e aqueles que se encontram totalmente fora do espectro de absorção destes pigmentos (540 e 750 nm) (Griffiths *et al.*, 2011; Breuer *et al.*, 2016; Nielsen e Hansen, 2019).

Neste trabalho verificou-se que os comprimentos de onda coincidentes com os picos de absorção das clorofilas apresentaram melhores ajustes quando comparados aos não coincidentes, sendo que apenas o comprimento de 440 nm teve um ajuste adequado para a quantificação da densidade populacional das duas espécies. As diferenças de resultados obtidos para as duas espécies em outros comprimentos de onda podem estar relacionadas às suas características morfológicas muito distintas, que atuariam de modo diferente na capacidade de cada cultura em barrar a passagem de luz. Enquanto *D. armatus* possui uma colônia com as células (geralmente duas ou quatro) distribuídas linearmente (Hentschke e Torgan, 2010), *M. simplex* possui uma colônia em forma de disco (Loaiza-Restano e Bicudo, 2014). Além disso, havia uma grande diferença de tamanho entre as colônias de *M. simplex* ($72,0 \pm 27,7 \mu\text{m}$, média \pm desvio-padrão) e as de *D. armatus* ($8,3 \pm 1,5 \mu\text{m}$ por $7,7 \pm 4,9 \mu\text{m}$) utilizadas neste estudo. É possível que a posição na qual as colônias das algas se encontram no momento da leitura possa influenciar os resultados obtidos, com a maior complexidade estrutural de *M. simplex* causando uma maior variação nas leituras do que aquela gerada por *D. armatus* (Kirk, 1976), especialmente ao utilizar comprimentos de onda menos sensíveis.

Uma outra possibilidade de artefato experimental parece ter ocorrido quanto ao tipo de equipamento usado para estimar a densidade populacional nas culturas. Apesar das densidades populacionais ($9,6 \times 10^4$ e $9,6 \times 10^3$ cél/mL) nos experimentos estarem na faixa de concentrações recomendada pela OECD (OECD, 2011) e que são comumente usadas em estudos toxicológicos (MA *et al.*, 2003; Manimaran *et al.*, 2012; Fawaz *et al.* 2018; Rocha *et al.*, 2021), geralmente entre 10^3 e 10^5 cél/mL, o uso de um leitor de placas de ELISA parece não ser muito adequado para as leituras de absorbância em culturas que possuem essas densidades. Desse modo, muitos dos valores encontrados foram negativos e, não sendo possível a existência de densidade populacional negativa, tais leituras podem ser consequência do pequeno volume usado para mensuração da absorbância. O aparelho utilizado realiza leituras em placas nas quais são

adicionados apenas 300 μL por amostra, o que pode ter feito com que a quantidade de células em várias amostras não fosse suficiente para serem adequadamente detectadas pelo aparelho, gerando valores muito próximos ou menores do que o valor obtido para o branco (meio de cultura puro). Isso foi mais evidente para *M. simplex*, provavelmente também apresentando alguma relação com as características morfológicas das colônias ou com sua menor densidade populacional. Entretanto, no presente estudo, tais limitações do método foram percebidas somente após a realização dos experimentos, sendo que o protocolo experimental havia sido estabelecido previamente e fundamentado em outro estudo (KOČÍ *et al.*, 2006). A escolha de avaliar o crescimento das culturas por este método foi baseada na perspectiva de que a leitura em placas ELISA seria uma ferramenta rápida e precisa para a avaliação da densidade de células nas subamostras. Apesar das limitações, a maioria das leituras realizadas a 440 nm permitiram avaliar as respostas das duas espécies à presença de Fe e Cu no meio, principalmente porque nas últimas datas de amostragem os valores de absorbância estiveram acima da sensibilidade mínima de leitura pelo equipamento utilizado.

