

**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA CIVIL E AMBIENTAL**

**AVALIAÇÃO ECOTOXICOLÓGICA DE ÁCIDO
PERFLUOROOCTANOICO (PFOA) E
CILINDROSPERMOPSINA (CIANOTOXINA):
INVESTIGAÇÕES DE EFEITOS INDIVIDUAIS E DE SUAS
MISTURAS EM MICROALGAS**

ISABELLA KAROLINE LIMA SANTOS

ORIENTADORA: RAQUEL MORAES SOARES

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**BRASÍLIA – DF
2025**

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA CIVIL E AMBIENTAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM TECNOLOGIA AMBIENTAL
E RECURSOS HÍDRICOS

AVALIAÇÃO ECOTOXICOLÓGICA DE ÁCIDO
PERFLUOROOCTANOICO (PFOA) E CILINDROSPERMOPSINA
(CIANOTOXINA): INVESTIGAÇÕES DE EFEITOS INDIVIDUAIS E
DE SUAS MISTURAS EM MICROALGAS

ISABELLA KAROLINE LIMA SANTOS

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO SUBMETIDA AO DEPARTAMENTO
DE ENGENHARIA CIVIL E AMBIENTAL DA FACULDADE DE
TECNOLOGIA DA UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA COMO PARTE
DOS REQUISITOS NECESSÁRIOS PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE
MESTRE

APROVADA POR:

Prof^a Raquel Moraes Soares, DSc. (ENC/UnB)
(Orientadora)

Prof^o Ricardo Tezini Minoti, DSc (ENC/UnB)
(Examinador Interno)

Prof^a Rachel Ann Hauser-Davis, DSc. (IOC/Fiocruz)
(Examinador Externo)

BRASÍLIA/DF, FEVEREIRO DE 2025

FICHA CATALOGRÁFICA

SANTOS, ISABELLA KAROLINE LIMA

Avaliação ecotoxicológica de ácido perfluorooctanoico (PFOA) e cilindrospermopsina (cianotoxina): investigações de efeitos individuais e de suas misturas em microalgas.

xviii, 92p., 297 mm (ENC/FT/UnB, Mestre, Programa de Tecnologia Ambiental e Recursos Hídricos, 2025).

Dissertação de Mestrado – Universidade de Brasília, Faculdade de Tecnologia. Departamento de Engenharia Civil e Ambiental.

- | | |
|------------------------|---------------------------|
| 1. Bioindicadores | 2. Ecotoxicologia |
| 3. Efeitos Interativos | 4. Sistemas Antioxidantes |
| I. ENC/FT/UnB | II. Título (série) |

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

SANTOS, I. K. L. (2025). Avaliação ecotoxicológica de ácido perfluorooctanoico (PFOA) e cilindrospermopsina (cianotoxina): investigações de efeitos individuais e de suas misturas em microalgas. Dissertação de Mestrado em Tecnologia Ambiental e Recursos Hídricos, Publicação PPGTARH.DM – a definir/2025, Departamento de Engenharia Civil e Ambiental, Universidade de Brasília, Brasília, DF, 92p.

CESSÃO DE DIREITOS

NOME DO AUTOR: Isabella Karoline Lima Santos

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: Avaliação ecotoxicológica de ácido perfluorooctanoico (PFOA) e cilindrospermopsina (cianotoxina): investigações de efeitos individuais e de suas misturas em microalgas.

GRAU / ANO: Mestre / 2025

Concede-se à Universidade de Brasília permissão para reproduzir cópias desta dissertação de mestrado e para emprestar ou vender tais cópias exclusivamente para fins acadêmicos e científicos. O autor reserva outros direitos de publicação e nenhuma parte desta dissertação de mestrado pode ser reproduzida sem a autorização por escrito do autor.

Isabella Karoline Lima Santos
isawklima@gmail.com

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, por todo (e tanto) amor e cuidado. Por serem exatamente quem são e por me criarem exatamente como me criaram. Agradeço por terem me proporcionado toda a estrutura possível. Agradeço por todos os esforços dos últimos anos e pelo apoio incondicional nas minhas escolhas. A realização desse sonho só foi possível graças a vocês.

À minha orientadora, professora Raquel, por ser um exemplo de profissional e de humanidade. Agradeço por toda paciência nesse período e pela confiança em mim depositada. Agradeço por ser compreensiva e entender sobre os nossos limites emocionais. Obrigada por todo conhecimento agregado e por contribuir com minha formação acadêmica e pessoal.

À banca examinadora, professor Ricardo e professora Rachel, por dedicarem seu tempo, expertise e valiosas contribuições para o aprimoramento deste trabalho. As suas sugestões foram essenciais nesse trabalho.

Ao professor Enrico, Júlia e Guilherme, pelos ensinamentos e conhecimentos transmitidos durante o período de análises no laboratório. Agradeço por terem facilitado a minha rotina de análises, por todo suporte técnico prestado e por estarem sempre dispostos a ajudar.

À Universidade de Brasília, pela excelência de ensino. Agradeço por ter me permitido conhecer pessoas exemplares, me proporcionado vivências incríveis e por ter sido minha segunda casa ao longo dos últimos anos.

À Fiocruz, por me proporcionar a oportunidade de realizar análises em seus laboratórios. Agradeço por ter tido a oportunidade de conhecer e contar com a colaboração de pessoas capacitadas, cujo auxílio foi essencial para o desenvolvimento deste trabalho.

À NMBU (*Norwegian University of Life Sciences*) pela concessão da bolsa de pesquisa, o que possibilitou a conclusão deste trabalho.

Aos meus colegas de mestrado, Artur e Josiane. Agradeço por nossos caminhos terem se cruzado. Agradeço pela caminhada compartilhada, vocês foram meus presentes da pós-graduação. Espero que as boas memórias que construímos permaneçam ao longo dos anos, e que possamos continuar construindo novas.

Às minhas amigas, Júlia, Thainah, Camila, Vanessa, Sarah, Gabriela e Bruna por me ensinarem sobre o amor todos os dias, seja em palavras, demonstrações ou até mesmo no silêncio

confortável, apenas pelo prazer da presença. Sinto o cuidado de vocês onde quer que eu esteja. A vida se torna muito melhor quando compartilhada com pessoas como vocês.

Aos meus amigos, Winsper e José, meus irmãos que a vida me permitiu escolher, mas que foram colocados em meu caminho pela Engenharia Ambiental. Agradeço por sempre me estenderem a mão, oferecendo apoio incondicional, momentos de leveza e encorajamento quando eu mesma não acreditava em mim. Vocês foram (e são) fundamentais na minha jornada.

Aos colegas que a pós-graduação me proporcionou conhecer, compartilhar risos, histórias e momentos difíceis, Jeniffer, Esdras, Victor, Sarah, Sandro, Laura e Renata. Vocês foram essenciais nessa caminhada.

A todos os profissionais da educação que contribuíram na minha formação. Agradeço a todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a conclusão deste trabalho e me ajudaram na realização desse sonho.

