

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA E RECURSOS NATURAIS

Larissa Luiza dos Reis

Efeitos do cádmio e do cobalto no crescimento e em
parâmetros bioquímicos e fotossintéticos da clorofícea
Raphidocelis subcapitata

SÃO CARLOS - SP
2019

LARISSA LUIZA DOS REIS

Efeitos do cádmio e do cobalto no crescimento e em parâmetros bioquímicos e fotossintéticos da clorófitica *Raphidocelis subcapitata*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Recursos Naturais (PPGERN) da Universidade Federal de São Carlos, para obtenção do título de Mestre em Ecologia e Recursos Naturais.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Maria da Graça Gama Melão

São Carlos-SP
2019



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Recursos Naturais

Folha de Aprovação

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Dissertação de Mestrado da candidata Larissa Luiza dos Reis, realizada em 01/02/2019:

Maria da Graça G. Melão

Profa. Dra. Maria da Graça Gama Melão
UFSCar

Odete Rocha

Profa. Dra. Odete Rocha
UFSCar

Raquel Andrade de Rossi

Profa. Dra. Raquel Andrade de Rossi
ALGAE

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, que foi o meu sustento nesse tempo, a Nossa Senhora e sua sempre fiel intercessão.

Aos meus pais, Itamar e Neusa, por todo apoio nessa nova fase e por sonharem comigo. Obrigada pela paciência, carinho e pelo descanso que sempre tive em casa.

Aos meus familiares, pela torcida e orações durante esse tempo.

Ao Fabriel, pela paciência e compreensão, nas ausências e dias difíceis. Obrigada por estar ao meu lado em mais essa conquista.

Aos meus amigos, que são anjos na minha caminhada, agradeço as orações, conversas, conselhos e momentos de descontração.

A todos que de alguma forma foram força e auxílio nos meus dias difíceis.

Aos colegas de laboratório, por tudo que fizeram por mim, auxílio no trabalho, conselhos, jogos e todo o incentivo.

À minha orientadora, Prof.^a Dr.^a Maria da Graça Gama Melão, por todos os ensinamentos e orientações no trabalho.

Aos membros da banca de qualificação pelas importantes contribuições neste trabalho.

À Prof.^a Dr.^a. Ana Teresa Lombardi pela disposição ao uso do laboratório e equipamentos

À CAPES pela bolsa concedida.

À FAPESP pelo auxílio financeiro.

RESUMO

Os metais podem causar danos à biota de ambientes contaminados. O uso de múltiplos *endpoints* é necessário para melhor elucidar os mecanismos de toxicidade desses compostos. Este trabalho objetivou avaliar os efeitos do cádmio (Cd) e do cobalto (Co) sobre o crescimento, composição bioquímica e fotossíntese da microalga *Raphidocelis subcapitata*, através da quantificação de carboidratos, composição lipídica, concentração de clorofila *a* (Clo *a*), rendimentos quânticos máximo (Φ_M) e efetivo (Φ'_M), eficiência do complexo de evolução o oxigênio (CEO) e análise de *quenchings* fotoquímicos e não-fotoquímicos. Até o momento, este é o primeiro estudo relatando efeitos do Co sobre classes lipídicas de uma clorócea de água doce. Após 96 horas de exposição, encontramos uma IC₅₀ de 0,58 e 0,85 μ M, para Cd e Co, respectivamente. Ambos os metais levaram ao aumento no teor de lipídeos totais e diminuição da eficiência do CEO e Φ_M . A Clo *a* foi o *endpoint* mais eficiente para detectar toxicidade do Cd, após 96 horas de tratamento. Quanto ao Co, a densidade de células e o teor de lipídeos totais foram os *endpoints* mais sensíveis, pois foram alterados em todas as concentrações. As classes lipídicas mais afetadas pelo Cd foram éster de cera – WE (aumentou 8 vezes) e triacilgliceróis - TAG (diminuíram 47%), e na exposição ao Co foram esteróis - ST (aumentaram 4 vezes) e lipídios polares móveis em acetona - AMPL (diminuíram 60%). O uso de múltiplos *endpoints* permitiu detectar diferenças entre os mecanismos de ação de cada metal, bem como as consequências às microalgas. Além disso, as avaliações de toxicidade em nível celular realizadas neste estudo, a partir de parâmetros bioquímicos e de eficiência fotossintética, forneceram respostas mais rápidas a respeito dos danos causados pelos metais Cd e Co em comparação às avaliações tradicionais na ecotoxicologia, tais como medidas de crescimento populacional, principalmente no que concerne à interferência do Co na composição bioquímica da microalga.

Palavras-chave: Ecotoxicologia, cloróceas, metais, múltiplos *endpoints*.

Abstract

Heavy metals may cause damage to the biota of contaminated environments. The use of multiple endpoints is necessary to better elucidate the mechanisms of toxicity of these compounds. Therefore, this study aimed to evaluate the effects of cadmium (Cd) and cobalt (Co) on growth, biochemical and photosynthetic parameters of the microalgae *Raphidocelis subcapitata*, through quantification of carbohydrates, lipid composition, concentration of chlorophyll *a* (Chl *a*), maximum (Φ_M) and effective quantum yields (Φ'_M), efficiency of oxygen evolving complex (OEC) and photochemical and non-photochemical *quenchings* analysis. To date, this is the first study reporting Co effects in lipid classes of a freshwater Chlorophyceae. After 96 hours of exposure, we found an IC50 of 0.58 and 0.85 μ M of Cd and Co, respectively. Both metals led to increase of total lipid content and reduction of efficiency of OEC and of Φ_M . Chl *a* was the most efficient endpoint to detect Cd toxicity, after 96 hours of treatment. In relation to Co, cell density and total lipids content were the most sensitive endpoints, since they were altered in all concentrations. The lipid classes most affected by Cd were wax esters – WE (8-fold increase), and triglycerides – TAG (47% reduction), and Co exposure were sterols – ST (4-fold increase), and acetone mobile polar lipid – AMPL (60% reduction). The use of several endpoints enables to detect differences between the mechanisms of action of each metal, as well as the consequences to microalgae. In addition, the cell-level toxicity assessments carried out in this study based on biochemical parameters and photosynthetic efficiency provided faster responses regarding the damage caused by Cd and Co compared to traditional assessments in ecotoxicology, such as cell density measures, specially with regard to interference of Co in the biochemical composition of the microalgae.

Keywords: Ecotoxicology, Chlorophyceae, metals, multiple endpoints.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Esquema da fotossíntese – transporte de elétrons e reações nos fotossistemas. (Nelson e Cox, 2014. Lehninger Princípios de Bioquímica, 6 ed, pg 779) 19
- Figura 2.** Esquema da fotólise da água e resumo da fotossíntese. (Nelson e Cox, 2014. Princípios de Bioquímica de Lehninger, 6 ed, pg 787).....20
- Figura 3.** Espécie utilizada nos cultivos e testes ecotoxicológicos, *Raphidocelis subcapitata*. A esquerda em microscópio óptico (aumento 40x) e a direita cultivo em erlenmeyer com meio L.C. Oligo.....23
- Figura 4.** Testes ecotoxicológicos com a microalga *Raphidocelis subcapitata*.....25
- Figura 5.** Processo de extração lipídica. 26
- Figura 6.** Densidade de células da microalga *Raphidocelis subcapitata* exposta aos metais Cd (A) e Co (B) ao longo de 96 horas de experimento. As diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) foram calculadas pelo teste de Dunnett e estão evidenciadas com * 29
- Figura 7.** Teor de carboidratos totais (AB) e lipídeos totais (CD) na microalga *Raphidocelis subcapitata* após 96 horas de exposição aos metais Cd (AC) e Co (BD). As diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) foram calculadas pelos testes de Tukey e Dunnett para dados paramétricos (lipídeos totais) e Tukey Kramer e Dunn's para dados não-paramétricos (carboidratos totais) e estão evidenciadas com diferentes letras. 34
- Figura 8.** Teor de clorofila *a* na microalga *Raphidocelis subcapitata* ao longo de 96 horas de exposição aos metais Cd (A) e Co (B). As letras indicam diferença significativa em relação ao controle e aos tratamentos ($p < 0,05$). As análises estatísticas dos dados de 24 a 72 horas do Cd e as de 24 a 96 horas do Co foram calculadas pelos testes de Tukey e Dunnett. Os dados de 96 horas do Cd foram calculados pelos testes de Tukey Kramer e Dunn's..... 37
- Figura 9.** Rendimento quântico máximo (Φ_M) e medida da eficiência do complexo de evolução do oxigênio (F_0/F_v) de *Raphidocelis subcapitata* ao longo de 96 horas de exposição aos metais Cd (A) e Co (B). As diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) foram calculadas pelo teste de Dunnett para dados de 24 a 72 horas do Cd e 24 a 96 horas do Co e Dunn's para os dados de 96 horas do Cd, e estão evidenciadas com * 40

Figura 10. Rendimento efetivo (Φ'_M) (AB) e Quenchings qP, qN e NPQ (CD) avaliados em 72 horas de exposição da alga *Raphidocelis subcapitata* aos metais Cd (AC) e Co (BD). As diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) dos dados de Φ'_M , Φ_M e qP de ambos metais; e qN do Cd foram calculadas pelo teste de Dunnett para dados paramétricos. Os dados de NPQ de ambos metais e qN do Co foram calculados pelo teste de Dunn's para não-paramétricos e estão evidenciadas com * 42

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Composição meio L.C. Oligo (AFNOR, 1980)	23
Tabela 2. Valores das IC ₁₀ , IC ₂₅ e IC ₅₀ em µM e intervalo de confiança obtidos para <i>Raphidocelis subcapitata</i> exposta ao Cd e ao Co ao longo de 96 horas de exposição. O NC significa que não foi possível calcular pelo software ICPIN 2.0	30
Tabela 3. Concentração de íons livres de Cd calculadas pelo software MINEQL+ (versão 4.6)	30
Tabela 4. Concentração de íons livres de Co calculadas pelo software MINEQL+ (versão 4.6)	31
Tabela 5. Valor médio e desvio padrão de diferentes classes de lipídeos (pg cél ⁻¹) produzidas por <i>Raphidocelis subcapitata</i> , após 96 horas de exposição ao Cd e Co. Na tabela, HC denota hidrocarbonetos alifáticos; SE/WE, éster de cera; TAG, triacilglicerol; FFA, ácidos graxos livres; ST, esterol; AMPL, lipídeos polares móveis em acetona e PL, fosfolipídios. As diferenças estatisticamente significativas (p<0,05) foram calculadas pelos testes de Tukey e Dunett para dados paramétricos (WE, ST, AMPL e PL) e Tukey Kramer e Dunn's para dados não-paramétricos (HC, TAG e FFA) e estão evidenciadas com diferentes letras.....	35

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ϕ_M = rendimento quântico máximo do fotossistema II

ϕ'_M = rendimento quântico efetivo do fotossistema II

ALC = álcool alifático livre

AMPL = lipídios polares móveis em acetona

ANOVA = análise de variância

ATP = adenosina trifosfato

CEO = complexo de evolução do oxigênio

Cel = célula

Clo a = clorofila a

CdCl₂ = cloreto de cádmio

CoCl₂ = cloreto de cobalto

FFA = Ácidos graxos livres

F_m = fluorescência máxima de algas adaptadas ao escuro

F'_m = fluorescência máxima de algas adaptadas à luz

F₀ = fluorescência mínima de algas adaptadas ao escuro

F'₀ = fluorescência mínima de algas adaptadas à luz

F₀/F_v = eficiência do complexo de evolução do oxigênio

F_v/F_m = rendimento quântico máximo do fotossistema II

F'_v/F'_m = rendimento quântico efetivo do fotossistema II

HC = Hidrocarboneto alifático

IC₅₀ = Concentração de inibição média

NPQ = coeficiente de dissipação não fotoquímica

PAM = pulso de amplitude modulada

PL = fosfolipídeos

PSI = fotossistema I

PSII = fotossistema II

qN = coeficiente de dissipação não fotoquímica

qP = coeficiente de dissipação fotoquímica

ROS = espécies reativas de oxigênio

ST = esterois

TAG = triglicerídeos

WE/SE = ester de cera

Sumário

1. INTRODUÇÃO.....	13
2. REVISÃO DE LITERATURA	15
3. OBJETIVOS.....	23
3.1. Objetivo Geral.....	23
3.2. Objetivos específicos.....	23
4. MATERIAIS E MÉTODOS	23
4.1. Metais.....	23
4.2. Cultivo da microalga	24
4.3. Testes ecotoxicológicos.....	25
4.4. Densidade Celular	26
4.5. Análise bioquímica	26
4.5.1. Carboidratos totais	26
4.5.2. Lipídeos e classes lipídicas.....	27
4.6. Análise dos parâmetros fotossintéticos da microalga.....	28
4.6.1. Clorofila <i>a</i>	28
4.6.2. Atividade Fotossintética	28
4.7. Análise de dados	29
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	30
5.1. Densidade	30
5.2. Parâmetros bioquímicos	33
5.2.1. Carboidratos totais	33
5.2.2. Lipídeos totais e classes lipídicas	34
5.3. Parâmetros fotossintéticos.....	38
5.3.1. Clorofila <i>a</i>	38
5.3.2. Medidas do Phyto-Pam	39
5.3.3. Φ'_M e Quenchings	41
7. Referências.....	46

1. INTRODUÇÃO

Atividades antrópicas tais como industrialização, urbanização e atividades agrícolas, dentre outras, geram poluentes que ameaçam os ecossistemas aquáticos (Vörösmarty et al., 2010), causando desequilíbrio, estresse e perda da biodiversidade (Beketov et al., 2013). Nesse contexto, a revolução industrial tornou a ocorrência de metais cada vez mais frequente nos habitats aquáticos e terrestres, com consequentes danos a esses ecossistemas e à saúde humana, aumentando o interesse de pesquisas relacionadas ao estudo desse tipo de contaminação (Gadd et al., 2010). Os metais compõem cerca de 75% dos elementos químicos conhecidos, sendo indispensáveis à vida diária, com utilização na indústria, infraestrutura, em baterias, utensílios domésticos, peças de automóveis, lâmpadas e outros. Todavia, suas propriedades não biodegradáveis, fontes múltiplas e comportamentos cumulativos podem implicar em toxicidade à biota, afetando a saúde do ambiente como um todo, o que tem gerado crescente preocupação (Zhao et al., 2017).

Alguns metais são indispensáveis ao crescimento dos organismos em baixas concentrações, enquanto outros não desempenham nenhuma função biológica conhecida, sendo potencialmente tóxicos (Gaur e Adholeya, 2004). Sabe-se que o cádmio é um metal não essencial ao crescimento do fitoplâncton e atinge os ecossistemas através de atividades antrópicas como mineração, refino e fundição de metais, uso de fertilizantes fosfatados e descarte inadequado de pilhas e baterias (Samadani et al., 2018). No ambiente, o Cd pode atingir níveis tróficos superiores, uma vez que é facilmente absorvido e também bioacumulado, além de não ser biodegradável (Jamers et al., 2013). Alguns estudos têm demonstrado que, mesmo em baixas concentrações, esse metal apresenta toxicidade a diferentes espécies de microalgas, inibindo de maneira significativa seu crescimento (Monteiro et al., 2011), o conteúdo da clorofila (Qian et al., 2009), o desempenho do fotossistema II (PSII) (Andosh, et al., 2012) e o aumento da produção de carboidratos em resposta ao estresse gerado pela exposição ao metal (Alho et al., 2019; Pistocchi, et al., 2000).

O Co é um metal essencial para o crescimento do fitoplâncton, sendo constituinte da vitamina B-12 e necessário à maioria dos organismos (Adam e Garnier-Laplace, 2003). Além disso, tem diversos usos industriais, como componentes de corantes, ligas para fabricação de ferramentas de corte, ímãs de Co, dentre outros (Barceloux, 1999). Entretanto, efeitos danosos desse metal e seus íons já foram descritos. Eles são capazes de influenciar a oxidação de proteínas, causar danos oxidativos ao DNA induzindo a formação de espécies reativas de oxigênio (ROS – do inglês *reactive oxygen species*) (Novak et al., 2013); afetar o

crescimento de algumas espécies de algas, quando presentes em altas concentrações (Fathi et al., 2000; Fathi et al., 2008); diminuir a síntese de clorofilas *a* e *b*, além de reduzir a atividade fotossintética (El-sheekh et al., 2003).