Além dos problemas relacionados às leituras de absorbância nas baixas densidades populacionais, ainda que em uma faixa estabelecida pela OCDE, outros artefatos experimentais foram detectados e é importante destacá-los para esclarecimento a outros pesquisadores que pretendem investigar interações entre metais e seres vivos. Os experimentos envolvendo excesso de Fe no meio CHU10 parecem ter apresentado um fator limitante a mais, quando comparados aos experimentos em resposta às concentrações de Cu no meio. Mesmo com a adição de EDTA, os tratamentos com Fe adicional mostraram a formação de precipitados, o que é indesejável. Isso é especialmente importante porque é possível que concentrações elevadas de EDTA até mesmo resultassem em outras respostas no estudo, conforme indicado pelas diferenças observadas no crescimento em Ce comparado ao crescimento em Cm, sem que o objetivo de sua adição ao meio fosse plenamente atingido. Há ainda a possibilidade de que o

EDTA diminuísse, ao menos parcialmente, a disponibilização do metal, de modo oposto ao objetivo de sua adição ao meio de cultura. Embora a interação com o EDTA deva diminuir a precipitação do metal, talvez este se torne menos acessível às algas quando comparado a sua forma iônica no meio. Estes efeitos e seus impactos nos resultados obtidos são suportados por outros estudos, que mostram que quelantes, em especial o EDTA, podem diminuir a toxicidade dos metais (Fitzgerald e Faust, 1963; Ma *et al.*, 2003; Pascual *et al.*, 2020). Assim, os casos nos quais foi observado um maior crescimento do que o registrado no meio CHU10 típico, sem adição dos metais, parecem estar relacionados a esta mitigação do efeito tóxico dos metais mediada pelas elevadas concentrações de EDTA usadas no presente estudo. Como tanto o ferro quanto o cobre são elementos essenciais para o metabolismo das algas (Morrissey e Bowler, 2012; Cavalletti *et al.*, 2022), um aumento em suas concentrações até um certo nível, com a presença de EDTA, parece ter garantido um maior crescimento populacional. Isso sugere um maior uso do metal, o que seria de grande importância para o processo de biorremediação, no qual é desejável que a espécie avaliada interaja ao máximo com o metal que se deseja remover do sistema, mas com mínimo impacto em seu metabolismo. É importante destacar, no entanto, que apesar do possível efeito positivo do EDTA, também foi constatado que altas doses desse composto apresentaram um efeito tóxico acentuado, evidenciado pelo fato de que o controle de EDTA apresentou o menor crescimento para ambas as espécies em relação a ambos os metais. Como poucos trabalhos testam o efeito do metal com EDTA, especialmente em altas concentrações deste, não fica clara qual a quantidade de EDTA que pode ser acrescentada ao sistema sem interferir no crescimento das algas.

O conjunto de resultados obtidos no presente estudo, ainda que tendo sido identificadas algumas limitações, permitiram perceber que ambas as espécies são capazes de sobreviver e crescer no meio contendo elevadas concentrações de ferro ou de cobre, até cerca de 31 e 21 mg/L, respectivamente, o que é desejável para projetos de biorremediação de águas

contaminadas. Dessa forma, é possível que ambas as espécies aqui testadas sejam efetivas para o uso em processos de biorremediação. Entretanto, ainda é necessário avaliar a eficiência de cada uma na remoção dos metais do meio de cultura, considerando o quanto de cada metal pode ser adsorvido e/ou absorvido por essas espécies.

6. CONCLUSÃO

Considerando que estudos enfocando a toxicidade de ferro sobre algas são proporcionalmente mais escassos, é importante que mais experimentos sejam realizados sobre as interações entre este metal e estes organismos, principalmente considerando a abundância de ferro em muitos sistemas e o fato deste ser o metal mais intensamente explorado em escala mundial. Também é necessário que haja maior padronização dos métodos empregados nos estudos científicos, facilitando as comparações de resultados. Os experimentos realizados no presente estudo mostraram que há vários pontos que necessitam de ajustes e que a ausência de padronização na literatura contribui para a dificuldade de estabelecimento de um protocolo simples e eficiente. Mais estudos são necessários em relação aos efeitos diretos e indiretos que o EDTA tem sobre as algas, pois este composto parece ter interagido com estes organismos ou afetou a disponibilização de metais nas condições experimentais estabelecidas. Mesmo com as limitações relacionadas aos métodos empregados neste estudo, o conjunto de resultados obtidos indicam que ambas as espécies, *Desmodesmus armatus* e *Monactinus simplex*, são capazes de sobreviver no meio contendo elevadas concentrações de ferro ou de cobre, tendo potencial para serem utilizadas em processos de biorremediação de águas contaminadas por metais.