*“Entendo bem o sotaque das águas
Dou respeito às coisas desimportantes
e aos seres desimportantes.
Prezo insetos mais que aviões.
Prezo a velocidade
das tartarugas mais que a dos mísseis.
Tenho em mim um atraso de nascença.
Eu fui aparelhado
para gostar de passarinhos.
Tenho abundância de ser feliz por isso.
Meu quintal é maior do que o mundo.”*

(Manoel de Barros)

RESUMO

AVALIAÇÃO ECOTOXICOLÓGICA DE ÁCIDO PERFLUOROOCTANOICO (PFOA) E CILINDROSPERMOPSINA (CIANOTOXINA): INVESTIGAÇÕES DE EFEITOS INDIVIDUAIS E DE SUAS MISTURAS UTILIZANDO MICROALGAS

As microalgas, como produtores primários essenciais, são modelos ecotoxicológicos eficazes para avaliar os impactos da poluição nos ecossistemas aquáticos. Com rápido crescimento e alta adaptabilidade, elas respondem rapidamente à contaminação, refletindo mudanças na qualidade da água e afetando a cadeia alimentar. O objetivo deste estudo foi fornecer informações sobre como algumas microalgas respondem na defesa antioxidante quando expostas a diferentes concentrações e combinações de dois contaminantes (ácido perfluorooctanoico – PFOA e cilindrospermopsina – CYN), e também como são as respostas de crescimento e competição em três diferentes cenários de exposição. Foram realizados ensaios de toxicidade crônica com culturas unialgais (*Monoraphidium capricornutum*) e mistas (*Monoraphidium capricornutum* e *Ankistrodesmus striptatus*), seguindo a norma ABNT NBR 12.648/2018. As microalgas foram cultivadas em condições controladas, expostas a diferentes concentrações dos contaminantes, e monitoradas quanto ao crescimento (12 dias) e a biomarcadores de estresse oxidativo (4 dias). Para análise bioquímica, foram utilizados métodos como a determinação de proteínas totais (Lowry), quantificação de glutationa (GSH), proteínas carboniladas (PTC), concentração de malondialdeído (MDA) e atividade de enzimas antioxidantes (CAT, SOD e GST). No décimo segundo dia, o crescimento de *M. capricornutum* e *A. striptatus* foi significativamente afetado pela maior concentração de CYN em todos os cenários da cultura mista, mas *M. capricornutum* não foi afetada de forma significativa na cultura individual. *M. capricornutum* sofreu maior inibição quando competiu com *A. striptatus*, especialmente com as maiores concentrações de PFOA e CYN. *A. striptatus* também foi significativamente impactada por altas concentrações de PFOA ao longo da exposição. Os resultados obtidos neste estudo mostraram uma redução significativa na atividade de GST quando *M. capricornutum* foi exposta a 2000 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de PFOA, uma diminuição significativa também foi observada quando expostas às misturas de 100 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de CYN + 1000 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de PFOA e 50 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de CYN + 2000 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de PFOA. Por outro lado, observou-se um aumento na concentração de GSH com a exposição a 1000 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de PFOA e às mesmas misturas mencionadas. Já a resposta de atividade de SOD e CAT variou amplamente. A peroxidação lipídica, medida pela concentração de MDA, apresentou um aumento significativo na mistura

de $100 \text{ }\mu\text{g.L}^{-1}$ de CYN + $1000 \text{ }\mu\text{g.L}^{-1}$ de PFOA, enquanto a carbonilação de proteínas apresentou aumento significativo em todos os cenários de mistura, e também na concentração de $1000 \text{ }\mu\text{g.L}^{-1}$ de PFOA. Os estudos disponíveis sobre misturas binárias de contaminantes geralmente analisam substâncias da mesma classe, como PFAS ou cianotoxinas, sem explorar as interações e os efeitos resultantes de diferentes mecanismos de ação entre classes distintas. Os resultados demonstraram que o crescimento de *Monoraphidium capricornutum* e *Ankistrodesmus scriptatus* foi impactado de forma variável pela exposição ao PFOA e à cilindrospermopsina (CYN), com efeitos de redução mais intensos em concentrações elevadas e em culturas mistas. Ensaios bioquímicos com *M. capricornutum* indicaram dano oxidativo mais acentuados nos tratamentos com as misturas, sugerindo interações complexas entre os contaminantes e as vias antioxidantes. Esses achados reforçam a importância de investigar os mecanismos de toxicidade e os efeitos de poluentes em cenários realistas.

Palavras-chave: Bioindicadores, Ecotoxicologia, Efeitos Interativos, Sistemas Antioxidantes.

ABSTRACT

ECOTOXICOLOGICAL ASSESSMENT OF PERFLUOROOCTANOIC ACID (PFOA) AND CYLINDROSPERMOPSIN (CYANOTOXIN): INVESTIGATING INDIVIDUAL AND MIXTURE EFFECTS USING MICROALGAE

Microalgae, as essential primary producers, are effective ecotoxicological models for assessing the impacts of pollution on aquatic ecosystems. With rapid growth and high adaptability, they respond quickly to contamination, reflecting changes in water quality and affecting the food chain. The aim of this study was to provide insights into how certain microalgae respond through antioxidant defenses when exposed to different concentrations and combinations of two contaminants (perfluorooctanoic acid – PFOA and cylindrospermopsin – CYN), as well as to assess growth and competition responses in three different exposure scenarios. Chronic toxicity tests were conducted with unialgal (*Monoraphidium capricornutum*) and mixed cultures (*Monoraphidium capricornutum* and *Ankistrodesmus striptatus*) following the ABNT NBR 12.648/2018 standard.

The microalgae were cultivated under controlled conditions, exposed to different contaminant concentrations, and monitored for growth (12 days) and oxidative stress biomarkers (4 days). Biochemical analyses included total protein determination (Lowry method), glutathione (GSH) quantification, protein carbonylation (PTC), malondialdehyde (MDA) concentration, and antioxidant enzyme activities (CAT, SOD, and GST).

On the twelfth day, the growth of *M. capricornutum* and *A. striptatus* was significantly affected by the highest CYN concentration in all mixed culture scenarios. However, *M. capricornutum* showed no significant growth inhibition in unialgal cultures. *M. capricornutum* experienced greater inhibition when competing with *A. striptatus*, especially at higher PFOA and CYN concentrations. *A. striptatus* was also significantly impacted by high PFOA concentrations throughout the exposure period.

The results demonstrated a significant reduction in GST activity when *M. capricornutum* was exposed to $2000 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ of PFOA. A significant decrease was also observed when exposed to mixtures of $100 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ of CYN + $1000 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ of PFOA and $50 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ of CYN + $2000 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ of PFOA. Conversely, an increase in GSH concentration was observed with exposure to $1000 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ of PFOA and the same mixtures. SOD and CAT activity responses varied widely. Lipid peroxidation, measured by MDA concentration, showed a significant increase in the mixture

of $100 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ of CYN + $1000 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ of PFOA, while protein carbonylation significantly increased in all mixture scenarios, as well as at $1000 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ of PFOA.

Available studies on binary contaminant mixtures generally focus on substances of the same class, such as PFAS or cyanotoxins, without exploring the interactions and resulting effects of different modes of action across distinct classes. The findings demonstrated that the growth of *Monoraphidium capricornutum* and *Ankistrodesmus striptatus* was variably impacted by exposure to PFOA and cylindrospermopsin (CYN), with more intense growth reduction at higher concentrations and in mixed cultures. Biochemical assays with *M. capricornutum* indicated more pronounced oxidative damage in the mixture treatments, suggesting complex interactions between contaminants and antioxidant pathways. These findings reinforce the importance of investigating toxicity mechanisms and pollutant effects under realistic exposure scenarios.

Keywords: Antioxidant Systems, Bioindicators, Ecotoxicology, Interactive Effects.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVOS.....	3
2.1. OBJETIVO GERAL	3
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	3
3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA E REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
3.1 POLUIÇÃO DOS CORPOS D'ÁGUA.....	4
3.1.1 Eutrofização e Cianobactérias.....	5
3.1.1.1 Fatores determinantes das florações de cianobactérias em ambientes lênticos.....	7
3.1.1.2 Mudanças climáticas e florações de cianobactérias	8
3.1.1.3 Produção e liberação de cianotoxinas	11
3.1.1.4 Monitoramento e aspectos regulatórios de cilindrospermopsis	15
3.1.2 Microcontaminantes.....	16
3.1.2.1 Dispersão, bioacumulação e degradação de microcontaminantes.....	17
3.1.2.2 Compostos per- e polifluoroalquilados	19
3.1.2.3 Monitoramento, aspectos regulatórios de microcontaminantes e panorama geral dos PFAS	24
3.2 ECOTOXICOLOGIA	25
3.2.1 Bioindicadores e biomarcadores	26
3.2.1.1 Microalgas.....	28
3.2.1.2 Enzimas Antioxidantes	29
3.2.2 Efeitos sinérgicos, aditivos e antagônicos	31
3.2.3 Ensaios Ecotoxicológicos.....	32
4 MATERIAL E MÉTODOS	34
4.1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	34
4.2 PLANEJAMENTO E PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS.....	34
4.3 CULTIVO DE MICROALGAS	36
4.3.1 Espécies Cultivadas.....	36
4.3.2 Condições de cultivo.....	36
4.3.3 Preparo das soluções-estoque.....	37
4.3.3.1 Ácido Perfluorooctanoico (PFOA)	37
4.3.3.2 Cilindrospermopsis (CYN)	37
4.3.4 Exposição individual aos contaminantes.....	38
4.3.5 Exposição à mistura binária.....	39