A toxicidade dos metais e seus danos ao ambiente levaram ao aumento de estudos ecotoxicológicos com microrganismos, como as microalgas (Machado e Soares, 2013). As microalgas são importantes nos ecossistemas aquáticos já que, por serem produtores primários, são capazes de transformar a energia luminosa em energia química através da fotossíntese, produzindo grande quantidade de biomassa que, direta ou indiretamente, é fonte de alimento a outros níveis tróficos (Farrelly et al., 2013). A espécie de clorófitas escolhida para o desenvolvimento deste trabalho, *Raphidocelis subcapitata*, possui algumas vantagens, tais como facilidades no cultivo, rápido ciclo de vida e alta sensibilidade a tóxicos (Machado et al., 2015), que facilitam a investigação dos efeitos e alterações fisiológicas provocadas por metais (Machado e Soares, 2014).

O metabolismo das microalgas e seus processos bioquímicos, como síntese de carboidratos e lipídeos, sofrem alterações por mudanças nas condições de cultivo e em desequilíbrio ambiental (McLarnon-Riches et al., 1998). Estudos aprofundados sobre parâmetros bioquímicos podem auxiliar na melhor compreensão sobre os mecanismos de ação dos metais e também seus efeitos sobre a cadeia trófica, já que alterações bioquímicas podem ser transferidas a níveis tróficos superiores (Martínez-Ruiz e Martínez-Jerónimo, 2015).

Os parâmetros fotossintéticos são obtidos através das medidas de fluorescência de clorofila *a* das algas e podem ser utilizados em avaliações de toxicidade, uma vez que suas medições são simples, sensíveis e rápidas. O rendimento quântico máximo (Φ_M) e o rendimento quântico efetivo (Φ'_M) indicam a capacidade das microalgas adaptadas ao escuro e à luz, respectivamente, de converter energia luminosa em energia química. Os *quenchings* representam os caminhos que a energia absorvida seguiu no processo da fotossíntese. O *quenching* fotoquímico (qP) indica a porção de energia utilizada no transporte de elétrons, enquanto os não fotoquímicos (qN e NPQ) representam, respectivamente, a quantidade de energia luminosa dissipada por meios não fotoquímicos ou por perda de calor. Com isso, esses parâmetros permitem que se façam estudos sobre a fisiologia das microalgas e também sobre o efeito dos contaminantes em seu aparato fotossintético (Juneau et al., 2002).

Diante do exposto, é fundamental que os estudos sobre toxicidade de metais sejam aprofundados, a fim de que sejam conhecidos os mecanismos de ação e sítios alvo desses elementos sobre os produtores primários, bem como as possíveis consequências dos danos

causados pelos metais para outros níveis tróficos. Os estudos que avaliam os efeitos de metais sobre microalgas, em sua maioria, focam apenas a densidade celular, o teor de clorofila *a* e a produção de ROS (Fathi, 2008; Mallick e Mohn, 2003; Szivák, 2009). Por outro lado, estudos mais detalhados que investiguem alterações bioquímicas e fotossintéticas (Alho et al., 2019), trariam embasamento para melhor compreensão dos efeitos tóxicos dos metais sobre a fisiologia das algas e do modo de ação desses compostos na célula algal.

Sendo assim, o presente estudo objetivou avaliar os possíveis efeitos tóxicos dos metais Cd (não essencial ao crescimento da alga) e Co (essencial ao crescimento da alga) sobre a clorófitica *R. subcapitata*, utilizando múltiplos *endpoints* para permitir uma análise ecotoxicológica mais detalhada, em nível de composição bioquímica (carboidratos, lipídeos totais e classes lipídicas) e eficiência fotossintética (Φ_M , parâmetros fotossintéticos de Φ_M e Φ'_M , eficiência do complexo de evolução do oxigênio - F_0/F_v , de *quenchings* fotoquímicos e não fotoquímicos), além da análise dos metais sobre o crescimento da microalga. Este é o primeiro estudo relatando os efeitos do Co na composição de classes lipídicas em uma clorófitica de água doce e o primeiro utilizando múltiplos *endpoints* para avaliação da toxicidade de Cd e Co, simultaneamente.

2. REVISÃO DE LITERATURA

Os ecossistemas aquáticos sofrem com a poluição em todo mundo. A má gestão da água e o uso não sustentável da terra causam danos cada vez maiores a esses ecossistemas (Beyene et al., 2009). A contaminação da água se dá por diferentes fins (agrícola, doméstico e industrial), os quais liberam produtos químicos naturais ou sintéticos, que afetam a qualidade da água (Schwarzenbach et al., 2010). A ecotoxicologia é considerada uma vertente da toxicologia, que analisa os efeitos de poluentes encontrados no ecossistema. Sua primeira formal definição ocorreu em 1977 por Truhaut (Relyea e Hoverman, 2006). A ecotoxicologia aquática estuda as consequências da poluição normalmente nos seguintes níveis tróficos: produtores primários, dos quais fazem parte as microalgas; nível trófico intermediário, geralmente é utilizado o zooplâncton; e nível trófico superior, principalmente com peixes. São realizados testes ecotoxicológicos agudos e crônicos, dependendo do tempo de exposição ao composto, e também da sua concentração (Expósito et al., 2017).

A poluição dos ambientes aquáticos por metais é um problema mundial e preocupante,

devido a algumas particularidades como sua persistência no ambiente, toxicidade em baixas concentrações e sua capacidade de acumular-se nos tecidos animais (Ramakritinan et al. 2012; Hong et al. 2011). A presença dos metais no ambiente é acentuada por diversas atividades: intemperismo geológico, processos industriais, mineração, fundição, metalurgia, indústria têxtil, plásticos, pintura, fabricação de pneus, combustão de gasolina e combustíveis fósseis, produção de cimento, cerâmica, aço, indústrias de ração animal, papel e ligas (Kumar et al. 2015). Os ambientes aquáticos são susceptíveis ao acúmulo de metais, uma vez que os microrganismos são incapazes de degradar esses compostos que podem causar efeitos tóxicos à biota, via transferência na cadeia trófica ou via exposição (Alho et al. 2019).

O Cd, metal não essencial aos seres vivos, é considerado pela APE (Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos) como um dos três contaminantes de maior ameaça ao ambiente, juntamente com chumbo e mercúrio (Jamers et al., 2013). A absorção do metal por plantas terrestres e aquáticas ocorre facilmente, pois suas características físicas e químicas semelhantes a cátions bivalentes essenciais, como Fe^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Mn^{2+} e Ca^{2+} , permitem a substituição desses íons por Cd (Andosh et al., 2012). Além disso, o metal se acumula no ambiente, já que não é biodegradável e, com isso, pode ser transferido para níveis tróficos superiores (Chan et al., 2003).

A presença do Cd no ambiente ocorre por atividades antrópicas como incineração de resíduos, combustão de combustíveis fósseis, tráfego urbano, mineração, fundição e refino de metais não ferrosos, incineração de resíduos, uso de fertilizantes fosfatados (Samadani et al., 2018). O CONAMA (Conselho Nacional do Meio Ambiente) limita a 0,001 a 0,01 mg/L de Cd a concentração do metal em ecossistemas aquáticos, para garantir a qualidade da água aos organismos aquáticos e ao homem. Os danos causados pelo metal aos seres humanos foram descritos principalmente em relação aos rins e aos ossos, podendo causar câncer (Järup e Åkesson 2009).

Estudos anteriores indicaram a toxicidade do metal para diferentes organismos. Chinnasamy et al. (2010) relataram a diminuição do crescimento populacional de *Brachionus plicatilis* conforme o aumento da concentração de Cd. Zheng et al (2016) observaram os efeitos do Cd sobre fígado de *Danio rerio*, relatando danos oxidativos hepáticos na espécie. Os efeitos desse metal foram amplamente estudados para diferentes espécies de microalgas. Andosh et al (2012) relataram os danos sobre a atividade do fotossistema II e consequente produção do oxigênio sobre *Micrasterias*; Qian et al (2009) relataram a diminuição do crescimento, do teor de clorofila e também aumento de ROS em *Chlorella vulgaris* e Chia et al (2013) observaram para essa mesma espécie de alga, alteração na síntese de classes lipídicas.

O Co é um micronutriente essencial, necessário à formação da vitamina B12, e está presente na dieta humana e em alimentos como vegetais e peixes (Simonsen et al., 2012). A aplicabilidade do Co teve início no Egito e na Pérsia como corante azul para joias, vidro e cerâmica. Posteriormente, seus usos industriais foram ampliados para a fabricação de ferramentas, imãs de Co e desenvolvimento de miniaturas de equipamentos eletroeletrônicos (Barceloux, 1999). Esse metal é altamente tóxico em altas concentrações e em exposições a longo prazo (mesmo em baixas concentrações) (Simonsen et al., 2012). Nesse contexto, o CONAMA, limita os níveis de Co na água a uma concentração de 0,05 a 0,2 mg/L, a fim de garantir sua boa qualidade.

Estudos realizados anteriormente evidenciaram os efeitos do Co em diferentes níveis tróficos. Nagajyoti et al., 2010 relataram os efeitos do metal em plantas. Foram descritos danos no crescimento de brotos, alterações na biomassa, nos teores de clorofila e proteínas, e nas reações a nível celular. A toxicidade do metal foi testada para alguns organismos aquáticos, apresentando resultados de CL₅₀ (concentração letal média) de 263,02 e 22,4 µM de Co para *Cyclops abyssorum* e *Daphnia hyalina*, respectivamente (Baudouin 1974). São descritos alguns efeitos do Co sobre diferentes espécies de microalgas, sendo que os resultados encontrados indicam que o metal pode afetar a atividade fotossintética, o crescimento celular e o teor de pigmentos, especificamente a biossíntese da clorofila (El-sheekh et al., 2003; Afkar et al., 2010), mas ainda não há informação sobre os efeitos desse metal sobre a composição bioquímica, principalmente em relação as classes lipídicas em microalgas.

A contaminação dos ambientes por metais e seus danos sobre as microalgas levaram ao aumento dos testes de toxicidade utilizando algas como organismo teste, a fim de quantificar os efeitos adversos causados por esses compostos. Os bioensaios medem a resposta das algas expostas a contaminantes em diferentes concentrações (Horvatic et al., 2007). As microalgas são importantes em testes ecotoxicológicos pois são base de cadeia alimentar e, conseqüentemente, são fonte de alimento a níveis tróficos superiores, inclusive sendo fonte direta aos organismos zooplancctônicos, sendo esses últimos consumidos pelos peixes, por exemplo. Logo, danos nas microalgas podem afetar os níveis tróficos superiores. Além disso, o fitoplâncton é o conjunto de organismos fotossintetizantes que compõe uma parcela importante da comunidade aquática responsável pela produção de carbono orgânico e liberação de oxigênio através da fotossíntese (Martínez-Ruiz e Martínez-Jerónimo, 2015).

A classe Chlorophyceae é geneticamente, morfológicamente e ecologicamente a mais diversa das algas verdes. É composta por cinco ordens taxonômicas: Sphaeropleales, Chlamydomonadales, Chaetophorales, Chaetopeltidales e Oedogoniales. (Suzuki et al.,

2018). Os organismos que compõe essa classe são predominantemente de água doce e desempenham papel importante nos ecossistemas globais (Suzuki et al., *op. cit.*). Além disto, as algas unicelulares são modelos apropriados para estudos de toxicidade, uma vez que possuem alta superfície de contato em relação ao volume, o que aumenta sua exposição a contaminantes (Saison et al., 2010).

A espécie *R. subcapitata* era conhecida anteriormente como *Pseudokirchneriella subcapitata* ou *Selenastrum capricornutum* (Suzuki et al., 2018). Estudos anteriores (Ge et al., 2014) apontam que essa é uma espécie comumente testada e também a mais sensível entre outras espécies muito utilizadas. Além da alta sensibilidade, a OECD (Organização para cooperação e desenvolvimento econômico) também recomenda o uso dessa espécie em bioensaios ecotoxicológicos devido a sua alta taxa de crescimento (Suzuki et al., *op. cit.*). Testes de toxicidade com *R. subcapitata* como organismo-teste são também utilizados para avaliar os danos dos compostos na atividade fotossintética da espécie (Horvatic et al., 2007), além de diversos outros parâmetros.

Algumas condições ambientais ou de cultivo podem ser fatores estressantes para as microalgas e, com isso, a biomassa e a composição bioquímica são possivelmente alteradas (Rocha et al., 2018). Os carboidratos são macromoléculas que apresentam grande importância nesses organismos, uma vez que são intermediários nas reações das vias fotossintética e respiratória; são um meio de armazenar energia e estão presentes na estrutura da parede celular. A síntese dessa macromolécula pode ser alterada por estresse ambiental. Nessa condição, ocorre diminuição na produção de carboidratos pela microalga, o que pode estar relacionado à despolarização da membrana, devido ao excesso de íons, podendo acarretar outros danos como a deformação da parede celular, ou nas reações de fotossíntese (Martínez-Ruiz e Martínez-Jerónimo, 2015).

Os lipídeos são moléculas importantes para as microalgas, uma vez que são essenciais para as células, por fazerem parte da constituição das membranas plasmáticas e das organelas, atuando também como reserva de energia (Martínez-Ruiz e Martínez-Jerónimo, 2015). Os lipídeos produzidos por microalgas são divididos em duas categorias: lipídeos estruturais ou polares, como esteróis e fosfolipídeos; e lipídeos de armazenamento ou não polares, como lipídeos neutros. Alguns lipídeos polares têm função na sinalização celular, como precursor intermediário ou intermediário chave, como parte na resposta das células diante das mudanças ambientais. Os esteróis e os fosfolipídeos (lipídeos polares) têm função específica na membrana, participando de processos metabólicos e de eventos de fusão de membranas (Sharma et al, 2012).

A presença de alguns metais nos ecossistemas aquáticos alteram a síntese lipídica do fitoplâncton, podendo aumentá-la ou diminuí-la (Rocha et al., 2016). O acúmulo de lipídeos pelas microalgas em situações de estresse ambiental pode auxiliar esses organismos, pois são utilizados como reservas de alimento e, conseqüentemente, são fontes alternativas de energia necessárias à sobrevivência nessas condições (Chia et al., 2015). Além disso, os lipídeos de membrana podem atuar como uma barreira, impedindo a entrada de contaminantes. Porém, alguns contaminantes são mais lipossolúveis e conseguem adentrar as células com maior facilidade, outros podem ser internalizados por carreadores ou canais iônicos presentes na membrana (Rocha et al., 2016).

Estudos ecotoxicológicos que contenham avaliações sobre os parâmetros bioquímicos e os efeitos dos metais sobre os mesmos são importantes uma vez que fornecem informações sobre as respostas fisiológicas e bioquímicas das algas, permitindo avaliar os mecanismos e também os locais de ação dos metais nas células das microalgas (Alho et al., 2019).

Os principais pigmentos encontrados nas algas verdes são a clorofila *a* e *b*. A clorofila está intimamente ligada ao processo fotossintético. O aparato fotossintético é composto por dois fotossistemas, PSII e PSI. O PSII é composto por um complexo de pigmentos proteicos que aceleram a transferência de elétrons induzida pela luz, da água para a plastoquinona. São mais de 25 polipeptídeos responsáveis pela captação da luz em um complexo proteico de clorofila, um centro de reação, o P680, e um sistema de *watersplitting*, o CEO – complexo de evolução do oxigênio (Lombardi e Maldonado, 2011).