7. REFERÊNCIAS

- AFONSO, T. F.; DEMARCO, C. F.; PIENIZ, S.; QUADRO, M. S.; CAMARGO, F. A. O.; ANDREAZZA, R. Analysis of *Baccharis dracunculifolia* and *Baccharis trimera* for Phytoremediation of Heavy Metals in Copper Mining Tailings Area in Southern Brazil. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, vol. 194, p. 694–708, 2022.
- ARBILDUA, J. J.; VILLAVICENCIO, G.; URRESTARAZU, P.; OPAZO, M.; BRIX, K. V.; ADAMS, W. J.; RODRIGUEZ, P. H. Effect of Fe (III) on *Pseudokirchneriella subcapitata* at circumneutral pH in standard laboratory tests is explained by nutrient sequestration. *Environmental Toxicology and Chemistry*, vol. 36, n. 4, p. 952–958, 2017.
- BACKMAN, C-M. Global supply and demand of metals in the future. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, vol. 71, n. 18, p. 1244-1253, 2008.
- BARTLETT, L.; RABE, F. W. Effects of copper, zinc and cadmium on *Selenastrum capricornutum*. *Water Research*, vol. 8, p.: 179-185, 1974.
- BREUER, F.; DÖREN, L.; EBKE, K-P. Comparison of four measuring techniques to assess growth inhibition in standardized tests with seven freshwater algae and cyanobacteria. *Toxicological & Environmental Chemistry*, vol. 98, n. 8, p. 1-12, 2016.
- BUAYAM, N.; DAVEY, M. P.; SMITH, A. G.; PUMAS, C. Effects of copper and ph on the growth and physiology of *Desmodesmus* sp. AARLG074. *Metabolites*, 9, 2019.
- BUTLER, M.; HASKEW, A. E. J.; YOUNG, M. M. Copper tolerance in the green alga, *Chlorella vulgaris*. *Plant, Cell and Environment*, vol. 3, p. 119-126, 1980.
- CAVALLETI, E.; ROMANO, G.; ESPOSITO, F. P.; BARRA, L. CHIAIESE, P.; BALZANO, S.; SARDO, A. Copper effects on microalgae: toxicity and bioremediation strategies. *Toxics*, vol. 10, 2022.
- CHANDRASHEKHARAIHAH, P. S.; SANYAL, D.; DASGUPTA, S.; BANIK, A. Cadmium biosorption and biomass production by two freshwater microalgae *Scenedesmus acutus* and *Chlorella pyrenoidosa*: An integrated approach. *Chemosphere*, vol. 269, 2021.
- CHU, S. P. The Influence of Mineral Composition of the Medium on the Growth of Planktonic Algae: Part I. Methods and Culture Media. *Journal of Ecology*. 30(2), p. 284-325.
- CID, A.; HERRERO, C.; TORRES, E.; ABALDE, J. Copper toxicity on the marine microalga *Phaedocylum tricornutum*: effects on photosynthesis and related parameters. *Aquatic Toxicology*, vol. 31, p. 165-174, 1995.
- CONKE, L. S. Barriers to waste recycling development: Evidence from Brazil. *Resources, Conservation & Recycling*, vol. 134, p. 129-135, 2018.
- COSTA, G. B.; RAMLOV, F.; RAMOS, B.; KOERICH, G.; GOUVEA1, L.; COSTA, P. G.; BIANCHINI, A.; MARASCHIN, M.; HORTA JR., P. A. Physiological damages of *Sargassum cymosum* and *Hypnea pseudomusciformis* exposed to race metals from tailing. *Environmental Science and Pollution Research*, vol. 26, p. 36486-36498, 2019.

CPRM, Serviço Geológico do Brasil. Monitoramento Especial do Rio Doce: Relatório 02 Geoquímica. Segunda Campanha de Campo 12 a 23 de novembro de 2015. Belo Horizonte - MG, Brasil, 2015. <http://www.cprm.gov.br/publique/media/RT_02_2015_MONIT_ESP_BACIA_RIO_DOCE_v4_.pdf>, acesso em 02 de fevereiro de 2023.