4.4	PROCEDIMENTOS ANALÍTICOS	40
4.4.1	Avaliação do crescimento de microalgas.....	41
4.4.2	Preparo e conservação das amostras para análises do sistema antioxidante.....	42
4.5	ANÁLISES BIOQUÍMICAS.....	43
4.5.1	Extração de proteínas e enzimas das células de microalgas	43
4.5.2.	Atividades de enzimas antioxidantes	43
4.5.2.1	Atividade da Glutationa-S-Transferase (GST).....	43
4.5.2.2	Atividade da Superóxido Dismutase (SOD)	44
4.5.2.3	Atividade da Catalase (CAT)	45
4.5.3	Análise do dano oxidativo	46
4.5.3.1	Ensaio de quantificação da Peroxidação Lipídica (LPO).....	46
4.5.3.2	Análise de Proteínas Carboniladas (PTC).....	47
4.5.3.3	Determinação da Concentração de Glutationa (GSH)	47
4.5	ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	48
5	RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	49
5.1	EFEITOS DE PFOA E CYN NO CRESCIMENTO CELULAR DE <i>Monoraphidium capricornutum</i>	49
5.1.1	Exposição de <i>Monoraphidium capricornutum</i> à PFOA e CYN individualmente	49
5.1.2	Exposição de <i>Monoraphidium capricornutum</i> à Mistura Binária (PFOA e CYN)	52
5.1.3.	Efeitos de PFOA e CYN no Crescimento de Cultura Mista (<i>Monoraphidium capricornutum</i> e <i>Ankistrodesmus striptatus</i>)	54
5.1.3.1	Cenário 1: Cultura Mista Sem Predominância.....	55
5.1.3.2	Cenário 2: Cultura Mista com Predominância de <i>Monoraphidium capricornutum</i> ..	57
5.1.3.3	Cenário 3: Cultura Mista com Predominância <i>Ankistrodesmus striptatus</i>	59
5.2	ANÁLISES BIOQUÍMICAS.....	64
5.2.1	Resposta ao estresse oxidativo de <i>M. capricornutum</i> sob diferentes concentrações de PFOA e CYN.....	65
5.2.2.1	Atividade da Glutationa S-Transferase (GST) e concentração de Glutationa (GSH) ...	65
5.2.2.2	Atividade de Superóxido Dismutase (SOD) e de Catalase (CAT).....	67
5.2.2.3	Marcadores de Peroxidação Lipídica e Quantificação de Proteínas Carboniladas	70
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS	74
7	CONCLUSÕES	76
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	77

LISTA DE TABELAS

TABELA 4.1: DENSIDADE CELULAR INICIAL DE <i>MONORAPHIDIUM CAPRICORNUTUM</i> E <i>ANKISTRODESMUS STRIPTATUS</i> NOS EXPERIMENTOS DE EXPOSIÇÃO AO PFOA E CYN, INDIVIDUALMENTE, EM DIFERENTES CENÁRIOS EM CULTURA MISTA DE MICROALGAS.....	39
TABELA 4.2: DIFERENTES TRATAMENTOS APLICADOS NO ENSAIO DE MISTURA BINÁRIA	39
TABELA 4.3: TABELA RESUMO DAS CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS: CULTURAS UNIALGAIS E MISTAS.....	40
TABELA 5.1: VALORES CALCULADOS PARA A TAXA DE CRESCIMENTO (<i>M</i>), TAXA DE DIVISÃO POR DIA (<i>K</i>) E TAXA DE DUPLICAÇÃO (<i>G</i>) PARA <i>MONORAPHIDIUM CAPRICORNUTUM</i> EXPOSTA A CYN E PFOA INDIVIDUALMENTE.....	50
TABELA 5.2: VALORES CALCULADOS PARA A TAXA DE CRESCIMENTO (<i>M</i>), TAXA DE DIVISÃO POR DIA (<i>K</i>) E TAXA DE DUPLICAÇÃO (<i>G</i>) PARA <i>MONORAPHIDIUM CAPRICORNUTUM</i> EXPOSTA À CYN E AO PFOA EM MISTURA BINÁRIA.....	53
TABELA 5.3: VALORES CALCULADOS PARA A TAXA DE CRESCIMENTO (<i>M</i>), TAXA DE DIVISÃO POR DIA (<i>K</i>) E TAXA DE DUPLICAÇÃO (<i>G</i>) PARA <i>MONORAPHIDIUM CAPRICORNUTUM</i> EXPOSTA À CYN E AO PFOA INDIVIDUALMENTE EM CULTURA MISTA SEM PREDOMINÂNCIA.	57
TABELA 5.4: VALORES CALCULADOS PARA A TAXA DE CRESCIMENTO (<i>M</i>), TAXA DE DIVISÃO POR DIA (<i>K</i>) E TAXA DE DUPLICAÇÃO (<i>G</i>) PARA <i>ANKISTRODESMUS STRIPTATUS</i> EXPOSTA À CYN E AO PFOA INDIVIDUALMENTE EM CULTURA MISTA EM CENÁRIO SEM PREDOMINÂNCIA.....	57
TABELA 5.5: VALORES CALCULADOS PARA A TAXA DE CRESCIMENTO (<i>M</i>), TAXA DE DIVISÃO POR DIA (<i>K</i>) E TAXA DE DUPLICAÇÃO (<i>G</i>) PARA <i>MONORAPHIDIUM CAPRICORNUTUM</i> EXPOSTA À CYN E AO PFOA INDIVIDUALMENTE EM CULTURA MISTA COM PREDOMINÂNCIA DE <i>MONORAPHIDIUM CAPRICORNUTUM</i>	59
TABELA 5.6: VALORES CALCULADOS PARA A TAXA DE CRESCIMENTO (<i>M</i>), TAXA DE DIVISÃO POR DIA (<i>K</i>) E TAXA DE DUPLICAÇÃO (<i>G</i>) PARA <i>ANKISTRODESMUS STRIPTATUS</i> EXPOSTA À CYN E AO PFOA INDIVIDUALMENTE EM CULTURA MISTA EM CENÁRIO COM PREDOMINÂNCIA DE <i>MONORAPHIDIUM CAPRICORNUTUM</i>	59
TABELA 5.7: VALORES CALCULADOS PARA A TAXA DE CRESCIMENTO (<i>M</i>), TAXA DE DIVISÃO POR DIA (<i>K</i>) E TAXA DE DUPLICAÇÃO (<i>G</i>) PARA <i>MONORAPHIDIUM CAPRICORNUTUM</i> EXPOSTA À CYN E AO PFOA INDIVIDUALMENTE EM CULTURA MISTA COM PREDOMINÂNCIA DE <i>ANKISTRODESMUS STRIPTATUS</i>	61
TABELA 5.8: VALORES CALCULADOS PARA A TAXA DE CRESCIMENTO (<i>M</i>), TAXA DE DIVISÃO POR DIA (<i>K</i>) E TAXA DE DUPLICAÇÃO (<i>G</i>) PARA <i>ANKISTRODESMUS STRIPTATUS</i> EXPOSTA À CYN E AO PFOA INDIVIDUALMENTE EM CULTURA MISTA EM CENÁRIO COM PREDOMINÂNCIA DE <i>ANKISTRODESMUS STRIPTATUS</i>	61
TABELA 5.9: MATRIZ DE VERIFICAÇÃO PARA COMPARAR DIFERENÇAS ESTATISTICAMENTE SIGNIFICATIVAS EM RELAÇÃO AO GRUPO CONTROLE PARA CADA TRATAMENTO ADOTADO EM DIFERENTES CENÁRIOS.	62