Os centros de reação do PSII e PSI das microalgas são denominados P680 e P700, respectivamente (Figura 1). A luz incide sobre as moléculas de clorofila e o centro de reação da molécula passa elétrons para a plastoquinona. A substituição desse elétron no PSII ocorre através da quebra da molécula água, provocada pela luz e catalisada pelo CEO, que contém manganês e libera prótons (H⁺) e oxigênio (Figura 2). O elétron é transportado até o complexo citocromo *b₆f* por proteínas que compõem a cadeia transportadora de elétrons e, em seguida, é transportado para o PSI. Essas reações são acompanhadas pela produção de ATP e NADPH, moléculas que serão utilizadas na próxima etapa da fotossíntese, a assimilação de carbono (Alho, 2016).

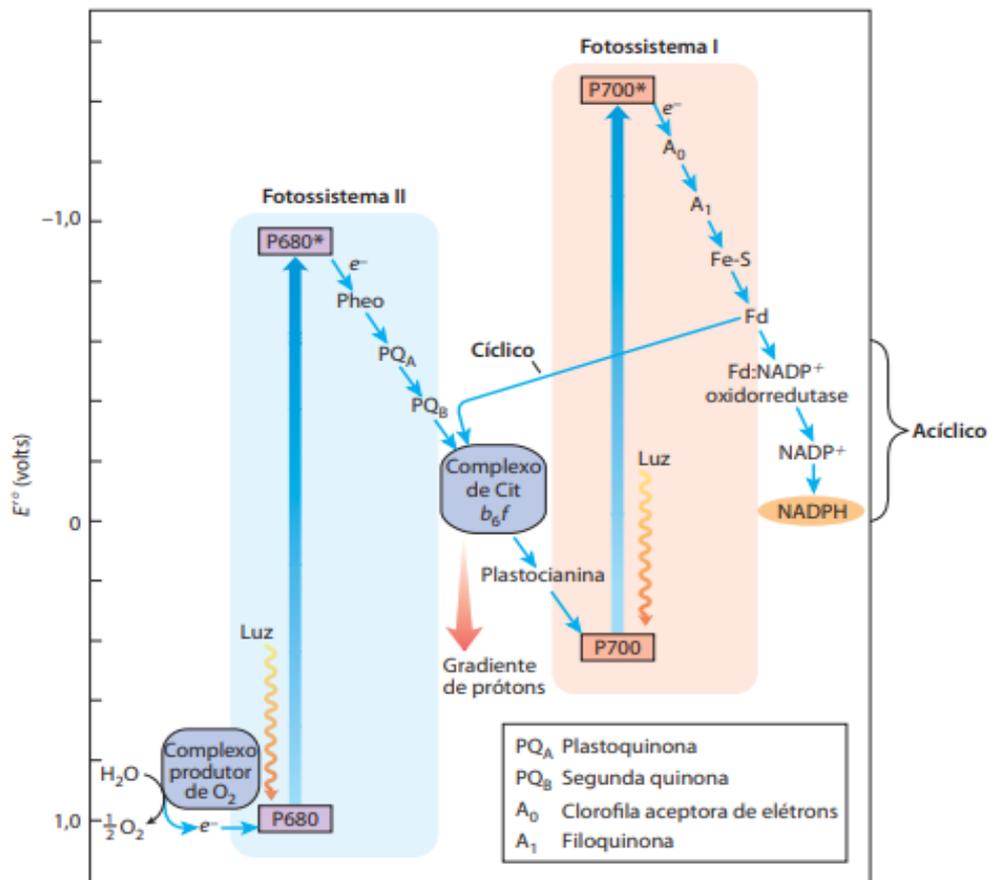


Figura 1. Esquema da fotossíntese – transporte de elétrons e reações nos fotossistemas. (Nelson e Cox, 2014. Princípios de Bioquímica de Lehninger, 6 ed, pg 779).

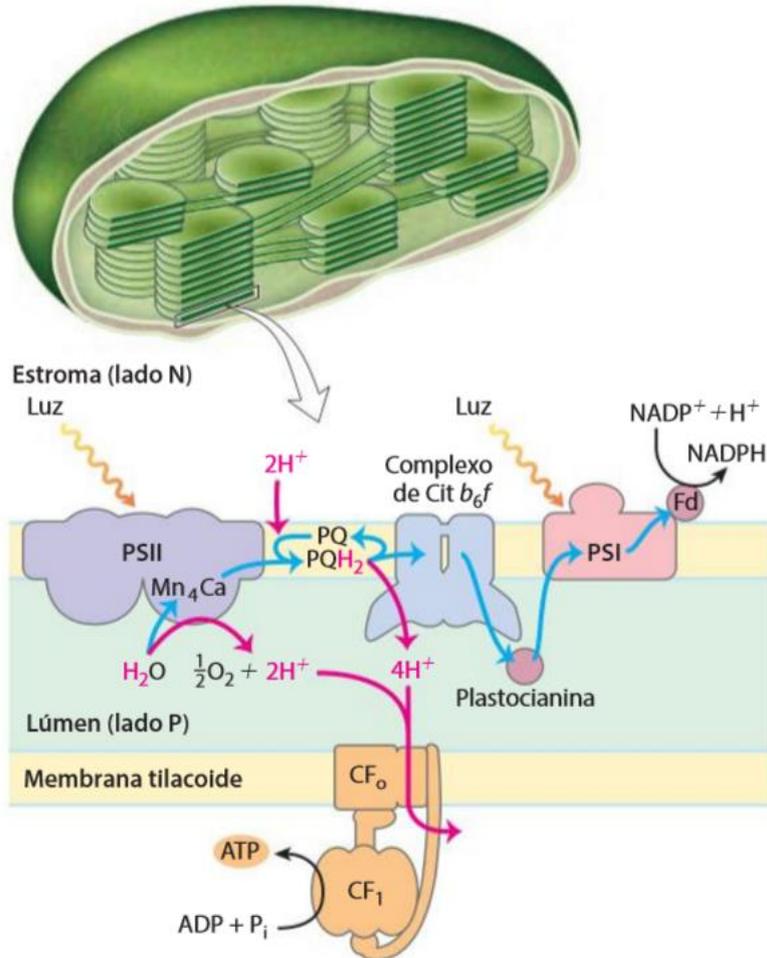


Figura 2. Esquema da fotólise da água e resumo da fotossíntese. (Nelson e Cox, 2014. Princípios de Bioquímica de Lehninger, 6 ed, pg 787).

Os poluentes podem gerar alterações no sistema fotossintético. Estudos sobre a fluorescência da clorofila no fitoplâncton contribuem para o diagnóstico e monitoramento dos efeitos biológicos e as quantidades de compostos tóxicos encontrados no ambiente (Lombardi e Maldonado, 2011). Metais são capazes de inibir a fotossíntese através da interrupção do transporte de elétrons na cadeia transportadora, da substituição do átomo de Mg das moléculas de clorofila, da interferência na reação de foto-oxidação da água, atingindo o CEO, danificando os fotossistemas e também o complexo antena (Sabatini et al., 2009; Herlory et al., 2013).

O desenvolvimento de novas tecnologias na medição de fluorescência permitiu que diferentes avaliações fossem realizadas. A fluorimetria de pulso de amplitude modulada (PAM) tem sido uma ferramenta eficiente na análise da toxicidade de metais na atividade fotossintética das microalgas, podendo-se obter resultados de maneira simples, rápida e acurada (Herlory et al., 2013). Além disso, os parâmetros avaliados pelo aparelho são

capazes de medir a capacidade das microalgas adaptadas à luz e ao escuro de converter energia luminosa em energia química e também os processos de conversão de energia. Com isso, tais parâmetros relacionados com a fluorescência da clorofila podem ser utilizados para detectar a presença de poluentes e também seus danos ao processo fotossintético (Juneau et al., 2002).

A energia absorvida pelos fotossistemas pode ter diferentes destinos, podendo ser utilizada no processo fotoquímico, dissipada por meios não fotoquímicos, ou ser emitida por fluorescência. A dissipação fotoquímica (qP) representa a porção de energia absorvida pelos centros de reação do PSII que serão posteriormente utilizadas para o transporte de elétrons. A dissipação não-fotoquímica (qN) representa a quantidade de energia luminosa dissipada por emissão de fluorescência que envolve processos não-radiativos. Outra medida de dissipação não-fotoquímica (NPQ) indica a dissipação de energia na forma de calor (Juneau et al., 2001; Da Costa et al., 2016). Tais parâmetros estão relacionados a diferentes etapas do processo fotossintético no transporte de elétrons, logo, seus índices variam de acordo com o local e mecanismo de ação dos poluentes aos quais os organismos são expostos (Juneau et al., 2001).

Echeveste et al. (2017) expôs uma clorófitica, *Chlorolobion braunii*, a diferentes concentrações de Cd. Os resultados obtidos revelaram que este metal causou danos ao aparato fotossintético da microalga, através da observação de valores alterados sobre os *quenchings* (qP, qN e NPQ) e também sobre o rendimento máximo do PSII. O Cd²⁺ é um cátion conhecido por substituir o Mg na molécula da clorofila e conseqüentemente causar queda no rendimento máximo do PSII (Baumann et al., 2009). Os resultados obtidos por El-Sheek (2003) indicam que a exposição de duas espécies de microalgas ao Co causou danos ao CEO, afetando o transporte de elétrons.

Diante disso, é importante que os estudos ecotoxicológicos sejam cada vez mais aprofundados, para um melhor entendimento dos mecanismos de ação de poluentes como os metais e das conseqüências para a biota aquática, uma vez que a presença desses contaminantes nos ecossistemas cresce a cada dia. Logo, faz-se necessário conhecer seus efeitos no ambiente e nos organismos. No presente estudo, foram avaliados não somente os efeitos de Cd e do Co sobre a densidade celular algal, mas também o impacto de diferentes concentrações desses metais sobre o aparato fotossintético e sobre a composição bioquímica da microalga. O uso de múltiplos *endpoints* permitiu que fossem investigados os efeitos tóxicos do Cd e do Co tanto em nível populacional quanto em intracelular, além de indicar as diferenças entre os mecanismos de ação de cada um destes metais. Assim, ressaltamos a importância desse tipo de abordagem em estudos ecotoxicológicos com microalgas.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

O presente estudo visou investigar a toxicidade de um metal essencial, o cobalto (Co), e outro não essencial, o cádmio (Cd), de forma isolada, sobre uma clorófitica de água doce.

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar os efeitos tóxicos do cobalto sobre a clorófitica *R. subcapitata*, em relação ao crescimento, composição bioquímica e atividade fotossintética.
- Avaliar os efeitos tóxicos do cádmio sobre a clorófitica *R. subcapitata*, em relação ao crescimento, composição bioquímica e atividade fotossintética.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Metais

Os metais Cd (CdCl_2 , Titrisol – Merck, 1000 mg) e Co (CoCl_2 , Titrisol – Merck, 1000 mg) foram obtidos comercialmente e diluídos, isoladamente, em 1 L de água ultrapura (concentração final 1g L^{-1}).

Foi utilizado o programa MINEQL + (versão 4.6) a fim de se estimar a porcentagem de íons livres de Cd e de Co nas soluções teste. O modelo considera o peso total dos metais e as concentrações de ligantes existentes no meio de cultivo. Além disso, considera a afinidade entre os diferentes ligantes, os metais (Cd e Co) e os produtos de solubilidade (Machado et al., 2015).

4.2. Cultivo da microalga

A espécie de clorófitcea *R. subcapitata* (Figura 3) foi obtida a partir de inóculo de culturas mantidas no Departamento de Ecologia e Biologia Evolutiva (DEBE) da Universidade Federal de São Carlos – UFSCar, São Carlos - SP, Brasil. A microalga foi cultivada em meio de cultura L.C. Oligo (AFNOR, 1980) (Tabela 1) em erlenmeyer (2000 mL) contendo 1000 mL de meio (Figura 3), previamente autoclavado por 20 minutos a 121 °C. Após o resfriamento do meio de cultivo, este permaneceu 15 minutos sob luz UV e o pH foi ajustado para $7 \pm 0,5$. A microalga foi inoculada com concentração de 1×10^5 células mL^{-1} e mantida em condições laboratoriais com fotoperíodo de 12/12h claro/escuro, intensidade luminosa de 4000 lux, temperatura de $25 \pm 0,5$ °C e agitação manual periódica (aproximadamente 6 vezes por dia).

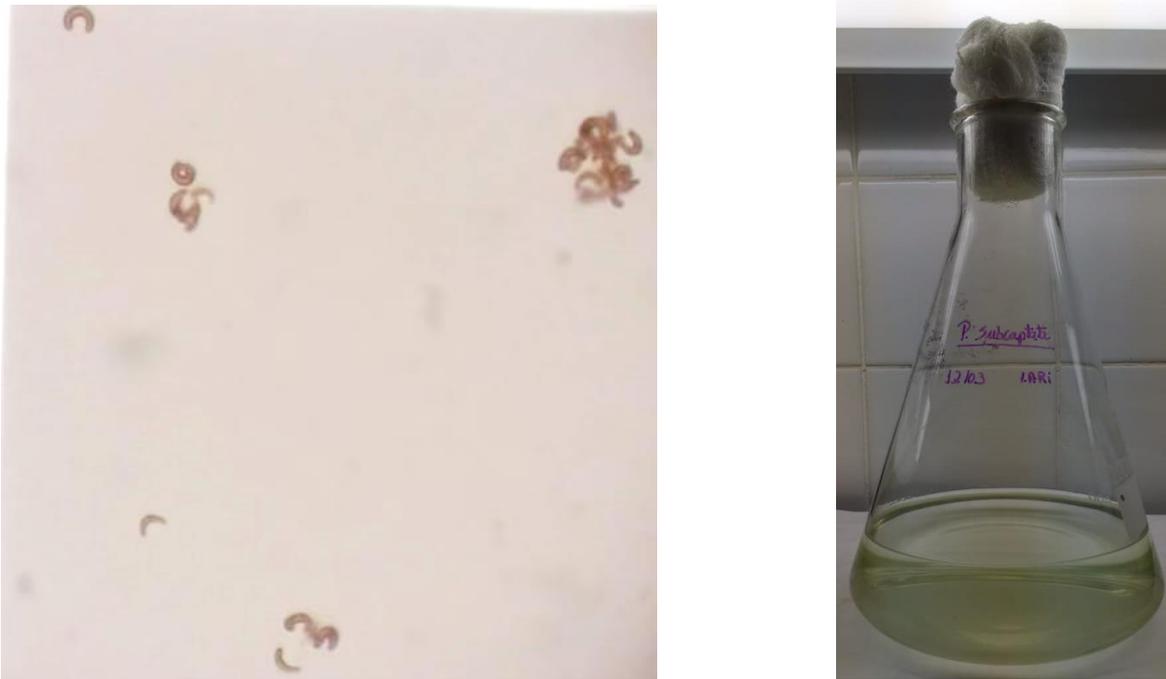


Figura 3. Espécie utilizada nos cultivos e testes ecotoxicológicos, *Raphidocelis subcapitata*. A esquerda em microscópio óptico (aumento 40x) e a direita cultivo em erlenmeyer com meio L.C. Oligo.

Tabela 1. Composição meio L.C. Oligo (AFNOR, 1980).