CRIST, R. H.; OBERHOLSER, K.; SHANK, N.; NGUYEN, M. Nature of bonding between metallic ions and algal cell walls. *Environmental Science & Technology*, vol. 15, n. 10, 1981.

DU, T.; BOGUSH, A.; EDWARDS, P.; STANLEY, P.; LOMBARDI, A. T.; CAMPOS, L. C. Bioaccumulation of metals by algae from acid mine drainage: a case study of Frongoch Mine (UK). *Environmental Science and Pollution Research*, vol. 29, p. 32261–32270, 2022.

ELLIOTT, E. T.; CASTAÑARES, L. G.; PERLMUTTER, D.; PORTER, K. G. Trophic-level control of production and nutrient dynamics in an experimental planktonic community. *Oikos*, vol. 41, n. 1, p. 7-16, 1983.

ENVIRONMENTAL MINING COUNCIL OF B.C. Acid mine drainage; mining & water pollution issues in BC. 2012. <<https://www.protectfishlake.ca/media/amd.pdf>>, acesso em 01 de fevereiro de 2023.

FAWAZ, E. G.; SALAM, D. A.; KAMAREDDINE, L. Evaluation of copper toxicity using site specific algae and water chemistry: Field validation of laboratory bioassays. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, vol. 155, p. 59–65, 2018.

FITZGERALD, G. P.; FAUST, S. L. Factors affecting the algicidal and algistatic properties of copper. *Applied Microbiology*, vol. 11, n. 4, p. 345-351, 1963.

GRAEDEL, T. E.; ALLWOOD, J.; BIRAT, J.-P.; BUCHERT, M.; HAGELÜKEN, C.; RECK, B. K.; SIBLEY, S. F.; SONNEMANN, G. UNEP, Recycling rates of metals - a status report. 2011. <https://wedocs.unep.org/bitstream/handle/20.500.11822/8702/Recycling_Metals.pdf?sequence=1&isAllowed=y>, acesso em 01 de fevereiro de 2023.

GRIFFITHS, M. J.; GARCIN, C.; HILLE, R. P.; HARRISON, S. T. L. Interference by pigment in the estimation of microalgal biomass concentration by optical density. *Journal of Microbiological Methods*, vol. 85, p. 119–123, 2019.

HAMED, S. M.; SELIM, S.; GERD KLÖCK, G.; ABDELGAWAD, H. Sensitivity of two green microalgae to copper stress: Growth, oxidative and antioxidants analyses. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, vol. 144, p. 19–25, 2017.

HENTSCHKE, G. S.; TORGAN, L. C. *Desmodesmus* e *Scenedesmus* (Scenedesmaceae, Sphaeropleales, Chlorophyceae) em ambientes aquáticos na Planície Costeira do Rio Grande do Sul, Brasil. *Rodriguésia*, vol. 61, n. 4, p. 585-601, 2010.

IBAMA, 2015. Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis, Ministério do Meio Ambiente. Diretoria de Proteção Ambiental e DIPRO e Coordenação Geral de Emergências Ambientais - CGEMA. Laudo Técnico Preliminar: impactos ambientais decorrentes do desastre envolvendo o rompimento da barragem de Fundão, em Mariana, Minas Gerais, novembro de 2015.

<http://www.ibama.gov.br/phocadownload/barragemdefundao/laudos/laudo_tecnico_preliminar_ibama.pdf>, acesso em 02 de fevereiro de 2023.

IBAMA, 2019. Rompimento de barragem da Vale em Brumadinho (MG) destruiu 269,84 hectares. <<http://www.ibama.gov.br/noticias/730-2019/1881-rompimento-de-barragem-da-vale-em-brumadinho-mg-destruiu-269-84-hectares>>, acesso em 02 de fevereiro de 2023.

JAMERS, A.; BLUST, R.; COEN, E. D.; GRIFFIN, J. L.; JONES, O. A. H. Copper toxicity in the microalga *Chlamydomonas reinhardtii*: an integrated approach. *Biometals*, vol. 26, p. 731-740, 2013.