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 3.1: EXEMPLOS DE POLUIÇÃO DO AMBIENTE AQUÁTICO (FONTE: PRÓPRIO AUTOR).....	5
FIGURA 3.2: REPRESENTAÇÃO CONCEITUAL, ILUSTRANDO OS PROCESSOS AMBIENTAIS QUE CONTROLAM A PROLIFERAÇÃO DE CIANOBACTÉRIAS, INCLUINDO AÇÕES DE MANEJO FEITAS PELO HOMEM E IMPACTOS DAS MUDANÇAS CLIMÁTICAS (ADAPTADO - PAERL, HALL E CALANDRINO, 2011).....	8
FIGURA 3.3: DIFERENTES VARIANTES DE CILINDROSPERMOPSINAS: (1) CILINDROSPERMOPSINA; (2) 7-EPI-CILINDROSPERMOPSINA; (3) 7-DESOXI-CILINDROSPERMOPSINA; (4) 7-DESOXI-DESULFO-CILINDROSPERMOPSINA E (5) 7-DESOXI-DESULFO-12-ACETILCILINDROSPERMOPSINA (ADAPTADO DE WIMMER E COLS, 2014).....	13
FIGURA 3.4: ESQUEMAS DAS PROPRIEDADES ECOCINÉTICAS DE UMA SUBSTÂNCIA QUÍMICA - O RETÂNGULO EXTERNO REPRESENTA O AMBIENTE. (ADAPTADO - MCKINNEY, 1981; FERNICOLA, BOHRER-MOREL E BAINY, 2003)	17
FIGURA 3.5: LOCAIS ONDE OS COMPOSTOS PFAS PODEM SER ENCONTRADOS (FONTE: PRÓPRIO AUTOR).....	20
FIGURA 3.6: ESTRUTURA QUÍMICA DO ÁCIDO PERFLUOROOCTANOICO (PFOA).....	22
FIGURA 3.7: REAÇÃO EM CADEIA DESENCADEADA POR POLUENTES, ATINGINDO ATÉ OS NÍVEIS MAIS COMPLEXOS DA NATUREZA (ADAPTADO - GUARATINI ET AL, 2008).....	27
FIGURA 4.1: FLUXOGRAMA METODOLÓGICO DA PESQUISA.....	35
FIGURA 4.2: CULTURA DE <i>MONORAPHIDIUM CAPRICORNUTUM</i> (A), CULTURA DE <i>ANKISTRODESMUS STRIPTATUS</i> (B), AMPLIAÇÃO 40X (MICROSCOPIA ÓPTICA).....	36
FIGURA 4.3: REPRESENTAÇÃO DA CÂMARA DE NEUBAUER UTILIZADA NA CONTAGEM DE CÉLULAS.....	41
FIGURA 4.4: ESQUEMA DO ENSAIO DA SUPERÓXIDO DISMUTASE (ADAPTADO - KIT DE ENSAIO, CAYMAN CHEMICAL)	45
FIGURA 5.1: DENSIDADE CELULAR (A) E INIBIÇÃO DE CRESCIMENTO (B) DE <i>MONORAPHIDIUM CAPRICORNUTUM</i> EXPOSTAS AOS TRATAMENTOS: PFOA-AC (2000 MG.L ⁻¹); PFOA-BC (1000 MG.L ⁻¹); CYN-AC (100 MG.L ⁻¹) E CYN-BC (50 MG.L ⁻¹), INDIVIDUALMENTE, DURANTE 12 DIAS. OS VALORES REPRESENTAM MÉDIA ± ERRO PADRÃO (NÚMERO AMOSTRAL IGUAL A 3)	50
FIGURA 5.2: DENSIDADE CELULAR (A) E INIBIÇÃO NO CRESCIMENTO (B) DE <i>MONORAPHIDIUM CAPRICORNUTUM</i> QUANDO EXPOSTAS À MISTURA DE PFOA E CYN: (1) CYN-AC (100 MG.L ⁻¹) + PFOA-BC (1000 µG/); (2) CYN-BC (50 MG.L ⁻¹) + PFOA-AC (2000 MG.L ⁻¹); E (3) CYN-AC (100 MG.L ⁻¹) + PFOA-AC (2000 MG.L ⁻¹). OS VALORES REPRESENTAM MÉDIA ± ERRO PADRÃO (NÚMERO AMOSTRAL IGUAL A 3)	53
FIGURA 5.3: DENSIDADE CELULAR DE CULTURA MISTA (<i>MONORAPHIDIUM CAPRICORNUTUM</i> (M) E <i>ANKISTRODESMUS STRIPTATUS</i> (A)) EM CENÁRIO SEM PREDOMINÂNCIA EXPOSTAS AOS TRATAMENTOS: CYN-AC (100 MG.L ⁻¹); CYN-BC (50 MG.L ⁻¹) - FIGURA (A); PFOA-AC (2000 MG.L ⁻¹) E PFOA-BC (1000 MG.L ⁻¹) - FIGURA (B), INDIVIDUALMENTE, DURANTE 12 DIAS. OS VALORES REPRESENTAM MÉDIA ± ERRO PADRÃO (NÚMERO AMOSTRAL IGUAL A 3)	55
FIGURA 5.4: INIBIÇÃO DE CRESCIMENTO DE CULTURA MISTA (<i>MONORAPHIDIUM CAPRICORNUTUM</i> E <i>ANKISTRODESMUS STRIPTATUS</i>) EM CENÁRIO SEM PREDOMINÂNCIA EXPOSTAS AOS TRATAMENTOS: CYN-AC (100 MG.L ⁻¹); CYN-BC (50 MG.L ⁻¹); PFOA-AC (2000 MG.L ⁻¹) E PFOA-BC (1000 MG.L ⁻¹), INDIVIDUALMENTE, DURANTE 12 DIAS. FIGURA (A): INIBIÇÃO DE CRESCIMENTO DE <i>A. STRIPTATUS</i> ; FIGURA (B) INIBIÇÃO DE CRESCIMENTO DE <i>M. CAPRICORNUTUM</i> . OS VALORES REPRESENTAM MÉDIA ± ERRO PADRÃO (NÚMERO AMOSTRAL IGUAL A 3)	56
FIGURA 5.5: DENSIDADE CELULAR DE CULTURA MISTA (<i>MONORAPHIDIUM CAPRICORNUTUM</i> (M) E <i>ANKISTRODESMUS STRIPTATUS</i> (A)) EM CENÁRIO COM PREDOMINÂNCIA DE <i>M. CAPRICORNUTUM</i> EXPOSTAS AOS TRATAMENTOS: CYN-AC (100 MG.L ⁻¹); CYN-BC (50 MG.L ⁻¹) - FIGURA (A); PFOA-AC (2000 MG.L ⁻¹) E PFOA-BC (1000 MG.L ⁻¹) - FIGURA (B), INDIVIDUALMENTE, DURANTE 12 DIAS. OS VALORES REPRESENTAM MÉDIA ± ERRO PADRÃO (NÚMERO AMOSTRAL IGUAL A 3)	58
FIGURA 5.6: INIBIÇÃO DE CRESCIMENTO DE CULTURA MISTA (<i>MONORAPHIDIUM CAPRICORNUTUM</i> E <i>ANKISTRODESMUS STRIPTATUS</i>) EM CENÁRIO DE PREDOMINÂNCIA DE <i>M. CAPRICORNUTUM</i> EXPOSTAS AOS TRATAMENTOS: CYN-AC (100 MG.L ⁻¹); CYN-BC (50 MG.L ⁻¹); PFOA-AC (2000 MG.L ⁻¹) E PFOA-BC (1000 MG.L ⁻¹), INDIVIDUALMENTE, DURANTE 12 DIAS. FIGURA (A): INIBIÇÃO DE CRESCIMENTO DE <i>A. STRIPTATUS</i> ; FIGURA (B) INIBIÇÃO DE CRESCIMENTO DE <i>M. CAPRICORNUTUM</i> . OS VALORES REPRESENTAM MÉDIA ± ERRO PADRÃO (NÚMERO AMOSTRAL IGUAL A 3)	58
FIGURA 5.7: DENSIDADE CELULAR DE CULTURA MISTA (<i>MONORAPHIDIUM CAPRICORNUTUM</i> (M) E <i>ANKISTRODESMUS STRIPTATUS</i> (A)) EM CENÁRIO COM PREDOMINÂNCIA DE <i>A. STRIPTATUS</i> EXPOSTAS AOS TRATAMENTOS: CYN-AC (100 MG.L ⁻¹); CYN-BC (50 MG.L ⁻¹) - FIGURA (A); PFOA-AC (2000 MG.L ⁻¹) E PFOA-BC (1000 MG.L ⁻¹) - FIGURA (B),	