Solução	Reagente	Quantidade
1	Ca(NO ₃) ₂ .4H ₂ O	1,7 x 10 ⁻⁴ M
2	KNO ₃	1,0 x 10 ⁻³ M
3	MgSO ₄ .7H ₂ O	1,2 x 10 ⁻⁴ M
4	K ₂ HPO ₄	2,3 x 10 ⁻⁴ M
	CuCl ₂ .2H ₂ O	6,0 x 10 ⁻⁸ M
	(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ .4H ₂ O	2,4 x 10 ⁻⁸ M
	ZnSO ₄ .7H ₂ O	1,0 x 10 ⁻⁷ M
5	CoCl ₂ .6H ₂ O	1,3 x 10 ⁻⁷ M
	Mn(NO ₃) ₂ .4H ₂ O	1,5 x 10 ⁻⁷ M
	C ₆ H ₈ O ₇ .H ₂ O	1,4 x 10 ⁻⁷ M
	H ₃ BO ₃	4,9 x 10 ⁻⁷ M
	C ₆ H ₅ FeO ₇ .5H ₂ O	3,1 x 10 ⁻⁶ M
6	FeCl ₃ .6H ₂ O	1,9 x 10 ⁻⁶ M
	FeSO ₄ .7H ₂ O	1,1 x 10 ⁻⁶ M
7	NaHCO ₃	1,8 x 10 ⁻⁴ M

4.3. Testes ecotoxicológicos

Os testes ecotoxicológicos (Figura 4) com a microalga *R. subcapitata* foram realizados utilizando-se os metais Cd e Co, isoladamente, em erlenmeyers de 500mL de capacidade, contendo 300mL de meio de cultura. As concentrações nominais utilizadas foram 0,13 (grupo controle – quantidade de Co já presente no meio Oligo); 0,98; 1,83; 2,67; 3,53; 4,37 µM de Co; e 0 (grupo controle); 0,22; 0,44; 0,67; 0,89; 1,11 µM de Cd; em trélicas. As concentrações foram definidas a partir de testes preliminares. A duração do teste foi de 96 horas e a concentração inicial das microalgas foi de 1 x 10⁵ células mL⁻¹ em fase exponencial de crescimento. Os experimentos foram mantidos sob as mesmas condições do cultivo, em relação ao fotoperíodo, temperatura, luminosidade e agitação. As concentrações do teste definitivo foram estabelecidas a partir de testes preliminares realizados anteriormente.



Figura 4. Testes ecotoxicológicos com a microalga *Raphidocelis subcapitata*.

4.4. Densidade Celular

Amostras de 1 mL foram retiradas diariamente de cada réplica, para cada concentração de metal e para o controle, e fixadas com uma gota de lugol. A contagem das células foi realizada em câmara de Neubauer, sob microscópio óptico (Carl Zeiss - Germany).

4.5. Análise bioquímica

4.5.1. Carboidratos totais

A análise de carboidratos totais foi realizada a partir de protocolo descrito em Liu et al (1973). Após 96 horas de exposição aos metais, foram coletados 10 mL das amostras (de cada réplica) em tubo Falcon (capacidade 15 mL). Estas foram centrifugadas a 1500 rpm (Eppendorf 5702R, Alemanha) por 10 minutos. Em seguida, o sobrenadante foi descartado, o pellet ressuscitado em 0,5 mL de água destilada e 1 mL de solução de fenol 10% foi adicionado à amostra. O conteúdo foi agitado e, em seguida, adicionou -se 5 mL de H₂SO₄ concentrado. O branco foi composto por 1 mL de água destilada, e seguiu o mesmo protocolo descrito anteriormente. As amostras permaneceram em repouso por 10 minutos em recipiente com gelo e, em seguida, foram centrifugadas a 4400 rpm, 0°C, por 10 minutos. O sobrenadante foi transferido para cubetas de vidro para a leitura das absorvâncias a 485 nm em espectrofotômetro (HACH DR 5000; HACH Company, USA).

4.5.2. Lipídeos e classes lipídicas

Para determinação de lipídeos totais e classes lipídicas foi utilizada a metodologia descrita em Folch (1957) e modificada por Parrish (1999). O material utilizado, vidraria e filtros de fibra de vidro, foram calcinados a 400°C por 8 horas. As vidrarias também foram lavadas com metanol e clorofórmio, três vezes com cada reagente. Foram filtrados a vácuo 200 mL das amostras (controle, concentrações) em filtros de fibra de vidro. O branco seguiu o mesmo protocolo, todavia com 200 mL de água destilada. A extração de lipídeos se deu em tubos de centrífuga de teflon com 4 mL de clorofórmio, 2 mL de metanol e 1 mL de água lavada com clorofórmio; macerando-se o material com bastão de aço. As amostras foram sonicadas por 5 min em sonicador de ponta (DES 500, Brasil), com potência 99% e, em seguida, centrifugadas à 4400 rpm, 0°C, por 5 minutos. O sobrenadante foi retirado com pipetas de Pasteur, armazenado em flaconetes de vidro, e as amostras foram mantidas em freezer (-20°C) até o momento das análises. O procedimento de extração foi repetido três vezes para cada amostra, sendo que, durante o processo, as amostras foram mantidas em gelo, para evitar a oxidação.

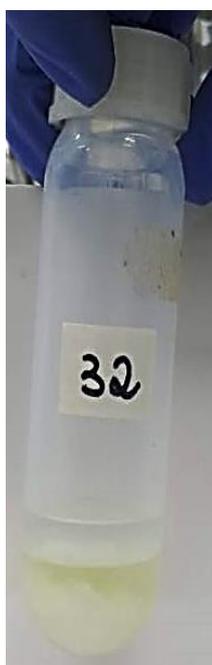


Figura 5. Processo de extração lipídica.

Para quantificação das classes lipídicas as amostras foram concentradas com auxílio de rotaevaporador até um volume de 0,5 mL. A quantificação foi feita por meio de cromatografia de camada delgada com detecção por ionização em chama (TLC / FID),

utilizando o equipamento Iatroscan MK6 (Mitsubishi Kagaku Iatron Inc., Tóquio, Japão). Foram utilizadas diferentes soluções de solventes para facilitar a separação cromatográfica das classes lipídicas. A identificação e a quantificação das classes no aparelho é feita com a utilização de alguns padrões de lipídeos: hidrocarbonetos alifáticos (HC), éster de cera (SE/WE), cetona (KET), triacilglicerol (TAG), ácidos graxos livres (FFA), álcool alifático (ALC), esterol (ST), lipídeos polares móveis em acetona (AMPL) e fosfolipídeos (PL). As condições da execução da análise do TLC-FID foram fluxo de hidrogênio 173 mL min⁻¹, fluxo de ar de 2 L min⁻¹ e velocidade de digitalização 4mm s⁻¹.

4.6. Análise dos parâmetros fotossintéticos da microalga

4.6.1. Clorofila a

A concentração de Clo *a* foi determinada diariamente a partir da medição da fluorescência *in vivo* em fluorímetro digital (Turner Designs, Trilogy, USA). O cálculo para a determinação da concentração de Clo foi realizado a partir de uma curva de calibração (RFU – unidades relativas de fluorescência – versus concentração de Clo *a*). Os valores obtidos foram divididos pela densidade correspondente e a quantidade de clorofila *a* foi expressa em picograma por célula (pg cél⁻¹).

4.6.2. Atividade Fotossintética

Foram retiradas amostras (3 mL) de cada réplica dos cultivos com diferentes concentrações dos metais e do controle para avaliação dos parâmetros de eficiência fotossintética, a cada 24 horas. A análise foi realizada em fluorômetro de pulso de amplitude modulada (Phyto PAM, Walz - Alemanha). As amostras permaneceram no escuro por 15 minutos, a fim de que todos os centros de reação do PSII (fotossistema II) estivessem oxidados. Com a emissão de luz de baixa intensidade e de luz saturante, foi possível mensurar a fluorescência inicial (F_0) e a fluorescência máxima (F_m), respectivamente. Com a determinação de tais valores, foi possível calcular a fluorescência variável e o rendimento máximo (Φ_M), de acordo com as equações 1 e 2 (Schreiber et al., 1986; Schreiber e Bilger, 1993):

$$F_v = F_m - F_0 \quad (1)$$

$$\Phi_M = F_v/F_m \quad (2)$$

Outro parâmetro calculado com as células adaptadas ao escuro foi a eficiência do CEO, obtida pela razão F_0/F_v (Kriedemann et al., 1985). Os valores dos parâmetros F_0 , F_m e Φ_M são fornecidos pelo aparelho Phyto-PAM.

Após 72 horas de exposição aos metais, a avaliação dos parâmetros fotossintéticos ocorreu sob adaptação à luz. Durante um período de 10 minutos, as amostras estiveram sob luz actínica e um pulso de luz era dado a cada 20 segundos. Foram obtidos os valores da fluorescência inicial (F_s) e da fluorescência máxima (F'_m) na presença de luz sendo que o aparelho fornece os valores de F'_m e o rendimento máximo efetivo (Φ'_M). Com esses dados, foi possível calcular a fluorescência variável (F'_v) das algas adaptadas à luz, a fluorescência mínima (F'_0) e o Φ'_M do PSII, a partir das equações 3, 4 (Oxborough; Baker, 1997) e 5 (Baker, 2008; Cosgrove e Borowitzka 2010; Genty et al. 1989):

$$F'_v = F'_m - F_s \quad (3)$$

$$F'_0 = F_0 / ((F_v/F_m) + (F_0/F'_m)) \quad (4)$$

$$\Phi'_M = (F'_m - F_s) / F'_m \quad (5)$$

O coeficiente de dissipação fotoquímica (qP) e os coeficientes de dissipação não-fotoquímica (qN e NPQ), os *quenchings*, foram calculados após análises dos parâmetros fotossintéticos adaptados ao escuro e à luz, com as equações 6 (Bilger e Schreiber, 1986; Juneau e Popovic 1999), 7 (Bilger e Schreiber, 1986; Juneau e Popovic 1999) e 8 (Bilger e Björkman, 1990):

$$qP = 1 - (F'_m - F'_0) / (F_m - F_0) \quad (6)$$

$$qN = [1 - (F'_m - F'_0)] / (F_m - F_0) \quad (7)$$

$$NPQ = (F_m - F'_m) / F'_m \quad (8)$$

4.7. Análise de dados

As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o software SigmaPlot 12.0. Uma análise de variância (ANOVA) foi feita com os dados obtidos, seguida de testes de Tukey e/ou Dunnet para dados paramétricos. Dados com variância desigual ou distribuição não normal foram submetidos a testes não paramétricos de Dunn's e/ou Tukey-Kramer. Os gráficos foram elaborados no software OriginPro, versão 8.0. Os cálculos de IC_{10} , IC_{25} e IC_{50} (concentração de inibição do crescimento médio) foram realizados no software ICPIN 2.0 (Norberg-King, 1993), utilizando a densidades de células diária. As diferenças

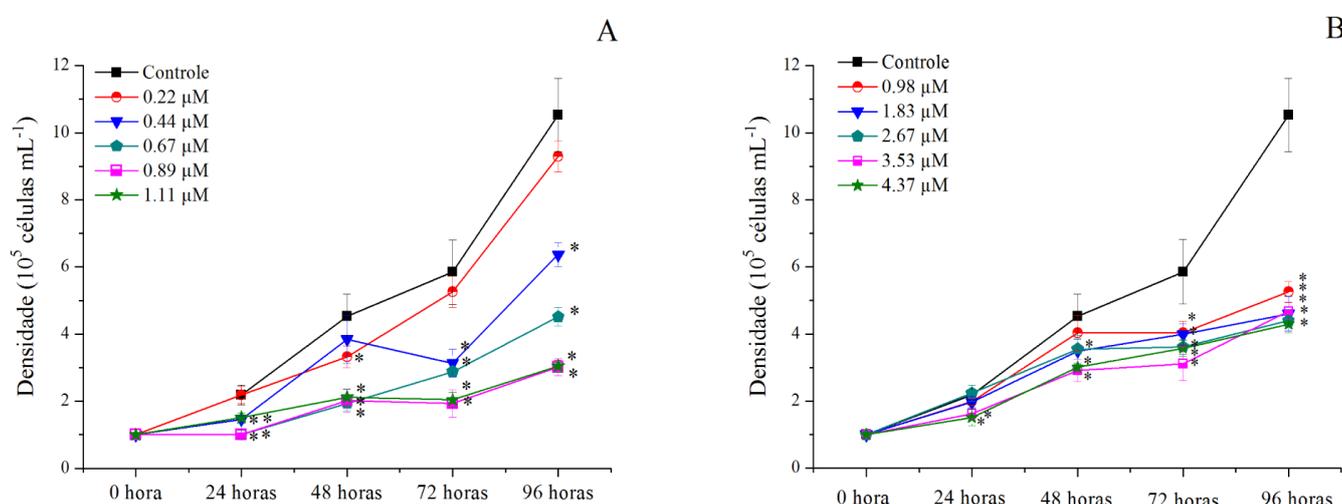
estatisticamente significativas foram consideradas quando $p < 0,05$.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Densidade

A Fig. 6 ilustra os valores de densidade de células da microalga *R. subcapitata* ao longo das 96 horas de exposição aos metais Cd (A) e Co (B). Sobre os resultados obtidos para os tratamentos com diferentes concentrações de Cd, em 24 horas de exposição apresentou efeitos negativos sobre a densidade de células da clorofícea, com diferenças estatisticamente significativas em relação ao controle a partir de $0,44 \mu\text{M}$ de Cd. Os efeitos negativos do metal sobre a densidade celular persistiram ao longo das 96 horas de exposição.

Os resultados obtidos sobre os tratamentos com Co apresentaram diferenças estatisticamente significativas já em 24 horas de exposição, nas concentrações mais altas do metal ($3,53 \mu\text{M}$ e $4,37 \mu\text{M}$ de Co). Os resultados do Co acentuam-se ao longo do tempo de



exposição e, em 72 e 96 horas, a densidade celular foi afetada negativamente em todas as concentrações testadas.

Figura 6. Densidade de células da microalga *Raphidocelis subcapitata* exposta aos metais

Cd (A) e Co (B) ao longo de 96 horas de experimento. As diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) foram calculadas pelo teste de Dunnett e estão evidenciadas com *.

O presente estudo indica que o metal Cd diminuiu significativamente a densidade das células da clorócea *R. subcapitata* ao longo de 96 horas de exposição. Outros estudos em que também se avaliaram os efeitos do Cd sobre microalgas de água doce, apontam a capacidade desse metal afetar a densidade celular algal: em Koukal et al. (2003) a densidade de células de *R. subcapitata* é afetada em concentrações de Cd superiores a 1,78 μM , ou seja, concentrações maiores do que as utilizadas no nosso estudo.

O excesso ou a deficiência de nutrientes podem afetar o crescimento de microalgas (Bossuyt e Janssen, 2004). O Co, ainda que seja um metal essencial ao crescimento do fitoplâncton, levou a efeitos negativos no crescimento da alga, em todas as concentrações testadas neste trabalho. Outros estudos reportaram efeito inibitório do metal sobre microalgas: em *Chlamydomonas reinhardtii*, a redução da densidade de células se dá em concentrações acima de 169 μM (Lustigman et al., 1995); em *Monoraphidium minutum* e *Nitzschia perminuta* a inibição do crescimento se dá em concentrações acima de 16,94 μM (El-Sheekh et al., 2003). No nosso estudo a inibição do crescimento de *R. subcapitata* foi detectada em concentrações de Co muito menores, já a partir de 24 horas de exposição, o que sugere maior sensibilidade dessa clorócea em comparação às algas utilizadas nos trabalhos supracitados.

Os valores de IC_{10} , IC_{25} e IC_{50} foram calculados para ambos os metais diariamente (Tabela 2). Os resultados obtidos para IC_{10} , IC_{25} e IC_{50} do metal Cd em 96 horas indicam que 0,2 μM ; 0,3 μM e 0,58 μM de Cd foram suficientes para inibir 10, 25 e 50% do crescimento de *R. subcapitata* respectivamente. Em relação aos resultados obtidos para o Co, temos que 0,17 μM ; 0,42 μM e 0,85 μM do metal foram suficientes para inibir 10, 25 e 50% do crescimento da microalga.

Uma vez que o Co é um metal essencial para o crescimento algal, baixas concentrações podem ajudar no desenvolvimento da microalga, como reportado por outros estudos (Horvatic et al., 2007). Apesar disso, os valores de IC_{10} calculados para o Co diminuíram ao longo das 96 horas de exposição. Os valores calculados de IC_{25} em 24 e 48 horas indicam que foram necessários apenas 3,34 e 2,73 μM de Co para inibir 25% do crescimento; já em 72 e 96 horas, esses valores foram menores (0,32 μM de Co).