JANČULA, D.; MARŠÁLEK, B. Critical review of actually available chemical compounds for prevention and management of cyanobacterial blooms. *Chemosphere*, vol. 85, n. 9, 2011.

JOHNSON, H. L.; STAUBER, J. L.; ADAMS, M. S.; JOLLEY, D. F. Copper and zinc tolerance of two tropical microalgae after copper acclimation. *Environmental Toxicology*, vol. 22, n. 3, p. 234-244, 2007.

KALAMARAS, G.; KLOUKINIOTI, M.; ANTONOPOULOU, M.; NTAIKOU, I.; VLASTOS, D.; ELEFThERIANOS, A.; DAILIANIS, S. The potential risk of electronic waste disposal into aquatic media: the case of personal computer motherboards. *Toxics*, vol. 9, 2021.

KAPAHÍ, M.; SACHDEVA, S. Bioremediation for heavy metal pollution. *Journal of Health and Pollution*, vol. 9, n. 24, p. 1-20, 2019.

KIRK, J. T. O. A theoretical analysis of the contribution of algal cells to the attenuation of light within natural waters III. Cylindrical and spheroidal cells. *New Phytologist*, vol. 77, n. 2, p. 341-358, 1976.

KOČÍ, V.; DRAGOUN, D.; LUKAVSKÝ, J. Determination of algal cell culture (*Desmodesmus subspicatus*) concentration using a microplate reader. *Algological Studies*, vol. 122, p. 123-135, 2006.

KOSSOFF, D.; DUBBIN, W. E.; ALFREDSSON, M.; EDWARDS, S. J.; MACKLIN, M. G.; HUDSON-EDWARDS, K. A. Mine tailings dams: characteristics, failure, environmental impacts, and remediation. *Applied Geochemistry*, vol. 51, p. 229-245, 2014.

LAVOIE, M.; FAUCHEUR, S. L.; FORTIN, C.; CAMPBELL, P. G. C. Cadmium detoxification strategies in two phytoplankton species: Metal binding by newly synthesized thiolated peptides and metal sequestration in granules. *Aquatic Toxicology*, vol. 92, p. 65-75, 2009.

LEAL, P. R.; MOSCHINI-CARLOS, V.; LÓPEZ-DOVAL, J. C.; CINTRA, J. P.; YAMAMOTO, J. K.; BITENCOURT, M. D.; SANTOS, R. F.; ABREU, G. C.; POMPÊOA, M. L. M. Impact of copper sulfate application at an urban Brazilian reservoir: A geostatistical and ecotoxicological approach. *Science of the Total Environment*, vol. 618, p. 621-634, 2018.

LEVY, J. L.; STAUBER, J. L.; JOLLEY, D. F. Sensitivity of marine microalgae to copper: The effect of biotic factors on copper adsorption and toxicity. *Science of the Total Environment*, vol. 387, p. 141-154, 2007.

LI, W.; ACHAL, W. Environmental and health impacts due to e-waste disposal in China - a review. *Science of the Total Environment*, vol. 737, 2020.

LOAIZA-RESTANO, A. M.; BICUDO, C. E. M. Criptógamos do Parque Estadual das Fontes do Ipiranga, São Paulo, SP, Brasil. Algas 40: Chlorophyceae (Hydrodictyaceae). *Hoehnea*, vol. 41, n. 3, p. 353-364, 2014.

MA, M.; ZHU, W.; WANG, Z.; WITKAMP, G. J. Accumulation, assimilation and growth inhibition of copper on freshwater alga (*Scenedesmus subspicatus* 86.81 SAG) in the presence of EDTA and fulvic acid. *Aquatic Toxicology*, vol. 63, p. 221-228, 2003.

MANIMARAN, K.; KARTHIKEYAN, P.; ASHOKKUMAR, S.; PRABU, V. A.; SAMPATHKUMAR, P. Effect of copper on growth and enzyme activities of marine diatom, *Odontella mobiliensis*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, vol. 88, n. 1, p. 30-37, 2012.

MCMILLAN, C. A.; SKERLOS, S. J.; KEOLEIAN, G. A. Evaluation of the Metals Industry's Position on Recycling and its Implications for Environmental Emissions. *Journal of Industrial Ecology*, vol. 16, n. 3, p. 324-333, 2012.