INDIVIDUALMENTE, DURANTE 12 DIAS. OS VALORES REPRESENTAM MÉDIA \pm ERRO PADRÃO (NÚMERO AMOSTRAL IGUAL A 3).....	60
FIGURA 5.8: INIBIÇÃO DE CRESCIMENTO DE CULTURA MISTA (<i>MONORAPHIDIUM CAPRICORNUTUM</i> E <i>ANKISTRODESMUS STRIPTATUS</i>) EM CENÁRIO DE PREDOMINÂNCIA DE <i>A. STRIPTATUS</i> EXPOSTAS AOS TRATAMENTOS: CYN-AC (100 MG.L ⁻¹); CYN-BC (50 MG.L ⁻¹); PFOA-AC (2000 MG.L ⁻¹) E PFOA-BC (1000 MG.L ⁻¹), INDIVIDUALMENTE, DURANTE 12 DIAS. FIGURA (A): INIBIÇÃO DE CRESCIMENTO DE <i>A. STRIPTATUS</i> ; FIGURA (B) INIBIÇÃO DE CRESCIMENTO DE <i>M. CAPRICORNUTUM</i> . OS VALORES REPRESENTAM MÉDIA \pm ERRO PADRÃO (NÚMERO AMOSTRAL IGUAL A 3).	60
FIGURA 5.9: CONCENTRAÇÃO DE GLUTATIONA (À ESQUERDA) E ATIVIDADE DE GLUTATIONA S-TRANSFERASE (À DIREITA) EM CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS: (1) CONTROLE; (2) EXPOSIÇÃO INDIVIDUAL DE PFOA E CYN (PFOA-AC: 2000 MG.L ⁻¹ ; PFOA-BC: 1000 MG.L ⁻¹ ; CYN-AC: 100 MG.L ⁻¹ ; CYN-BC: 50 MG.L ⁻¹ ; E (3) EXPOSIÇÃO DE MISTURA BINÁRIA DE PFOA E CYN (I) CYN-AC: 100 MG.L ⁻¹ + PFOA-BC: 1000 MG.L ⁻¹ ; (II) CYN-BC: 50 MG.L ⁻¹ + PFOA-AC: 2000 MG.L ⁻¹ (III) CYN-AC: 100 MG.L ⁻¹ + PFOA-AC: 2000 MG.L ⁻¹). AS LETRAS DIFERENTES INDICAM DIFERENÇA SIGNIFICATIVA (P<0,05). OS VALORES REPRESENTAM MÉDIA \pm ERRO PADRÃO (N=3).....	66
FIGURA 5.10: ATIVIDADE DE SUPERÓXIDO DISMUTASE (À ESQUERDA) E ATIVIDADE DE CATALASE (À DIREITA) EM CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS: (1) CONTROLE; (2) EXPOSIÇÃO INDIVIDUAL DE PFOA E CYN (PFOA-AC: 2000 MG.L ⁻¹ ; PFOA-BC: 1000 MG.L ⁻¹ ; CYN-AC: 100 MG.L ⁻¹ ; CYN-BC: 50 MG.L ⁻¹ ; E (3) EXPOSIÇÃO DE MISTURA BINÁRIA DE PFOA E CYN (I) CYN-AC: 100 MG.L ⁻¹ + PFOA-BC: 1000 MG.L ⁻¹ ; (II) CYN-BC: 50 MG.L ⁻¹ + PFOA-AC: 2000 MG.L ⁻¹ (III) CYN-AC: 100 MG.L ⁻¹ + PFOA-AC: 2000 MG.L ⁻¹). OS VALORES REPRESENTAM MÉDIA \pm ERRO PADRÃO (N=3). NÃO HOUVE DIFERENÇA SIGNIFICATIVA ENTRE OS TRATAMENTOS (P>0,05).....	68
FIGURA 5.11: CONCENTRAÇÃO DE MALONDIALDEÍDO (À ESQUERDA) CARBONILAÇÃO DE PROTEÍNAS (À DIREITA) EM CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS: (1) CONTROLE; (2) EXPOSIÇÃO INDIVIDUAL DE PFOA E CYN (PFOA-AC: 2000 MG.L ⁻¹ ; PFOA-BC: 1000 MG.L ⁻¹ ; CYN-AC: 100 MG.L ⁻¹ ; CYN-BC: 50 MG.L ⁻¹ ; E (3) EXPOSIÇÃO DE MISTURA BINÁRIA DE PFOA E CYN (I) CYN-AC: 100 MG.L ⁻¹ + PFOA-BC: 1000 MG.L ⁻¹ ; (II) CYN-BC: 50 MG.L ⁻¹ + PFOA-AC: 2000 MG.L ⁻¹ (III) CYN-AC: 100 MG.L ⁻¹ + PFOA-AC: 2000 MG.L ⁻¹). AS LETRAS DIFERENTES INDICAM DIFERENÇA SIGNIFICATIVA (P<0,05). OS VALORES REPRESENTAM MÉDIA \pm ERRO PADRÃO (N=3).....	70

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CDNB	1-cloro-2,4-dinitrobenzeno
DNPH	2,4-dinitrofenilhidrazina
AChE	Acetilcolinesterase
GenX	Ácido Dímero de Óxido de Hexafluoropropileno
HFPO-DA	Ácido Dímero de Óxido de Hexafluoropropileno
HFPO-TA	Ácido Trímero de Óxido de Hexafluoropropileno
PFOA	Ácido Perfluorooctanóico
PFOS	Ácido Perfluorooctanessulfônico ou Sulfonato de Perfluorooctano
TCA	Ácido Tricloroacético
ATP	Adenosina Trifosfato
US-EPA	Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos
ECHA	Agência Europeia das Substâncias Químicas
H ₂ O	Água
ANOVA	Análise de Variância
CAOT	Capacidade Antioxidante Total
C	Carbono
CAT	Catalase
GST	Glutationa-S-transferase
CE ₅₀	Concentração Efetiva
CL ₅₀	Concentração Letal capaz de matar 50% dos organismos testados
CONAMA	Conselho Nacional do Meio Ambiente
CO ₂	Dióxido de carbono
ETE	Estação de Tratamento de Esgoto
EUA	Estados Unidos da América
P	Fósforo
PT	Fósforo Total
Fiocruz	Fundação Oswaldo Cruz
GPX	Glutationa Peroxidase
GSH	Glutationa Reduzida
H	Hidrogênio
IBCCF	Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho

LAPSA	Laboratório de Avaliação e Promoção da Saúde Ambiental
LETC	Laboratório de Ecofisiologia e Toxicologia de Cianobactérias
LSA	Laboratório de Saneamento Ambiental
MDA	Malondialdeído
CH ₄	Metano
MCs	Microcistinas
EtFOSA	N-etil perfluorooctano sulfonamida
N	Nitrogênio
NT	Nitrogênio Total
OECD	Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico
O	Oxigênio
O ₂	Oxigênio Dissolvido
IPCC	Painel Intergovernamental sobre Mudanças Climáticas
PFOSA	Perfluorobutano Sulfonamida
PFOS	Perfluorobutano Sulfonato
POPs	Poluentes Orgânicos Persistentes
UNEP	Programa Ambiental das Nações Unidas
PTC	Proteínas Carboniladas
PFAS	Substâncias per e polifluoroalquil
SOD	Superóxido Dismutase
UE	União Europeia
UnB	Universidade de Brasília
UFRJ	Universidade Federal do Rio de Janeiro

LISTA DE SÍMBOLOS

ε	Absortividade molar
AC	Alta concentração
BC	Baixa concentração
b	Caminho ótico
ρ	Coeficiente de pearson
c	Concentração da amostra
cm	Centímetros
ΔA	Diferença da amostra
$\mu g L^{-1}$	Micrograma por litro
$ng L^{-1}$	Nanograma por litro
ppm	Parte por milhão
pg/L	Picograma por litro
pH	Potencial de hidrogênio
Pv	Pressão de vapor
rpm	Rotações por minuto
s	Segundos
$\mu M L^{-1}$	Micromolar
$mM L^{-1}$	Milimolar
$nM L^{-1}$	Nanomolar
μS	Microsiemens
nm	Nanômetros

1. INTRODUÇÃO

O crescimento populacional exerce uma pressão significativa sobre o uso da água, tanto em termos de quantidade quanto de qualidade. À medida que a população aumenta, a demanda por água para diversas finalidades também cresce, e isso pode contribuir para a degradação da qualidade da água devido ao aumento da poluição através de descargas de esgoto, agricultura intensiva, efluentes industriais e comerciais, entre outros (Pandey, 2006 e Sodré, 2012).