Os valores de IC que obtivemos para *R. subcapitata* indicam uma maior sensibilidade

dessa alga ao Cd do que ao Co. O cálculo das ICs é importante para determinar a quantidade do composto que é tóxica para os organismos sendo que a IC₁₀ calculada para alguns organismos pode ser utilizada como diretriz para determinar a qualidade de água (Golding et al., 2015). Além disso, os valores de IC₁₀ juntamente com outros índices são utilizados em cálculos para realização de uma análise de risco. A determinação das ICs também nos auxiliou a identificar a sensibilidade de *R. subcapitata* aos metais testados e as concentrações que potencialmente causam danos ao crescimento populacional dessa espécie. Segundo a resolução do CONAMA nº357, os níveis de Co permitidos na água para garantir sua qualidade são de 0,85 a 3,39 µM (0,05 a 0,2 mg/L). Essas concentrações estão dentro da faixa de concentrações testadas neste estudo e nossos resultados indicam que esse valor máximo ultrapassa a IC_{50-96h}. Isso significa que toda a população de espécie *R. subcapitata* seria majoritariamente afetada em um ambiente aquático contaminado com Co, uma vez que a concentração máxima permitida pelo CONAMA seria altamente tóxica à espécie de microalga estudada neste trabalho.

Tabela 2. Valores das IC₁₀, IC₂₅ e IC₅₀ em µM e intervalo de confiança obtidos para *Raphidocelis subcapitata* exposta ao Cd e Co, ao longo de 96 horas de exposição. O NC significa que não foi possível calcular pelo software ICPIN 2.0.

		Concentrações (µM)	
		Cd	Co
24 horas	IC ₁₀	0.2859 (0.1414 - 0.3010)	2.572 (0.6711 - 2.9016)
	IC ₂₅	0.3847 (0.3150 - 0.4212)	3.3373 (2.9881 - 3.6865)
	IC ₅₀	NC	NC
48 horas	IC ₁₀	0.134 (0.0714 - 0.3720)	0.7747 (0.3402 - 1.4998)
	IC ₂₅	0.3717 (0.1787 - 0.5134)	2.7314 (0.8537 - 3.3738)
	IC ₅₀	0.6235 (0.5373 - 0.7097)	NC
72 horas	IC ₁₀	0.2338 (0.0989 - 0.2760)	0.2737 (0.1995 - 0.4456)
	IC ₂₅	0.3221 (0.238 - 0.3708)	0.6843 (0.5376 - 2.0379)
	IC ₅₀	0.6811 (0.4167 - 0.9325)	NC
96 horas	IC ₁₀	0.1887 (0.1178 - 0.2676)	0.1699 (0.1568 - 0.1908)
	IC ₂₅	0.3254 (0.2685 - 0.3979)	0.4249 (0.3876 - 0.4912)
	IC ₅₀	0.5774 (0.5150 - 0.6541)	0.8497 (0.7810 - 1.8332)

De acordo com os resultados de determinação de íons livres pelo programa MINEQL+

(versão 4.6), podemos inferir que parte da causa da maior toxicidade do Cd, em comparação com os efeitos do Co, sobre o crescimento da microalga está relacionada à maior porcentagem de íons livres desse metal (98,3%) em relação à porcentagem que foi estimada para o Co (cerca de 78-81%) (Tabelas 3 e 4). Quanto maior a % de íons livres, como no caso do Cd no nosso estudo, maiores as chances desses íons adentrarem a parede celular das microalgas, causando danos internos.

Tabela 3. Concentração de íons livres de Cd calculadas pelo software MINEQL+ (versão 4.6).

Cd total (μM)	Cd ²⁺		Citrato	
	μM	%	μM	%
0,22	2,16E-07	98,3	2,70E-09	1,2
0,44	4,33E-07	98,3	5,39E-09	1,2
0,67	6,59E-07	98,3	8,21E-09	1,2
0,89	8,75E-07	98,3	1,09E-08	1,2
1,11	1,09E-06	98,3	1,36E-08	1,2

Tabela 4. Concentração de íons livres de Co calculadas pelo software MINEQL+ (versão 4.6).

Co total (μM)	Co ²⁺		CoHPO ₄ (aq.)		Citrato	
	μM	%	μM	%	μM	%
0,13	1,02E-07	78,3	6,91E-09	5,3	2,05E-08	15,8
0,98	7,73E-07	78,9	5,24E-08	5,4	1,49E-07	15,2
1,83	1,56E-06	79,4	1,06E-07	5,4	2,87E-07	14,6
2,67	2,24E-06	79,9	1,52E-07	5,4	3,96E-07	14,1
3,53	2,94E-06	80,3	1,99E-07	5,4	5,01E-07	13,7
4,37	3,63E-06	80,7	2,46E-07	5,5	5,97E-07	13,3

5.2. Parâmetros bioquímicos

5.2.1. Carboidratos totais

Mudanças nas condições ambientais podem alterar a síntese de carboidratos nas microalgas, sendo que a produção dessa biomolécula pode aumentar (Chia et al., 2015) ou diminuir de acordo com os efeitos tóxicos dos metais (Lim et al., 2006). A exposição ao Cd

levou à maior produção de carboidratos nas concentrações de 0,89 μM do metal (Fig. 7A), sendo que o teor desse parâmetro foi aproximadamente 9 vezes maior do que o das algas do grupo controle. Já a produção dessa macromolécula na alga tratada com Co não apresentou diferenças estatisticamente significativas (Fig. 7B).

Estudos anteriores registraram aumento na síntese dessa macromolécula para a clorofícea *Chlorella vulgaris*, exposta a diferentes concentrações de Cd (Chia et al., 2015). Nossos resultados sugerem que a microalga aumentou a produção de carboidratos a fim de se proteger em resposta ao estresse gerado pelo metal Cd, posto que tais moléculas possuem função no armazenamento de energia (Martínez-Ruiz e Martínez-Jerónimo, 2015).

5.2.2. Lipídeos totais e classes lipídicas

O teor de lipídeos totais foi aproximadamente 55 e 45% maior nas concentrações mais altas de Cd (0,89 e 1,11 μM , respectivamente) quando comparados ao controle (Fig. 7C). Em todas as concentrações de Co ocorreu um aumento de mais de 65% do teor de lipídeos, que chegou a ser 89% maior na alga exposta a 1.83 μM (Fig. 7D).

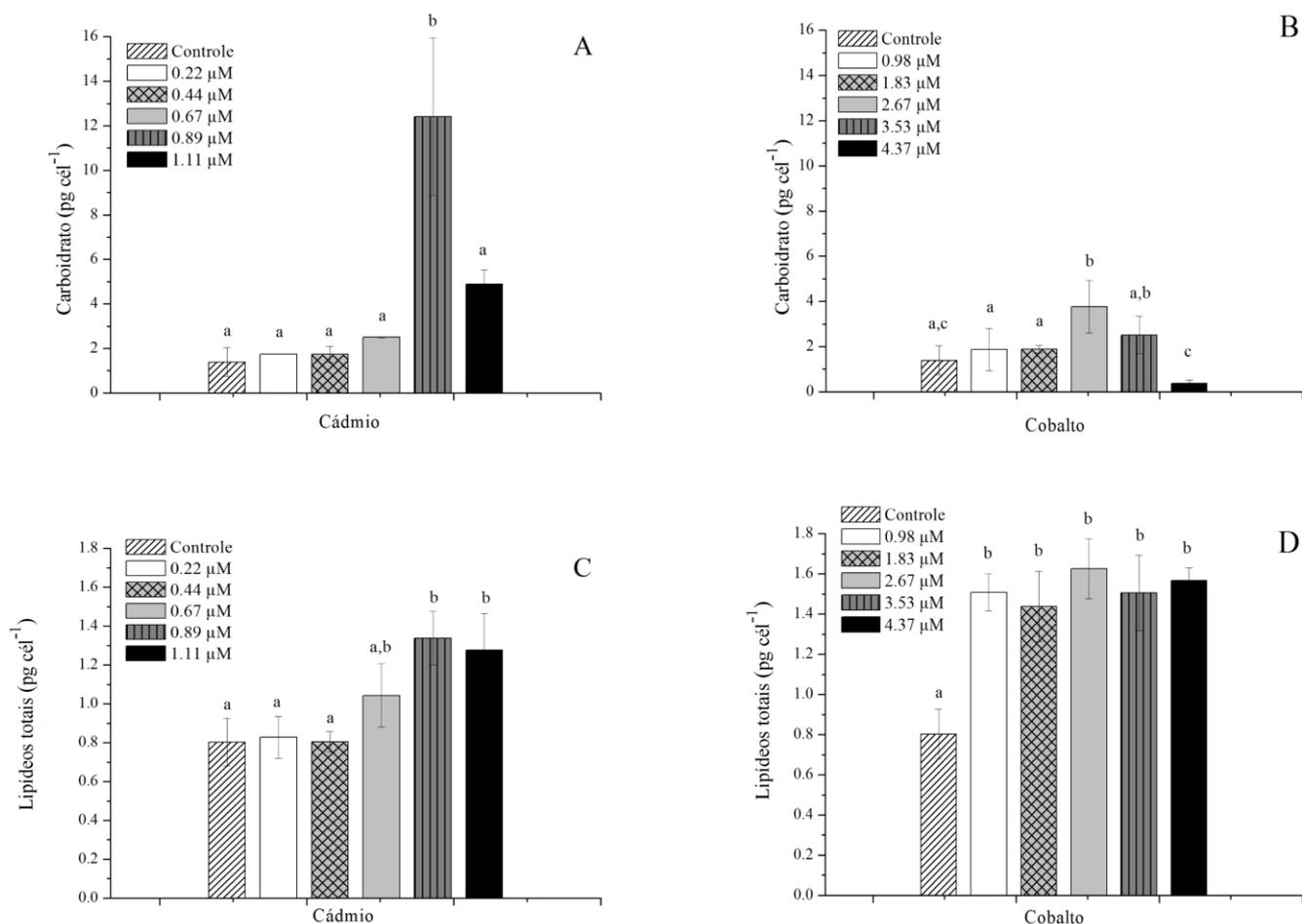
Os lipídeos são moléculas importantes que compõem a membrana plasmática das células. Em condições ambientais não favoráveis, como o estresse causado por metais, a alga altera a síntese dessa biomolécula (Chia et al., 2013). O aumento da síntese de lipídeos pode ser entendido como um mecanismo de proteção, pois pode auxiliar a estabilidade das reações de oxirredução, agindo como um dissipador de elétrons (Hu et al., 2008; Mock e Kroon, 2002). O teor de lipídios totais foi o *endpoint* que melhor demonstrou o efeito do Co, pois a produção de lipídeos detectada foi aproximadamente o dobro do valor encontrado no controle, em todas as concentrações testadas.

A composição das classes lipídicas também pode variar de acordo com as condições ambientais ou de cultivo, como pH, temperatura, nutrientes, fotoperíodo, intensidade luminosa e fases de crescimento – exponencial e estacionária (Dunstan et al., 1993). Nas microalgas expostas ao Cd e Co, algumas classes lipídicas tiveram sua síntese aumentada ou diminuída, em resposta ao aumento da concentração dos metais (Tabela 5) e foram observadas diferenças na composição das classes afetadas por cada metal.

Em comparação ao que foi encontrado na alga do grupo controle, as classes que mais tiveram sua produção aumentada devido ao Cd foram WE (cerca de 8 vezes), FFA

(aproximadamente 4 vezes) e ST (3 vezes) em 0,89 μM . Na concentração mais alta (1,11 μM) os maiores aumentos em comparação ao controle, foram WE (cerca de 8 vezes), e ST (cerca de 3 vezes). Nas concentrações mais altas do metal, não houve diminuição significativa no teor de TAG, por outro lado em 0,22 μM de Cd, o teor de TAG diminuiu 84%.

A exposição à concentração mais alta de Co (4,37 μM) levou a um maior aumento nas



classes ST (aproximadamente 4 vezes), WE (3 vezes) e PL (3 vezes), em relação ao que foi encontrado no controle. Nessa concentração, AMPL apresentou uma diminuição de 43% em relação ao controle. Em contrapartida, a maior diminuição foi encontrada para TAG cerca de 80% em 3,53 μM de Co, quando comparado ao resultado do controle.

Figura 7. Teor de carboidratos totais (AB) e lipídeos totais (CD) na microalga *Raphidocelis subcapitata* após 96 horas de exposição aos metais Cd (AC) e Co (BD). As diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) foram calculadas pelos testes de Tukey e Dunett para dados paramétricos (lipídeos totais) e Tukey Kramer e Dunn's para dados não-paramétricos (carboidratos totais) e estão evidenciadas com diferentes letras.

A proporção de TAG pode ser regulada pela disponibilidade de nutrientes no meio (Parrish, 1988), podendo ser indicador do estado fisiológico das células (Lombardi e Wangersky, 1991). A diminuição do teor de TAG em resposta ao estresse causado pelo Cd e Co pode estar relacionada com o aumento das demais classes, ou seja, a energia foi concentrada para produção de lipídeos estruturais, aumentando a proteção da membrana. Neste estudo, podemos afirmar que as microalgas expostas ao Cd investiram na produção de componentes estruturais, uma vez que os lipídeos de membrana quantificados, ST e PL, tiveram sua produção aumentada, respectivamente, em relação ao controle. O aumento de FFA pode estar relacionado com a degradação de TAG, pois os ácidos graxos são obtidos após hidrólise de classes que tem função de armazenar energia (TAG) ou componentes de membrana (Parrish, 1988). A classe que mais apresentou aumento com o Cd foi WE (aproximadamente 8 vezes maior em relação ao controle). Essa classe é utilizada como reserva de energia metabólica por organismos aquáticos (Parrish, 1988). A presença de ésteres de cera é considerada rara em algas (Lee et al., 1971, 1972), porém foi encontrada em um dinoflagelado marinho (Withers e Nevenzel, 1977).

A síntese de AMPL também decresceu nas células algais expostas às concentrações mais altas de Co, com 42,7% de redução em 4,37 μM de Co, em relação ao controle. Essa classe está relacionada à composição de alguns pigmentos da microalga, de forma que a redução da síntese dessa classe pode ser explicada pelas menores concentrações de Clo a que encontramos em resposta ao tratamento com o metal.

Estudos anteriores sugerem que o aumento de lipídios estruturais pode indicar mudança na conformação da membrana, alterando sua espessura, fluidez, com a finalidade de diminuir os danos causados pela incorporação do metal ao conteúdo celular (Alho et al., 2019; Rocha, et al., 2016), o que pode explicar o aumento de ST e PL encontrado na *R. subcapitata* no nosso estudo.

Tabela 5. Valor médio e desvio padrão de diferentes classes de lipídeos (pg cél⁻¹) produzidas por *Raphidocelis subcapitata*, após 96 horas de exposição ao Cd e Co. Na tabela, HC denota hidrocarbonetos alifáticos; SE/WE, éster de cera; TAG, triacilglicerol; FFA, ácidos graxos livres; ST, esterol; AMPL, lipídeos polares móveis em acetona e PL, fosfolipídios. As diferenças estatisticamente significativas (p<0,05) foram calculadas pelos testes de Tukey e Dunnett para dados paramétricos (WE, ST, AMPL e PL) e Tukey Kramer e Dunn's para dados não-paramétricos (HC, TAG e FFA) e estão evidenciadas com diferentes letras.