MORRISSEY, J.; BOWLER, C. Iron utilization in marine cyanobacteria and eukaryotic algae. *Frontiers in Microbiology*, vol. 3, 2012.

NAIMO, T. J. A review of the effects of heavy metals on freshwater mussels. *Ecotoxicology*, vol. 4, p. 341-362, 1995.

NEETHU, K. V.; SARANYA1, K. S.; KRISHNA, N. G. A.; PRAVED, P. H.; ANEESH, B. P.; NANDAN, S. B.; MARIGOUDAR, S. R. Toxicity of copper on marine diatoms, *Chaetoceros calcitrans* and *Nitzschia closterium* from Cochin estuary, India. *Ecotoxicology*, vol. 30, p. 783-793, 2021.

NIELSEN, E. S.; WIUM-ANDERSEN, S. Copper ions as poison in the sea and in freshwater. *Marine Biology*, vol. 6, p. 93-97, 1970.

NIELSEN, S. L.; HANSEN, B. W. Evaluation of the robustness of optical density as a tool for estimation of biomass in microalgal cultivation: The effects of growth conditions and physiological state. *Aquaculture Research*, vol. 50, p. 2698-2706, 2019.

NISHIKAWA, K.; TOMINAGA, N. Isolation, growth, ultrastructure, and metal tolerance of the green alga, *Chlamydomonas acidophila* (Chlorophyta). *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, vol. 65, n 12, p. 2650-2656, 2001.

NOLAN, K. R. Copper toxicity syndrome. *Journal of Orthomolecular Psychiatry*, vol. 12, n. 4, p. 270-282, 1983.

OECD. 2011. *Test No. 201: Freshwater Algae and Cyanobacteria, Growth Inhibition Test*. Paris, França: s.n., 28 de julho de 2011. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2, OECD Publishing. <<https://www.oecd-ilibrary.org/docserver/9789264069923-en.pdf?expires=1675354484&id=id&accname=guest&checksum=3BB17C0B8F8081393096FFA7C1B4FF0F>>, acesso em 13 de julho de 2022.

- OECD. 2022. *Regulatory Governance in the Mining Sector in Brazil*, OECD Publishing, Paris. <https://www.oecd-ilibrary.org/governance/regulatory-governance-in-the-mining-sector-in-brazil_63d60aa8-en>, acesso em 09 de fevereiro de 2023.
- PASCUAL, G.; SANO, D.; SAKAMAKI, T.; NISHIMURA, O. Effects of chemical interaction of nutrients and EDTA on metals toxicity to *Pseudokirckneriella subcapitata*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, vol. 203, 2020.
- PICKHARDT, P. C.; FOLT, C. L.; CHEN, C. Y.; KLAUE, B.; BLUM, J. D. Algal blooms reduce the uptake of toxic methylmercury in freshwater food webs. *PNAS*, vol. 99, n. 7, p. 4419-4423, 2002.
- QUEIROZ, H. M.; NÓBREGA, G. N.; FERREIRA, T. O.; ALMEIDA, L. S.; ROMERO, T. B.; SANTAELLA, S. T.; BERNARDINO, A. F.; OTERO, X. L. The Samarco mine tailing disaster: a possible time-bomb for heavy metals contamination? *Science of the Total Environment*, vol. 637, p. 498-506, 2018.
- RECK, B. K.; GRAEDEL, T. E. Challenges in metal recycling. *Science*, vol. 337, p. 690-695, 2012.
- RIBEIRO, J. G. R.; SANTOS, M. F.; CHAGAS, N. S. O impacto causado ao meio ambiente pelo descarte incorreto de pilhas e baterias. UNA, Pouso Alegre, 2022. <<https://repositorio.animaeducacao.com.br/handle/ANIMA/24687>>, acesso em 02 de fevereiro de 2023.
- ROCHA, G. S.; PARRISH, C. C.; ESPÍNDOLA, E. L. G.. Effects of copper on photosynthetic and physiological parameters of a freshwater microalga (Chlorophyceae). *Algal Research*, vol. 54, 2021.
- ROYER, A.; SHARMAN, T. Copper Toxicity. StatPearls Publishing, 2022. <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK557456/>>, acesso em 03 de fevereiro de 2023.
- SCHÄFER, P.; SCHMIDT, M. Model-based analysis of the limits of recycling for its contribution to climate change mitigation. *NachhaltigkeitsManagementForum*, vol. 29, p. 65–75, 2021.
- SCHIARITI, A.; JUÁREZ, Á, B.; RODRÍGUEZ, M. C. Effects of sublethal concentrations of copper on three strains of green microalgae under autotrophic and mixotrophic culture conditions. *Algological Studies*, vol. 114, p. 143-157. 2004.
- SILVA, L. J.; FIGUEREDO, C. C. Algae as biosorption agents for recovering environments contaminated by trace metals: an overview of a potentially useful tool for mine disasters in Brazil. *Biologia*, vol. 78, p. 1-14, 2023.
- SKOWROŃSKI, T.; SZUBIŃSKA, S.; PAWLIK, B.; JAKUBOWSKI, M.; BILEWICZ, R.; CUKROWSKA, E. The influence of pH on cadmium toxicity to the green alga *Stichococcus bacillaris* and on the cadmium forms present in the culture medium. *Environmental Pollution*, vol. 74, n. 2, p. 89-100, 1991.
- SÖDERHOLM, P.; EKVALL, T. Metal markets and recycling policies: impacts and challenges. *Mineral Economics*, vol. 33, p. 257-272, 2020.