Atualmente, há fortes evidências que indicam que o crescimento das atividades humanas está provocando um aumento nas temperaturas globais, em decorrência do desmatamento e da emissão de gases de efeito estufa. Além disso, a ação antropogênica intensifica entrada de nutrientes nos ecossistemas aquáticos (Paerl e Huisman, 2009; Paerl e Paul, 2012). Essas mudanças criam condições favoráveis ao crescimento de cianobactérias, levando à formação de florações. Algumas dessas cianobactérias produzem toxinas, como a cylindrospermopsina, que contaminam a água e representam riscos significativos para a saúde pública e para o equilíbrio dos ecossistemas aquáticos (Buratti *et al.*, 2017).

As cianobactérias, sendo definidas como microrganismos procariontes fotossintetizantes que habitam predominantemente ecossistemas aquáticos, produzem uma grande quantidade de moléculas bioativas, incluindo cianotoxinas. Apesar do conhecimento ainda incompleto sobre o mecanismo específico de toxicidade de cada cianotoxina, os quais podem envolver múltiplos modos de ação, sabe-se que elas têm efeitos amplos, potentes e também genotóxicos em diversos tecidos e células (Humpage e Fastner, 2021).

Paralelamente, o avanço da industrialização gera grandes quantidades de efluentes que contêm diversos contaminantes xenobióticos, liberados no meio ambiente e provocando impactos significativos na biosfera. Os poluentes orgânicos persistentes (POPs) são um exemplo desse tipo de contaminante, constituindo um grupo de substâncias químicas tóxicas que apresentam alta resistência à degradação por processos químicos, biológicos ou fotolíticos convencionais. Devido à sua estrutura química estável, os POPs tendem a se acumular no ambiente e também a se dispersar através do vento e da água, contribuindo para problemas ambientais em escala global (Guo *et al.*, 2024). Esses dois fatores – as cianobactérias produtoras de toxinas e a persistência de poluentes orgânicos – convergem para agravar a contaminação dos ecossistemas aquáticos. De um modo geral,

microcontaminantes são nocivos à saúde humana e ao meio ambiente, podendo causar toxicidade crônica, desregulação endócrina e bioacumulação (Barry *et al.*, 2013). Esses compostos podem afetar a atividade enzimática intracelular, interferir em vias de sinalização celular e até provocar apoptose (Huang e Zimba, 2019). Dada a gravidade desses impactos, a identificação e o monitoramento contínuo dessas substâncias, especialmente em corpos d'água que recebem efluentes, são essenciais para a proteção ambiental.

Nesse contexto, o biomonitoramento desempenha um papel fundamental, pois utiliza bioindicadores para a avaliação e acompanhamento da qualidade ambiental. A análise de organismos em diferentes níveis tróficos é essencial, uma vez que cada espécie apresenta respostas específicas aos contaminantes presentes no ambiente. Entre os exemplos de organismos empregados no biomonitoramento aquático estão as bactérias, microalgas, oligoquetas, poliquetas, crustáceos, equinoides e peixes, abrangendo diferentes ecossistemas e níveis tróficos (Magalhães e Ferrão-Filho, 2008; Hong *et al.*, 2015; Miranda, 2021).

As microalgas, como produtores primários essenciais nos ecossistemas aquáticos, possuem rápido crescimento, alta adaptabilidade e relação superfície-volume elevada. Essas características as tornam bioindicadores eficazes da qualidade da água (Devi *et al.*, 2023; Ma *et al.*, 2022). Por serem frequentemente as primeiras a responder à poluição, refletem rapidamente mudanças nos níveis de contaminação (McCormick e Cairns, 1994; Niu *et al.*, 2019). Além disso, sua potencial capacidade de bioacumulação afeta diretamente a cadeia alimentar, transferindo potenciais contaminantes para os níveis tróficos superiores (Ma *et al.*, 2022). Assim, o estudo das microalgas é fundamental para entender os impactos da poluição ambiental.

Muitas pesquisas têm avaliado os efeitos individuais dos microcontaminantes (Moraes *et al.*, 2022; Wang *et al.*, 2020; Zhao *et al.*, 2015). No entanto, ainda há lacunas no entendimento dos impactos desses compostos sobre os organismos aquáticos, especialmente os produtores primários. Essa incerteza se agrava quando a exposição envolve duas ou mais substâncias tóxicas, pois os efeitos interativos da co-ocorrência (sinérgicos, aditivos e/ou antagônicos) ainda são pouco compreendidos (Pinheiro, 2016; Hu, 2020). Devido à escassez de pesquisas na área, existe uma necessidade de se investigar mais detalhadamente esses compostos e suas interações, a fim de compreender as características e o modo de ação desses poluidores em sistemas biológicos expostos.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos ecotoxicológicos do ácido perfluorooctanoico (PFOA) e da cilindrospermopsina (CYN - cianotoxina) em diferentes concentrações, bem como sua mistura, através das respostas de crescimento, competição e biomarcadores de estresse oxidativo e danos celulares em microalgas.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o efeito de PFOA e CYN, individualmente, no crescimento e competição de *Monoraphidium capricornutum* e *Ankistrodesmus striptatus* em cultura mista.
- Avaliar o crescimento de *Monoraphidium capricornutum* expostas ao PFOA e CYN individualmente e sua mistura binária.
- Investigar as respostas bioquímicas relacionadas ao dano oxidativo causado por PFOA e CYN individualmente e em mistura binária em *Monoraphidium capricornutum*.

3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA E REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Neste capítulo, são abordados conceitos relacionados à poluição aquática, atribuindo maior destaque à eutrofização e à poluição química, abordando os fatores que influenciam nas florações de cianobactérias e bioacumulação de microcontaminantes. A primeira parte deste capítulo também aborda as cianotoxinas produzidas nas florações, além dos impactos e implicações devido à coocorrência das cianobactérias e contaminantes de preocupação emergente, como as substâncias per- e polifluoroalquil (PFAS), com uma atenção especial ao ácido perfluorooctanoico (PFOA). Na segunda parte, aspectos relacionados à ecotoxicologia são abordados, tal como biomonitores, biomarcadores e a importância da compreensão de como os contaminantes afetam diversos organismos em diferentes níveis.

3.1 POLUIÇÃO DOS CORPOS D'ÁGUA

O aumento da população e das atividades humanas com potencial impacto ambiental nas últimas décadas tem provocado grandes impactos nos corpos hídricos. A preocupação com a qualidade e quantidade de água é crescente, especialmente em regiões densamente povoadas onde a escassez de água é cada vez mais comum, prejudicando não apenas a saúde pública, mas também causando impactos profundos nos ecossistemas aquáticos (Pandey, 2006 e Sodré, 2012).

A interferência antrópica é capaz de introduzir no ambiente uma série de compostos de diferentes características que não existiam no ambiente natural ou que já estavam presentes, mas em pequenas concentrações (Sodré, 2012). Essa introdução resulta em poluição com diferentes origens (Figura 3.1), afetando de forma significativa os processos abióticos e bióticos (Carapeto, 1999).