	Lipídios por classe (pg cél ⁻¹)						
	HC	WE	TAG	FFA	ST	AMPL	PL
Cádmio							
Controle	0.032 ± 0.002 ^a	0.012 ± 0.001 ^a	0.049 ± 0.001 ^a	0.003 ± 0.001 ^a	0.022 ± 0.000 ^a	0.363 ± 0.022 ^a	0.388 ± 0.009 ^a
0.22 µM	0.036 ± 0.001 ^a	0.011 ± 0.000 ^{a,b}	0.008 ± 0.001 ^b	0.002 ± 0.000 ^a	0.015 ± 0.001 ^a	0.383 ± 0.052 ^a	0.372 ± 0.061 ^a
0.44 µM	0.024 ± 0.004 ^a	0.031 ± 0.003 ^b	0.019 ± 0.002 ^b	0.004 ± 0.000 ^{a,b}	0.026 ± 0.005 ^a	0.357 ± 0.074 ^a	0.399 ± 0.071 ^a
0.67 µM	0.072 ± 0.016 ^a	0.062 ± 0.009 ^c	0.023 ± 0.013 ^{a,b}	0.011 ± 0.004 ^{a,b}	0.051 ± 0.010 ^b	0.355 ± 0.042 ^a	0.543 ± 0.096 ^{a,b}
0.89 µM	0.072 ± 0.005 ^a	0.101 ± 0.010 ^d	0.015 ± 0.000 ^{a,b}	0.014 ± 0.002 ^b	0.064 ± 0.001 ^c	0.408 ± 0.033 ^a	0.670 ± 0.088 ^b
1.11 µM	0.071 ± 0.005 ^a	0.096 ± 0.021 ^d	0.026 ± 0.003 ^{a,b}	0.011 ± 0.001 ^{a,b}	0.057 ± 0.006 ^{b,c}	0.331 ± 0.050 ^a	0.668 ± 0.103 ^b
Cobalto							
Controle	0.032 ± 0.002 ^a	0.012 ± 0.001 ^a	0.049 ± 0.001 ^a	0.003 ± 0.001 ^a	0.022 ± 0.000 ^a	0.363 ± 0.022 ^a	0.388 ± 0.009 ^a
0.98 µM	0.044 ± 0.001 ^{a,b}	0.034 ± 0.004 ^b	0.028 ± 0.002 ^{a,b}	0.014 ± 0.000 ^b	0.043 ± 0.009 ^b	0.512 ± 0.100 ^{a,b}	0.833 ± 0.063 ^b
1.83 µM	0.073 ± 0.009 ^b	0.033 ± 0.003 ^b	0.019 ± 0.005 ^{a,b}	0.011 ± 0.001 ^{a,b}	0.030 ± 0.008 ^{a,b}	0.619 ± 0.028 ^b	0.860 ± 0.175 ^b
2.67 µM	0.029 ± 0.001 ^a	0.033 ± 0.003 ^b	0.029 ± 0.012 ^{a,b}	0.013 ± 0.003 ^b	0.036 ± 0.003 ^b	0.548 ± 0.048 ^b	0.920 ± 0.134 ^b
3.53 µM	0.050 ± 0.002 ^{a,b}	0.053 ± 0.004 ^c	0.010 ± 0.000 ^b	0.008 ± 0.002 ^{a,b}	0.068 ± 0.009 ^c	0.396 ± 0.060 ^{a,b}	0.848 ± 0.107 ^b
4.37 µM	0.041 ± 0.004 ^{a,b}	0.036 ± 0.008 ^b	0.021 ± 0.003 ^{a,b}	0.008 ± 0.001 ^{a,b}	0.079 ± 0.006 ^c	0.208 ± 0.034 ^c	1.124 ± 0.075 ^b

5.3. Parâmetros fotossintéticos

5.3.1. Clorofila a

Em 72 horas de exposição ao Cd, o teor de Clo a diminuiu nas concentrações acima de 0,22 μM ; já em 96 horas de exposição, a diminuição foi estatisticamente significativa apenas em 0,89 μM de Cd (Fig 8A). A redução de Clo a na concentração mais alta de Cd (1,11 μM) foi de 53% em 72 horas e de 77% em 96 horas de exposição a 0,89 μM de Cd, em comparação ao que foi encontrado no grupo controle.

Os resultados obtidos em relação a exposição de Co entre 72 e 96 horas apresentaram diminuição significativa no teor de Clo a em todas as concentrações testadas, exceto em 0,98 μM de Co (Fig 8B). Nas microalga exposta ao Co foi observada uma redução desse pigmento entre 0,44 e 4,37 μM , entre 72 e 96 horas de tratamento. Na concentração mais alta de Co, a redução do teor Clo a foi de 25 e 35%, em 72 e 96 horas de exposição, respectivamente.

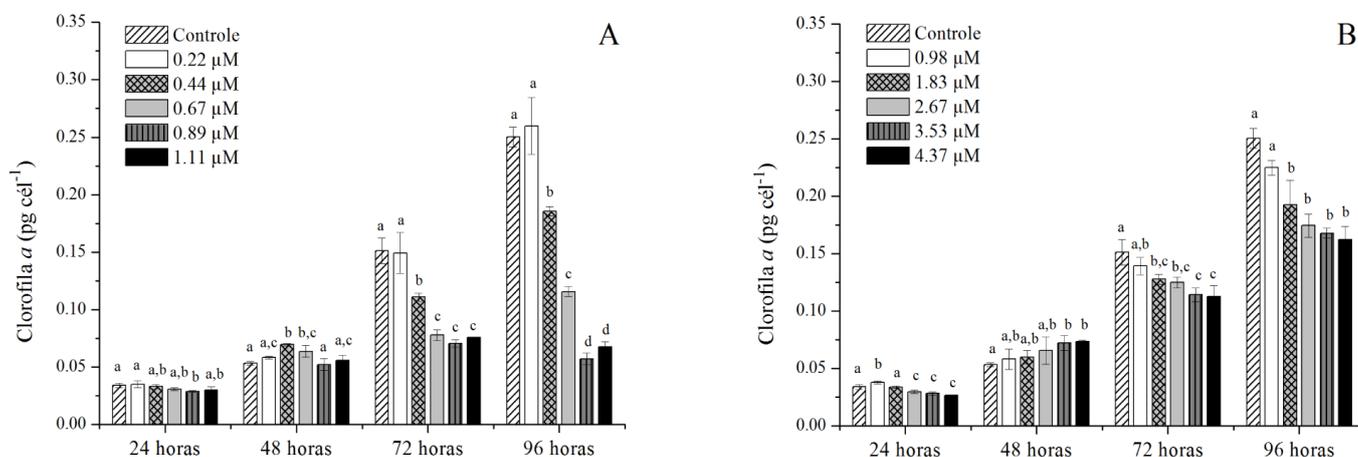


Figura 8. Teor de clorofila a na microalga *Raphidocelis subcapitata* ao longo de 96 horas de exposição aos metais Cd (A) e Co (B). As letras indicam diferença significativa em relação ao controle e aos tratamentos ($p < 0,05$). As análises estatísticas dos dados de 24 a 72 horas do Cd e as de 24 a 96 horas do Co foram calculadas pelos testes de Tukey e Dunnett. Os dados de 96 horas do Cd foram calculados pelos testes de Tukey Kramer e Dunn's.

A quantificação da Clo *a* auxilia no entendimento dos efeitos tóxicos sobre o aparato fotossintético (Brack e Franck, 1998), uma vez que o conteúdo celular desse pigmento é o principal regulador da atividade fotossintética em condições de temperatura e luz controladas (Talec et al., 2013). Esse *endpoint* foi o mais eficiente para demonstrar o efeito negativo do Cd ao longo do tempo de exposição, sendo que as reduções mais significativas da concentração dessa molécula foram encontradas em 72 horas de tratamento. O Co levou à redução da produção de Clo *a* já nas primeiras 24 horas nas concentrações mais altas, mas ao longo das 96 horas de tratamento o decréscimo da síntese desse pigmento foi menor que o encontrado para as algas tratadas com Cd, apesar das concentrações de Co terem sido mais altas.

5.3.2. Medidas do Phyto-Pam

Os parâmetros fotossintéticos são sensíveis à exposição de metais (Peña-Vásquez et al., 2010; Quartacci et al., 2010; Tripathi e Gaur, 2006). O Φ_M fornece informações sobre o estado fisiológico da microalga, pois indica quanto da luz absorvida foi realmente utilizada na fotossíntese, sendo portanto, um *endpoint* relacionado ao desempenho fotossintético (Herlory et al., 2013; Kumar et al., 2014). O Φ_M foi acompanhado diariamente, com efeitos negativos do Cd sendo observados já em 48 horas de exposição, a partir de 0,67 μM (Fig 9A). As reduções mais acentuadas ocorreram em 0,89 e 1,11 μM , após 72 horas de tratamento. Nas algas expostas ao Co houve uma redução significativa nos valores de Φ_M a partir de 1,83 μM em relação ao controle, com a maior alteração ocorrendo em 4,37 μM , após 48 horas de tratamento (Fig 9B).

Machado et al. (2015) avaliou os efeitos de Cd e outros metais sobre a clorófitica *R. subcapitata*, e reportou queda nos valores de Φ_M , em 1,9 μM de Cd. Wang et al. (2013) também demonstraram decaimento de Φ_M em *Chlorella pyrenoidosa*, exposta ao Cd em 100 μM . Nossos dados estão de acordo com esses resultados, uma vez que a exposição à 0,89 e 1,11 μM de Cd e 3,53, 4,37 μM de Co, levaram à queda do desempenho fotossintético de *R. subcapitata*. Possivelmente, os metais podem ter substituído o magnésio (átomo central da clorofila) e então causado diminuição da fotossíntese, uma vez que a molécula que se forma após essa substituição é mais instável. Segundo Baumann et al. (2009), íons metálicos como Hg^{2+} , Cd^{2+} , Zn^{2+} , Ni^{2+} e o Cu^{2+} , são conhecidos por tal ação de substituição, com consequente redução do Φ_M .

Em relação aos resultados obtidos para o parâmetro F_0/F_V sabemos que quanto

maiores os valores de F_0/F_V , menor a eficiência do CEO. Na alga exposta ao Cd as maiores alterações encontradas para o parâmetro F_0/F_V ocorreram em 0,89 e 1,11 μM , entre 48 e 72 horas de experimento (Fig 9C). Na exposição ao Co as maiores alterações foram encontradas na alga exposta a 3,53 e 4,37 μM , entre 48 e 72 horas de tratamento (Fig 9D). A tendência nas réplicas foi uma diminuição da eficiência do CEO para todas as concentrações de Co testadas. O CEO é responsável pela reação onde ocorre a quebra da molécula de água, pela luz, resultando na produção de oxigênio. O aumento nos valores de F_0/F_V indicam que esse sistema é o primeiro a ser atingido pelos metais. Alguns metais que comprovadamente interferem nesse complexo são: Cd, Cr, Cu, Ni e Zn (Mallick e Mohn 2003), e os resultados obtidos neste estudo sugerem que o CEO da *R. subcapitata* foi danificado.

Os metais podem interferir no fluxo de elétrons do sítio de separação da água, pelo processo de foto-oxidação da água (Herlory et al., 2013; Mallick e Mohn, 2003). A partir de 48 horas de exposição ao Cd, encontramos um aumento no valor de F_0/F_V , a partir de 0,67 μM . Enquanto para as microalgas expostas ao Co, o efeito ocorreu já em 24 horas de tratamento em 3,53 μM , indicando que o Co também pode ter danificado a reação de catálise da molécula de água. Herlory et al. (2013) e Juneau et al. (2002) sugerem que alguns metais podem alterar a eficiência do CEO, através da substituição do manganês (Mn) no sistema de separação da água, ocasionando danos nessa reação e conseqüentemente na produção do oxigênio.

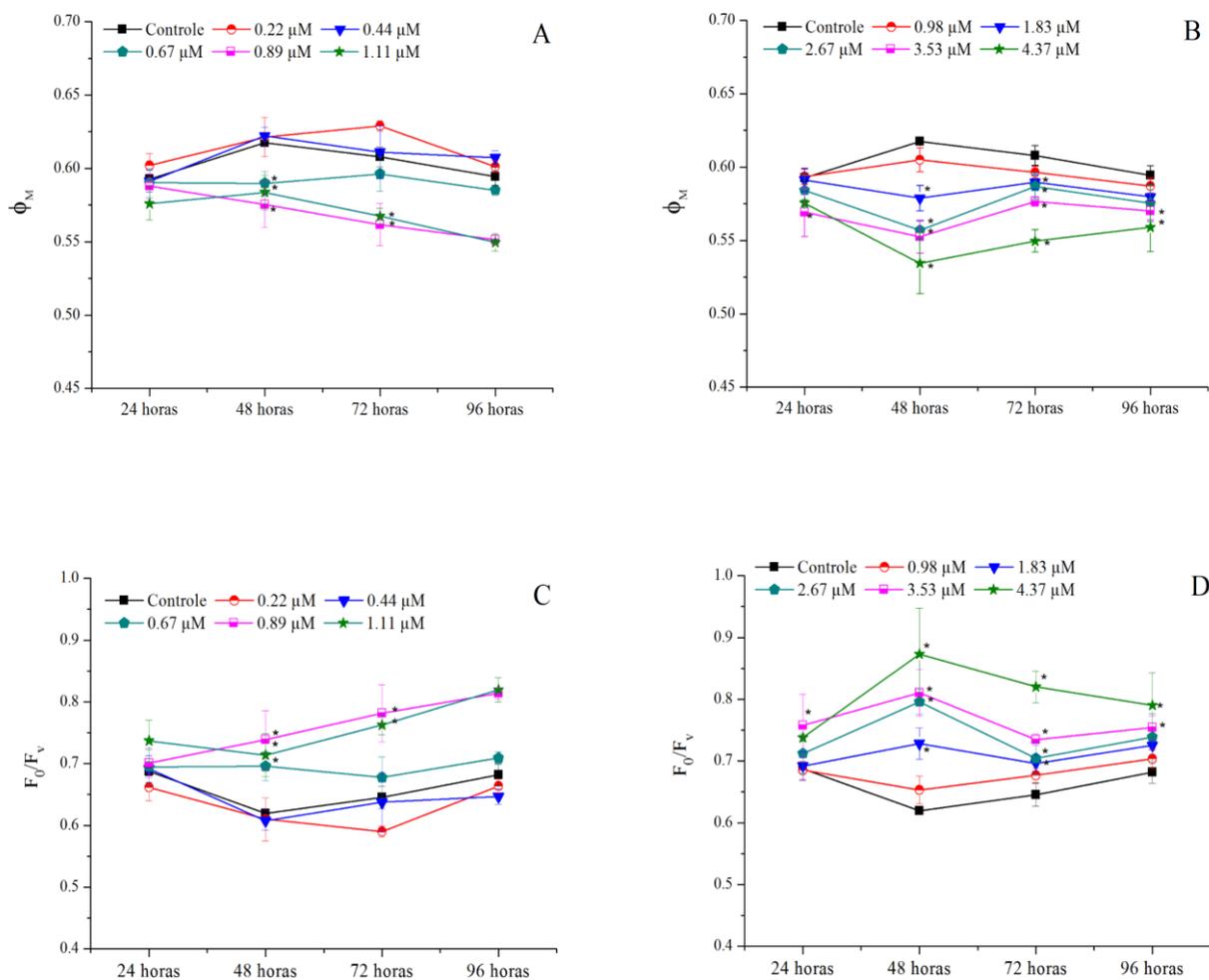


Figura 9. Rendimento quântico máximo (Φ_M) e medida da eficiência do complexo de evolução do oxigênio (F_0/F_v) de *Raphidocelis subcapitata* ao longo de 96 horas de exposição aos metais Cd (A) e Co (B). As diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) foram calculadas pelo teste de Dunnett para dados de 24 a 72 horas do Cd e 24 a 96 horas do Co e Dunn's para os dados de 96 horas do Cd, e estão evidenciadas com *.

5.3.3. Φ'_M e Quenchings

O Φ'_M está relacionado com a atividade fotossintética da microalga, pois tem relação com o rendimento do transporte de elétrons na presença de luz. Em 72 horas de exposição, observou-se que o Cd não alterou de maneira significativa o Φ'_M (Fig 10A), enquanto na microalga exposta ao Co ocorreu uma tendência de redução desse parâmetro em relação ao controle, a partir de 2,67 μM do metal (Fig 10B).

Nesse parâmetro, os resultados indicam que o Co interferiu de maneira significativa no rendimento do transporte de elétrons, enquanto o Cd não. Isso pode ter ocorrido devido a substituição do Mg, o átomo central da clorofila, pelo Co, com conseqüente prejuízo na fotossíntese das algas expostas ao metal conforme foi demonstrado por Juneau et al. (2002), para o Cu. Os resultados de Φ'_M obtidos por esses mesmos autores para diferentes espécies de microalgas também mostraram a redução desse parâmetro em resposta à exposição ao metal, assim como os resultados obtidos nesse trabalho. A diminuição dos valores de Φ'_M para *C. reinhardtii* ocorreu em 0,16 μM de Cu e para *R. subcapitata* em 1,57 μM de Cu. Neste mesmo estudo, a microalga *C. vulgaris* demonstrou pequeno efeito nas primeiras horas de exposição a 1,57 μM de Cu, porém, após 96 horas de exposição, os efeitos desapareceram.