SPIJKERMAN, E.; BEHREND, H.; FACH, B.; GAEDKE, U. Decreased phosphorus incorporation explains the negative effect of high iron concentrations in the green microalga *Chlamydomonas acidophila*. *Science of the Total Environment*, vol. 626, p. 1342–1349, 2018.

SUBRAMANIYAM, B.; SUBASHCHANDRABOSE, S. R.; THAVAMANI, P.; CHEN, Z.; KRISHNAMURTI, G. S. R.; NAIDU, R.; MEGHARAJ, M. Toxicity and bioaccumulation of iron in soil microalgae. *Journal of Applied Phycology*, vol. 28, p. 2767-2776, 2016.

Taylor, L. N.; Scroggins, R. P. *Standardization of Ecotoxicological Tests: The Process. Encyclopedia of Aquatic Ecotoxicology*, 1073–1080, 2013.

VERGILIO, C. S.; LACERDA, D.; OLIVEIRA, B. C. V.; SARTORI, E.; CAMPOS, G. M.; PEREIRA, A. L. S.; AGUIAR, D. B.; SOUZA, T. S.; ALMEIDA, M. G.; THOMPSON, F.; REZENDE, C. E. Metal concentrations and biological effects from one of the largest mining disasters in the world (Brumadinho, Minas Gerais, Brazil). *Scientific Reports*, vol. 10, 2020.

VERGILIO, C. S.; LACERDA, D.; SOUZA, T. S.; OLIVEIRA, B. C. V.; FIORESI, V. S.; SOUZA, V. V.; RODRIGUES, G. R.; BARBOSA, M. K. A. M.; SARTORI, E.; RANGEL, T. P.; ALMEIDA, D. Q. R.; ALMEIDA, M. G.; THOMPSON, F.; REZENDE, C. E. Immediate and long-term impacts of one of the worst mining tailing dam failure worldwide (Bento Rodrigues, Minas Gerais, Brazil). *Science of The Total Environment*, vol. 756, p. 143697-143709, 2021.

VIDAL, O.; GOFFÉ, B.; ARNDT, N. Metals for a low-carbon society. *Nature Geoscience*, vol. 6, p. 894-896, 2013.

WATARI, T.; NANSAI, K.; NAKAJIMA, K. Major metals demand, supply, and environmental impacts to 2100: A critical review. *Resources, Conservation & Recycling*, vol. 164, 2021.

WERNICK, I. K.; THEMELIS, N. J. Recycling metals for the environment. *Annual Review of Energy and the Environment*, vol. 23, p. 465-497, 1998.

YUEN, H. W.; BECKER, W. Iron Toxicity. StatPearls Publishing, 2022. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK459224/>, acesso em 03 de fevereiro de 2013.