Embora a descarga crescente de resíduos nos corpos d'água seja uma preocupação, a quantidade de poluente não é o único fator determinante do dano ambiental. A poluição ocorre quando substâncias ou agentes alteram a qualidade ambiental, podendo ser percebida por mudanças no ecossistema. A contaminação refere-se à presença dessas substâncias, independentemente de impactos perceptíveis. As principais fontes de poluição das águas superficiais são os esgotos domésticos, efluentes industriais, descargas agrícolas, mineração e resíduos de indústrias químicas, usinas de combustíveis fósseis e usinas nucleares, e também os resíduos sólidos (que geram, por exemplo, os microplásticos). Esses poluentes

podem comprometer a qualidade da água, representando riscos ao consumo humano, à agricultura e à vida aquática (Pandey, 2006; Sodré, 2012; Greaver *et al.*, 2016).

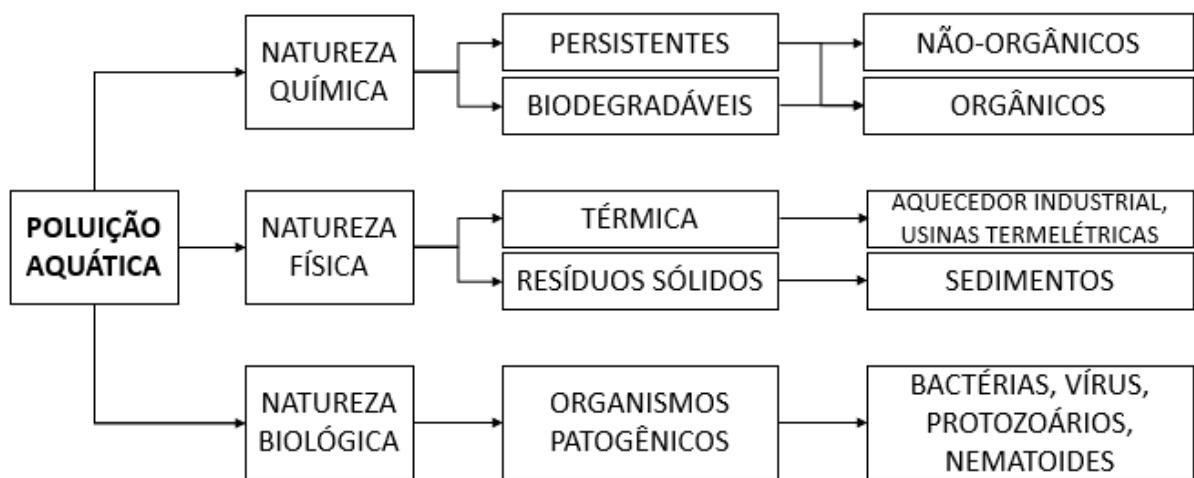


Figura 3.1: Exemplos de poluição do ambiente aquático (Fonte: próprio autor).

As mudanças nas características do meio físico têm o potencial de gerar diferentes impactos sobre a biota aquática, podendo favorecer algumas espécies em detrimenos de outras, levando a desequilíbrios ecológicos de processos interdependentes entre várias espécies bióticas. Dessa forma, é necessário saber qual a intensidade da poluição, e se o corpo d'água receptor terá a capacidade de assimilá-la sem consequências deletérias à sua fauna e flora ou aos seres que dele dependem (Sodré, 2012).

3.1.1 Eutrofização e Cianobactérias

Os eventos de precipitação pluvial em áreas agrícolas podem causar escoamento superficial de água carregada com partículas de solo, nutrientes e poluentes, especialmente quando práticas agrícolas inadequadas provocam erosão. Esse escoamento contribui para o assoreamento de rios e lagos e pode prejudicar a biota aquática, elevando a turbidez da água e reduzindo a zona eufótica, além de introduzir nutrientes e substâncias tóxicas nesses corpos d'água, conforme destacado por Berreta e Letelier (2021) e Sodré (2012). Essas consequências destacam a importância das mudanças no uso da terra nas bacias hidrográficas, onde uma cobertura vegetal adequada pode reduzir a erosão e limitar a exportação de fósforo para águas doces, ajudando a mitigar esses impactos negativos (Beretta e Letelier, 2021; Sodré, 2012).

Os lagos tropicais geralmente apresentam processos de estratificação e desestratificação da massa d'água que são diferentes daqueles de regiões temperadas, como resultado da variação

diurna na temperatura da superfície da água e dos ventos que causam a mistura da coluna d'água. Dessa maneira, estratificação pode ocorrer de maneira sazonal ou diária, dependendo das condições climáticas locais (Berg e Sutula, 2015). Quando ocorrem mudanças na temperatura, oxigenação ou na qualidade da água, os nutrientes depositados nos sedimentos e poluentes presentes na região bentônica podem ser ressuspensos para a coluna d'água, ficando disponíveis novamente para serem utilizados nos processos metabólicos (Berg e Sutula, 2015; Paerl e Huisman, 2008).

Esse fenômeno de ressuspensão corrobora para o processo de eutrofização, que ocorre quando há excesso de nutrientes, como fósforo e nitrogênio, provenientes de esgoto, fertilizantes e atividades industriais. Esse excesso de nutrientes pode elevar a produtividade primária e, sob condições favoráveis como temperatura, pH e tempo de residência da água, pode desencadear a proliferação excessiva de cianobactérias, resultando nas chamadas florações (Berg e Sutula, 2015)

Uma série de problemas ambientais podem ser desencadeados pelas florações de cianobactérias, como a redução da transparência da água, diminuição da biodiversidade, além de afetar negativamente a qualidade da água para usos recreativos, turísticos e até mesmo para o consumo humano. Além disso, a decomposição desses organismos pode esgotar o oxigênio da água, criando zonas anóxicas que levam à morte de peixes e outros organismos aeróbios, conforme apontam Dalu e Wasserman (2018).

Essas cianobactérias são microrganismos procariontes fotossintetizantes que habitam ecossistemas aquáticos e surgiram há cerca de 2,5 bilhões de anos, iniciando a oxigenação da atmosfera. Elas são encontradas tanto em ecossistemas marinhos quanto em água doce e são importantes como produtoras primárias (Tiffany, 1958; Bartram *et al.*, 1999). Adaptadas para se proteger da radiação ultravioleta, elas sobrevivem bem em ambientes com alta exposição solar. Muitas também ocupam o solo e outros habitats terrestres, desempenhando papéis importantes na ciclagem de nutrientes e na fertilidade do solo e da água (Rai, 1990; Whitton, 1992; Mur, Skulberg e Utkilen, 1999; Dalu e Wasserman, 2018).

Presentes nos ecossistemas devido ao seu sucesso ecológico e competitividade, as cianobactérias podem proliferar em condições favoráveis, como temperaturas acima de 25°C, pH neutro a levemente básico, exposição prolongada ao sol e abundância de compostos nitrogenados e fosfatados (Ribeiro, 2007). Essa proliferação pode prejudicar a qualidade da água e o equilíbrio dos ecossistemas, uma vez que as cianobactérias podem

produzir substâncias tóxicas (cianotoxinas) de diferentes classes químicas, cada uma com efeitos tóxicos variados que representam um risco para a saúde ambiental e humana (Wimmer e Cols, 2014).

As florações de cianobactérias podem ser utilizadas também como um dos indicadores de impactos negativos da eutrofização. Considerando as interconexões entre atividades humanas e qualidade da água, é fundamental tratar esgotos, reduzir o uso de fertilizantes e adotar uma gestão integrada dos recursos hídricos para prevenir e controlar a eutrofização (Bartram *et al.*, 1999; Mur, Skulberg e Utkilen, 1999; Dalu e Wasserman, 2018; Amorim, 2021).

Ações de controle e vigilância são fundamentais para garantir a qualidade das águas, principalmente de mananciais utilizados para abastecimento humano e áreas de proteção da vida aquática. Como as cianotoxinas representam um risco para a saúde ambiental e humana, devido aos seus potentes efeitos tóxicos, há legislações ambientais que estabelecem o monitoramento e os níveis máximos aceitáveis dessas substâncias. O monitoramento da densidade de cianobactérias nos corpos receptores de efluentes no Brasil é estabelecido através da resolução Conama 357/2005, que estabelece o limite de 20.000 cél/mL em águas doces de Classe I; 50.000 cél/mL em águas doces de Classe II e 100.000 cél/mL em águas doces de Classe III (Brasil, 2005).