Os resultados obtidos para qP em relação ao Cd apontam que houve aumento significativo desta variável apenas em 0,89 μM (Fig. 10C). De acordo com os dados de qN, a exposição da alga ao Cd, resultou em perda de energia por meios não fotoquímicos na concentração intermediária (0,67 μM) e nas mais elevadas (0,89 e 1,11 μM), conforme indicado pelo aumento nos valores desses parâmetros. Os dados de NPQ na exposição ao Cd não foram estatisticamente significativos. O resultados da exposição ao Co para tais parâmetros, qP, qN e NPQ indicam que o metal não afetou nenhum deles, uma vez que não foi encontrada diferença estatisticamente significativa (Fig. 10D). Isso pode estar associado a menor disponibilidade de íons de Co, como calculado pelo software MINEQL+.

Os *quenchings* indicam o decaimento da fluorescência, permitindo comparar a energia perdida em processos e a energia utilizada na fase fotoquímica. O qP (*quenching* fotoquímico) representa a quantidade de energia luminosa convertida à etapa fotoquímica, e sua diminuição significa que o transporte de elétrons foi inibido (Juneau, El Berdey e Popovic, 2002). Esse parâmetro não sofreu alteração negativa para nenhum metal no presente estudo, o que sugere que as algas expostas a ambos metais tinham capacidade para investir em fotoquímica, mas não foi o que ocorreu como pode ser observado pela redução nos valores de Φ_M .

O qN (*quenching* não-fotoquímico) corresponde aos processos de perda de energia não relacionados a fotoquímica. A inibição parcial da etapa fotoquímica de energia-consumo, eleva a dissipação de energia por meio do processo não fotoquímico (Juneau et al., 2002). Esse parâmetro foi o mais eficiente para evidenciar o efeito do Cd em 72 horas, pois sofreu alteração significativa já na concentração mais baixa do metal. De acordo com os resultados obtidos, temos que o aumento do valor de qN nas concentrações mais altas do metal pode indicar que houve perda de energia por processos não fotoquímicos.

O NPQ indica a perda de energia na forma de calor, funcionando como aparato de defesa contra danos oxidativos e excesso de luz. A queda nos valores de NPQ indicam que o sistema de proteção da alga foi danificado pelo contaminante (Da Costa et al., 2016). Nossos resultados não obtiveram diferença estatisticamente significativa para este parâmetro.

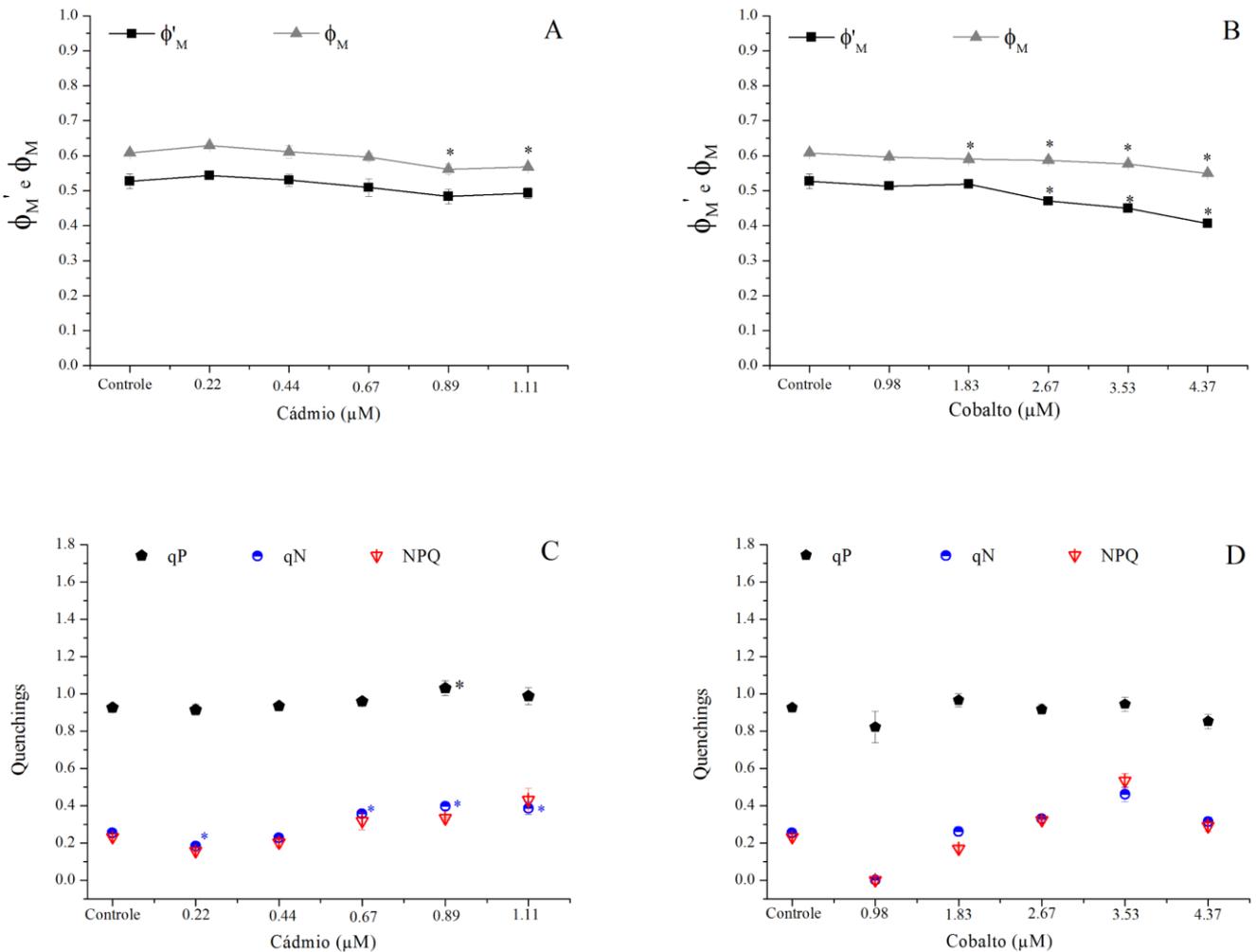


Figura 10. Rendimento efetivo (Φ'_M) (AB) e Quenchings qP, qN e NPQ (CD) avaliados em 72 horas de exposição da alga *Raphidocelis subcapitata* aos metais Cd (AC) e Co (BD). As diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) dos dados de Φ'_M , Φ_M e qP de ambos metais; e qN do Cd foram calculadas pelo teste de Dunnett para dados paramétricos. Os dados de NPQ de ambos metais e qN do Co foram calculados pelo teste de Dunn's para não-paramétricos e estão evidenciadas com *

5.4. Considerações finais

Os cálculos de porcentagem de íons livres realizados através do software MINEQL+ (versão 4.6) indicam que os íons de Co estavam cerca de 78 a 80% livres no meio. O modelo auxilia na melhor compreensão dos dados obtidos, uma vez que essa menor porcentagem de íons livres em comparação ao Cd (98% na forma livre) pode ser a causa da menor toxicidade do Co sobre o crescimento de *R. subcapitata* quando comparado aos efeitos causados pelo metal não essencial.

Todas as análises bioquímicas (lipídeos totais, classes lipídicas e carboidratos) permitiram identificar a toxicidade dos metais. Provavelmente, a síntese de carboidratos diminuiu devido à despolarização da membrana que o excesso de Cd e de Co causaram, como já foi relatado para outros metais (Martínez-Ruiz e Martínez-Jerónimo, 2015). Além disso, as classes lipídicas que sofreram maior aumento foram os lipídeos estruturais, indicando um possível mecanismo de defesa da alga, de proteger a membrana para impedir maior internalização dos metais e minimizar os danos causados.

Com relação às avaliações dos efeitos do Co sobre o aparato fotossintético, nossos resultados indicam que o metal provavelmente substitui íons metálicos como Mg (átomo central da clorofila) e o Mn, além de diminuir a síntese da molécula de Clo *a*. A substituição do Mg torna a molécula formada mais instável, com conseqüente queda da síntese de Clo *a*, o que pode explicar os danos à fotossíntese, aos rendimentos máximo e efetivo. A substituição do Mn no CEO, já reportada para algas expostas ao Cd (Mallick e Mohn 2003), possivelmente também ocorreu à alga exposta ao Co no nosso estudo, por também se tratar de um cátion divalente, e essa substituição danifica a reação de quebra da molécula de água e, com isso, a produção de oxigênio não ocorre e o elétron não retorna à molécula de Clo, tornando-a instável e danificando a continuação da fotossíntese.

Com isso, esses danos podem, por conseqüência, atingir níveis tróficos superiores, podendo causar prejuízos aos ecossistemas aquáticos, uma vez que as microalgas são produtores primários e base de cadeia alimentar.

6. CONCLUSÕES

Nas primeiras 48 horas de exposição, os metais levaram a efeitos negativos sobre a densidade celular, teor de Clo a , Φ_M e F_0/F_v . A composição bioquímica da alga exposta aos dois metais foi afetada, com diferenças nas classes que foram mais alteradas no tratamento com cada metal. O estresse causado pelo Cd alterou de maneira significativa as classes lipídicas, principalmente aumentando as concentrações de WE, FFA e ST, e reduzindo o teor de TAG e AMPL. O Co levou a um aumento das concentrações de ST, WE, PL e FFA, e também diminuiu os teores de AMPL e TAG. Ainda que seja um metal essencial, nossos dados indicam os danos que o Co é capaz de causar às microalgas, como diminuição da densidade de células já em 24 horas de exposição, queda do rendimento quântico máximo e efetivo, e alterações bioquímicas, além de permitir inferir potenciais mecanismos de ação do mesmo, como a substituição de Mg e Mn em moléculas e sistemas ligados à fotossíntese, danificando o processo fotossintético.

As alterações bioquímicas que encontramos indicam uma tentativa das microalgas de minimizar os danos causados pelos metais. Ressaltamos, ainda, a importância de estudos ecotoxicológicos que avaliem os efeitos de metais em nível intracelular, uma vez que nossos resultados demonstraram que parâmetros relacionados à composição bioquímica e eficiência fotossintética foram mais sensíveis que os métodos de análise mais tradicionais, os quais, de maneira geral, são relacionados apenas ao crescimento e à concentração de clorofila, e indicaram precocemente o efeito tóxico dos metais sobre *R. subcapitata*. Os resultados obtidos neste estudo fornecem informações para o melhor entendimento dos riscos potenciais que os metais Cd e Co oferecem às microalgas e também os mecanismos de ação dos mesmos.

7. Referências

ADAM, Christelle; GARNIER-LAPLACE, Jacqueline. Bioaccumulation of silver-110m, cobalt-60, cesium-137, and manganese-54 by the freshwater algae *Scenedesmus obliquus* and *Cyclotella meneghiana* and by suspended matter collected during a summer bloom event. **Limnology and oceanography**, v. 48, n. 6, p. 2303-2313, 2003.

AFKAR, E. et al. Toxicological response of the green alga *Chlorella vulgaris*, to some heavy metals. **American Journal of Environmental Sciences**, v. 6, n. 3, p. 230, 2010.

AFNOR, Association Française Normalisation, 1980. Norme expérimentale. T90-304. Essais de seuils Détermination de l'inhibition de *Scenedesmus subspicatus* par une substance, Paris, France.

ALHO, L. O. G. **Efeitos de nanopartículas de óxido de cobre (nano-CuO) e cloreto de cobre (CuCl₂) sobre a composição bioquímica e atividade fotossintética da clorófitica *Raphidocelis subcapitata***. Dissertação (Mestrado em Ecologia e Recursos Naturais), Departamento de Hidrobiologia, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos.

ALHO, Lays de Oliveira Gonçalves et al. Responses of *Raphidocelis subcapitata* exposed to Cd and Pb: Mechanisms of toxicity assessed by multiple endpoints. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 169, p. 950-959, 2019.

ANDOSCH, Anabela et al. A freshwater green alga under cadmium stress: ameliorating calcium effects on ultrastructure and photosynthesis in the unicellular model *Micrasterias*. **Journal of plant physiology**, v. 169, n. 15, p. 1489-1500, 2012.

BARCELOUX, Donald G.; BARCELOUX, Donald. Cobalt. **Journal of Toxicology: Clinical Toxicology**, v. 37, n. 2, p. 201-216, 1999.

BAUDOIN, M. F.; SCOPPA, P. Acute toxicity of various metals to freshwater zooplankton. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 12, n. 6, p. 745-751, 1974.

BEYENE, Abebe et al. Comparative study of diatoms and macroinvertebrates as indicators of severe water pollution: case study of the Kebena and Akaki rivers in Addis Ababa, Ethiopia. **Ecological Indicators**, v. 9, n. 2, p. 381-392, 2009.

BILGER, Wolfgang; BJÖRKMAN, Olle. Role of the xanthophyll cycle in photoprotection elucidated by measurements of light-induced absorbance changes, fluorescence and photosynthesis in leaves of *Hedera canariensis*. **Photosynthesis research**, v. 25, n. 3, p.

173-185, 1990.

BILGER, W.; SCHREIBER, U. Energy-dependent quenching of dark-level chlorophyll fluorescence in intact leaves. **Photosynthesis Research**, v. 10, n. 3, p. 303-308, 1986.

BOSSUYT, Bart TA; JANSSEN, Colin R. Long-term acclimation of *Pseudokirchneriella subcapitata* (Korshikov) Hindak to different copper concentrations: changes in tolerance and physiology. **Aquatic toxicology**, v. 68, n. 1, p. 61-74, 2004.

BRACK, Werner; FRANK, Hartmut. Chlorophyll a Fluorescence: A Tool for the Investigation of Toxic Effects in the Photosynthetic Apparatus. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 40, n. 1-2, p. 34-41, 1998.

CHAN, Sze Man; WANG, Wen-Xiong; NI, I.-Hsun. The uptake of Cd, Cr, and Zn by the macroalga *Enteromorpha crinita* and subsequent transfer to the marine herbivorous rabbitfish, *Siganus canaliculatus*. **Archives of environmental contamination and toxicology**, v. 44, n. 3, p. 0298-0306, 2003.

CHIA, Mathias Ahii et al. Combined nitrogen limitation and cadmium stress stimulate total carbohydrates, lipids, protein and amino acid accumulation in *Chlorella vulgaris* (*Trebouxiophyceae*). **Aquatic Toxicology**, v. 160, p. 87-95, 2015.

CHINNASAMY, Arulvasu et al. Evaluation of cadmium toxicity on the population growth of *Brachionus plicatilis* (OF Müller). **Indian Journal of science and technology**, v. 3, n. 1, p. 90-93, 2010.

COSGROVE, Jeff; BOROWITZKA, Michael A. Chlorophyll fluorescence terminology: an introduction. In: **Chlorophyll a fluorescence in aquatic sciences: methods and applications**. Springer, Dordrecht, 2010. p. 1-17.

DA COSTA, Cristina Henning et al. Effect of chromium oxide (III) nanoparticles on the production of reactive oxygen species and photosystem II activity in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. **Science of the Total Environment**, v. 565, p. 951-960, 2016.

DUNSTAN, G. A. et al. Changes in the lipid composition and maximisation of the polyunsaturated fatty acid content of three microalgae grown in mass culture. **Journal of Applied Phycology**, v. 5, n. 1, p. 71-83, 1993.

EL-SHEEKH, M. M. et al. Effect of cobalt on growth, pigments and the photosynthetic electron transport in *Monoraphidium minutum* and *Nitzschia perminuta*. **Brazilian Journal of Plant**

Physiology, v. 15, n. 3, p. 159-166, 2003.

EXPÓSITO, Nora et al. Performance of *Raphidocelis subcapitata* exposed to heavy metal mixtures. **Science of The Total Environment**, v. 601, p. 865-873, 2017.

FARRELLY, Damien J. et al. Carbon sequestration and the role of biological carbon mitigation: a review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 21, p. 712-727, 2013.

FATHI, A. A.; ZAKI, F. T.; FATHY, A. A. Bioaccumulation of some heavy metals and their influence on the metabolism of *Scenedesmus bijuga* and *Anabaena spiroides*. Egypt. **J. Biotechnol**, v. 7, p. 293-307, 2000.

FATHI, A. A. et al. Response of Nile water phytoplankton to the toxicity Cobalt, Copper and Zinc. **Res. J. Environ. Toxicol**, v. 2, p. 67-76, 2008.

FOLCH, Jordi et al. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. **J biol Chem**, v. 226, n. 1, p. 497-509, 1957.

GADD, Geoffrey Michael. Metals, minerals and microbes: geomicrobiology and bioremediation. **Microbiology**, v. 156, n. 3, p. 609-643, 2010.

GAUR, Atimanav; ADHOLEYA, Alok. Prospects of arbuscular mycorrhizal fungi in phytoremediation of heavy metal contaminated soils. **Current Science**, p. 528-534, 2004.

GE, Hongming et al. Balance between herbicidal activity and toxicity effect: a case study of the joint effects of triazine and phenylurea herbicides on *Selenastrum capricornutum* and *Photobacterium phosphoreum*. **Aquatic toxicology**, v. 150, p. 165-174, 2014.

GENTY, Bernard; BRIANTAIS, Jean-Marie; BAKER, Neil R. The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects**, v. 990, n. 1, p. 87-92, 1989.

GOLDING, Lisa A. et al. Derivation of a water quality guideline for aluminium in marine waters. **Environmental toxicology and chemistry**, v. 34, n. 1, p. 141-151, 2015.

GUSCHINA, Irina A.; HARWOOD, John L. Lead and copper effects on lipid metabolism in cultured lichen photobionts with different phosphorus status. **Phytochemistry**, v. 67, n. 16, p. 1731-1739, 2006.

HERLORY, Olivier; BONZOM, Jean-Marc; GILBIN, Rodolphe. Sensitivity evaluation of the

green alga *Chlamydomonas reinhardtii* to uranium by pulse amplitude modulated (PAM) fluorometry. **Aquatic toxicology**, v. 140, p. 288-294, 2013.

HONG, Kyong-Soo et al. Removal of heavy metal ions by using calcium carbonate extracted from starfish treated by protease and amylase. **J Anal Sci Technol**, v. 2, n. 2, p. 75-82, 2011.

HORVATIC, Janja et al. Toxicity of metals on the growth of *Raphidocelis subcapitata* and *Chlorella kessleri* using microplate bioassays. **Fresenius Environmental Bulletin**, v. 16, n. 7, p. 826, 2007.

HU, Qiang et al. Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production: perspectives and advances. **The plant journal**, v. 54, n. 4, p. 621-639, 2008.

JAMERS, An et al. An omics based assessment of cadmium toxicity in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. **Aquatic toxicology**, v. 126, p. 355-364, 2013.

JÄRUP, Lars; ÅKESSON, Agneta. Current status of cadmium as an environmental health problem. **Toxicology and applied pharmacology**, v. 238, n. 3, p. 201-208, 2009.

JUNEAU, P.; EL BERDEY, A.; POPOVIC, R. PAM fluorometry in the determination of the sensitivity of *Chlorella vulgaris*, *Selenastrum capricornutum*, and *Chlamydomonas reinhardtii* to copper. **Archives of environmental contamination and toxicology**, v. 42, n. 2, p. 155-164, 2002.

JUNEAU, Philippe; POPOVIC, Radovan. Evidence for the rapid phytotoxicity and environmental stress evaluation using the PAM fluorometric method: importance and future application. **Ecotoxicology**, v. 8, n. 6, p. 449-455, 1999.

JUNEAU, Philippe et al. Evaluation of different algal species sensitivity to mercury and metolachlor by PAM-fluorometry. **Chemosphere**, v. 45, n. 4-5, p. 589-598, 2001.

KOUKAL, Brahim et al. Influence of humic substances on the toxic effects of cadmium and zinc to the green alga *Pseudokirchneriella subcapitata*. **Chemosphere**, v. 53, n. 8, p. 953-961, 2003.

KRIEDEMANN, P. Eo; GRAHAM, R. D.; WISKICH, J. T. Photosynthetic dysfunction and in vivo changes in chlorophyll *a* fluorescence from manganese-deficient wheat leaves. **Australian journal of agricultural research**, v. 36, n. 2, p. 157-169, 1985.

KUMAR, K. Suresh et al. Algal photosynthetic responses to toxic metals and herbicides assessed by chlorophyll *a* fluorescence. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 104,

p. 51-71, 2014.

LEE, R. F.; NEVENZEL, J. C.; PAFFENHÖFER, G.-A. Importance of wax esters and other lipids in the marine food chain: phytoplankton and copepods. **Marine Biology**, v. 9, n. 2, p. 99-108, 1971.

LEE, RICHARD F. et al. Lipids in the marine environment. **California Marine Resources Communication, CalCOFI Report**, v. 16, p. 95-102, 1972.

LIM, Chi Young et al. Effects of copper (I) oxide on growth and biochemical compositions of two marine microalgae. **Journal of environmental biology**, v. 27, n. 3, p. 461-466, 2006.

LIU, D.; WONG, P. T. S.; DUTKA, B. J. Determination of carbohydrate in lake sediment by a modified phenol-sulfuric acid method. **Water research**, v. 7, n. 5, p. 741-746, 1973.

LOMBARDI, Ana T.; MALDONADO, Maria T. The effects of copper on the photosynthetic response of *Phaeocystis cordata*. **Photosynthesis research**, v. 108, n. 1, p. 77-87, 2011.

LUSTIGMAN, B.; LEE, L. H.; WEISS-MAGASIC, C. Effects of cobalt and pH on the growth of *Chlamydomonas reinhardtii*. **Bulletin of environmental contamination and toxicology**, v. 55, n. 1, p. 65-72, 1995.

MACHADO, Manuela D.; SOARES, Eduardo V. Modification of cell volume and proliferative capacity of *Pseudokirchneriella subcapitata* cells exposed to metal stress. **Aquatic toxicology**, v. 147, p. 1-6, 2014.

MACHADO, Manuela D.; LOPES, Ana R.; SOARES, Eduardo V. Responses of the alga *Pseudokirchneriella subcapitata* to long-term exposure to metal stress. **Journal of hazardous materials**, v. 296, p. 82-92, 2015.

MACHADO, Manuela D.; SOARES, Eduardo V. Modification of cell volume and proliferative capacity of *Pseudokirchneriella subcapitata* cells exposed to metal stress. **Aquatic toxicology**, v. 147, p. 1-6, 2014.

MACFIE, S. M.; TARMOHAMED, Y.; WELBOURN, P. M. Effects of cadmium, cobalt, copper, and nickel on growth of the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*: the influences of the cell wall and pH. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 27, n. 4, p. 454-458, 1994.

MALLICK, Nirupama; MOHN, F. H. Use of chlorophyll fluorescence in metal-stress research: a case study with the green microalga *Scenedesmus*. **Ecotoxicology and Environmental**

Safety, v. 55, n. 1, p. 64-69, 2003.

MARTÍNEZ-RUIZ, Erika Berenice; MARTÍNEZ-JERÓNIMO, Fernando. Nickel has biochemical, physiological, and structural effects on the green microalga *Ankistrodesmus falcatus*: an integrative study. **Aquatic Toxicology**, v. 169, p. 27-36, 2015.

MAXWELL, Kate; JOHNSON, Giles N. Chlorophyll fluorescence—a practical guide. **Journal of experimental botany**, v. 51, n. 345, p. 659-668, 2000.

MCLARNON-RICHES, Christian J. et al. Effects of environmental factors and metals on *Selenastrum capricornutum* lipids. **Phytochemistry**, v. 49, n. 5, p. 1241-1247, 1998.

MOCK, Thomas; KROON, Bernd MA. Photosynthetic energy conversion under extreme conditions—I: important role of lipids as structural modulators and energy sink under N-limited growth in Antarctic sea ice diatoms. **Phytochemistry**, v. 61, n. 1, p. 41-51, 2002.

MONTEIRO, Cristina M. et al. Toxicity of cadmium and zinc on two microalgae, *Scenedesmus obliquus* and *Desmodesmus pleiomorphus*, from Northern Portugal. **Journal of Applied Phycology**, v. 23, n. 1, p. 97-103, 2011.

Nelson, D. L.; Cox, M. M., 2014. *Princípios de Bioquímica de Lehninger*. 6 ed. Tradução: Arnaldo Antonio Simões, Wilson Roberto Navega Lodi. Worth Publishers, Inc.

NORBERG-KING, Teresa J. A linear interpolation method for sublethal toxicity: The inhibition concentration (IC_p) approach. **National Effluent Toxicity Assessment Center Technical Report**, v. 39, p. 3-93, 1993.

NOVAK, Sara et al. Cellular internalization of dissolved cobalt ions from ingested CoFe₂O₄ nanoparticles: in vivo experimental evidence. **Environmental science & technology**, v. 47, n. 10, p. 5400-5408, 2013.

OXBOROUGH, Kevin; BAKER, Neil R. Resolving chlorophyll a fluorescence images of photosynthetic efficiency into photochemical and non-photochemical components—calculation of qP and F_v/F_m-; without measuring F_o. **Photosynthesis research**, v. 54, n. 2, p. 135-142, 1997.

PARRISH, Christopher C. Dissolved and particulate marine lipid classes: a review. **Marine Chemistry**, v. 23, n. 1-2, p. 17-40, 1988.

PARRISH, Christopher C. Determination of total lipid, lipid classes, and fatty acids in aquatic samples. In: **Lipids in freshwater ecosystems**. Springer, New York, NY, 1999. p. 4-20.

PARRISH, Christopher C. Dissolved and particulate marine lipid classes: a review. **Marine Chemistry**, v. 23, n. 1-2, p. 17-40, 1988.

PEÑA-VÁZQUEZ, E. et al. Development of a microalgal PAM test method for Cu (II) in waters: comparison of using spectrofluorometry. **Ecotoxicology**, v. 19, n. 6, p. 1059-1065, 2010.

PISTOCCHI, R. et al. Increased production of extra-and intracellular metal-ligands in phytoplankton exposed to copper and cadmium. **Journal of Applied phycology**, v. 12, n. 3-5, p. 469-477, 2000.

QIAN, Haifeng et al. Combined effect of copper and cadmium on *Chlorella vulgaris* growth and photosynthesis-related gene transcription. **Aquatic toxicology**, v. 94, n. 1, p. 56-61, 2009.

QUARTACCI, Mike F. et al. Growth in excess copper induces changes in the lipid composition and fluidity of PSII-enriched membranes in wheat. **Physiologia Plantarum**, v. 108, n. 1, p. 87-93, 2000.

RAMAKRITINAN, C. M.; CHANDURVELAN, Rathishri; KUMARAGURU, A. K. Acute Toxicity of Metals: Cu, Pb, Cd, Hg and Zn on Marine Molluscs, *Cerithedia cingulata* G., and *Modiolus philippinarum* H. **Indian Journal of Geo-Marine Sciences** v41, p141-145, 2012.

RELYEA, Rick; HOVERMAN, Jason. Assessing the ecology in ecotoxicology: a review and synthesis in freshwater systems. **Ecology Letters**, v. 9, n. 10, p. 1157-1171, 2006.

ROCHA, Giseli Swerts et al. Biochemical and physiological responses of *Selenastrum gracile* (*Chlorophyceae*) acclimated to different phosphorus concentrations. **Journal of Applied Phycology**, p. 1-11, 2018.

ROCHA, Giseli S. et al. Copper affects biochemical and physiological responses of *Selenastrum gracile* (Reinsch). **Ecotoxicology**, v. 25, n. 8, p. 1468-1477, 2016.

SABATINI, Sebastian E. et al. Oxidative stress and antioxidant defenses in two green microalgae exposed to copper. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 72, n. 4, p. 1200-1206, 2009.

SAISON, Cyril et al. Effect of core–shell copper oxide nanoparticles on cell culture morphology and photosynthesis (photosystem II energy distribution) in the green alga, *Chlamydomonas reinhardtii*. **Aquatic toxicology**, v. 96, n. 2, p. 109-114, 2010.

SAMADANI, Mahshid et al. Effect of cadmium accumulation on green algae *Chlamydomonas*

reinhardtii and acid-tolerant *Chlamydomonas* CPCC 121. **Chemosphere**, v. 191, p. 174-182, 2018.

SCHREIBER, Ulrich; BILGER, Wolfgang. Progress in chlorophyll fluorescence research: major developments during the past years in retrospect. In: **Progress in Botany/Fortschritte der Botanik**. Springer, Berlin, Heidelberg, 1993. p. 151-173.

SCHREIBER, U.; SCHLIWA, U.; BILGER, W1. Continuous recording of photochemical and non-photochemical chlorophyll fluorescence quenching with a new type of modulation fluorometer. **Photosynthesis research**, v. 10, n. 1-2, p. 51-62, 1986.

SCHWARZENBACH, René P. et al. Global water pollution and human health. **Annual Review of Environment and Resources**, v. 35, p. 109-136, 2010.

SHARMA, K. K., Schumann, H., Schenk, P. M., 2012. High lipid induction in microalgae for biodiesel production. **Energies**, 5, 1532-1553.

SIMONSEN, Lars Ole; HARBAK, Henrik; BENNEKOU, Poul. Cobalt metabolism and toxicology—a brief update. **Science of the Total Environment**, v. 432, p. 210-215, 2012.

SUÁREZ, Cristina et al. Cadmium toxicity on the freshwater microalga *Chlamydomonas moewusii* Gerloff: Biosynthesis of thiol compounds. **Environmental toxicology and chemistry**, v. 29, n. 9, p. 2009-2015, 2010.

SUZUKI, Shigekatsu et al. *Raphidocelis subcapitata* (= *Pseudokirchneriella subcapitata*) provides an insight into genome evolution and environmental adaptations in the *Sphaeropleales*. **Scientific reports**, v. 8, n. 1, p. 8058, 2018.

SZIVÁK, Ilona; BEHRA, Renata; SIGG, Laura. Metal-induced reactive oxygen species production in *chlamydomonas reinhardtii* (*Chlorophyceae*) 1. **Journal of phycology**, v. 45, n. 2, p. 427-435, 2009.

TALEC, Amélie et al. Effect of gaseous cement industry effluents on four species of microalgae. **Bioresource technology**, v. 143, p. 353-359, 2013.

TRIPATHI, B. N.; GAUR, J. P. Physiological behavior of *Scenedesmus* sp. during exposure to elevated levels of Cu and Zn and after withdrawal of metal stress. **Protoplasma**, v. 229, n. 1, p. 1-9, 2006.

VÖRÖSMARTY, Charles J. et al. Global threats to human water security and river biodiversity. **Nature**, v. 467, n. 7315, p. 555, 2010.

WANG, Shuzhi; ZHANG, Daoyong; PAN, Xiangliang. Effects of cadmium on the activities of photosystems of *Chlorella pyrenoidosa* and the protective role of cyclic electron flow. **Chemosphere**, v. 93, n. 2, p. 230-237, 2013.

WITHERS, Nancy W.; NEVENZEL, Judd C. Phytol esters in a marine dinoflagellate. **Lipids**, v. 12, n. 12, p. 989-993, 1977.

ZHAO, Guangming et al. Surface sediment properties and heavy metal pollution assessment in the Pearl River Estuary, China. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 24, n. 3, p. 2966-2979, 2017.

ZHENG, Jia-Lang et al. Chronic waterborne zinc and cadmium exposures induced different responses towards oxidative stress in the liver of zebrafish. **Aquatic Toxicology**, v. 177, p. 261-268, 2016.