3.1.1.1 Fatores determinantes das florações de cianobactérias em ambientes lênticos

As comunidades fitoplanctônicas consistem em espécies pertencentes a diversos grupos taxonômicos de microorganismos fotossinteticamente ativos (Ibelings *et al.*, 2021). A biomassa das cianobactérias aumenta com a eutrofização. A ocorrência de florações tem correlação com o nitrogênio total (NT) e fósforo total (PT) em lagos, rios e águas costeiras, sendo o fósforo geralmente o fator limitante. Em muitos ecossistemas aquáticos, sua disponibilidade é naturalmente baixa, o que faz dele o principal nutriente disparador de florações (Downing, Watson e McCauley, 2001).

O crescimento das espécies de cianobactérias é influenciado por condições que favorecem ou não o seu crescimento. A Figura 3.2 é uma representação dos processos que controlam as florações de cianobactérias, alguns dos fatores que influenciam sua ocorrência são: disponibilidade de nutrientes (Berg e Sutula, 2015; Ibelings *et al.*, 2021); irradiação solar e transparência da água (Paerl *et al.*, 1985); temperatura (Paerl e Huisman, 2008); pH

(Huisman *et al*, 2018); salinidade (Amorim, 2021; Tonk *et al.*, 2007); estratificação da coluna d'água e tempo de residência (Paerl e Huisman 2008; Berg e Sutula, 2015). Em ambientes onde a água está estratificada e possui um maior tempo de residência, há condições ideais para o desenvolvimento de cianobactérias, especialmente quando outros fatores contribuem para esse processo (Berg e Sutula, 2015; Amorim, 2021).

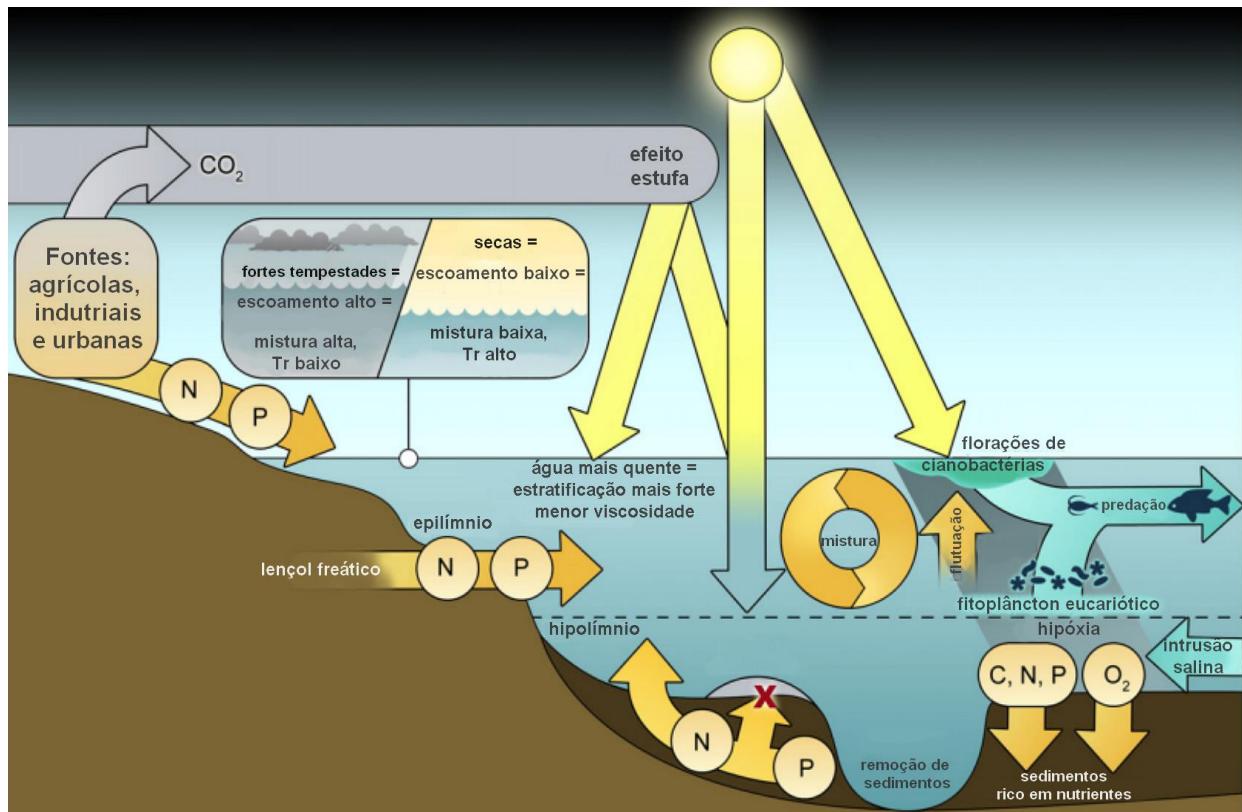


Figura 3.2: Representação conceitual, ilustrando os processos ambientais que controlam a proliferação de cianobactérias, incluindo ações de manejo feitas pelo homem e impactos das mudanças climáticas (Adaptado - Paerl, Hall e Calandrino, 2011).

3.1.1.2 Mudanças climáticas e florações de cianobactérias

Segundo o Painel Intergovernamental sobre Mudanças Climáticas (do inglês *Intergovernmental Panel on Climate Change*, IPCC), está bem estabelecido que o aumento da temperatura média da Terra e mudanças nos padrões hidrológicos são causadas pela interferência humana. Em seu mais recente relatório, o IPCC (2023) apresenta que alguns impactos climáticos já são tão graves que não é mais possível revertê-los, gerando perdas e danos. Os eventos extremos ligados às mudanças do clima, como as ondas de calor e enchentes, causam impactos sem precedentes. Além disso, os seres humanos e o meio

ambiente estão sendo pressionados além de sua capacidade atual de adaptação, segundo o IPCC (2023).

Esse impacto também pode ser observado nas cianobactérias. A frequência, intensidade e duração das florações de cianobactérias são influenciadas pelo aporte de nutrientes de fontes antropogênicas e pela mudança do clima (Berg e Sutula, 2015). As relações entre o aumento dos níveis atmosféricos de CO₂, o aquecimento da temperatura média global e o declínio da qualidade da água são controladas através de interações complexas como a evaporação e as mudanças nos padrões de precipitação (Amorim, 2021). Essa mudança altera os fluxos hidrológicos e os processos biogeoquímicos, onde as interações acontecem de forma não linear (Paerl e Paulo, 2012; Visser *et al.*, 2016).

Os serviços ecossistêmicos são os processos e funções naturais dos ecossistemas que sustentam a vida e beneficiam a sociedade, como a regulação do clima, a purificação da água, o ciclo de nutrientes, a polinização e a manutenção da biodiversidade. Esses serviços podem ser impactados por distúrbios de pulso (eventos de curto prazo) ou de pressão (distúrbios duradouros/contínuos), que afetam os fatores abióticos e bióticos (Brasell *et al.*, 2021; Zhao *et al.*, 2022). As diferenças hidrológicas entre rios, represas e lagos têm implicações significativas nas concentrações de nutrientes e acesso à luz, e consequentemente, no crescimento de cianobactérias.

Nas últimas décadas, as mudanças climáticas desencadearam alterações nos ecossistemas, levando a problemas como o aumento na temperatura média, poluição da água e perda de biodiversidade, regional e globalmente (Greaver *et al.*, 2016; Zhang *et al.*, 2020; Zhao *et al.*, 2022). O aumento das concentrações de dióxido de carbono (CO₂) na atmosfera, têm implicações diretas nos ambientes aquáticos, tornando-os mais ácidos. Os ecossistemas de água doce são especialmente vulneráveis a essas mudanças e estão entre os mais ameaçados da Terra (Yousefi, Jouladeh-Roudbar e Kafash, 2020).

O aquecimento global e as mudanças nos padrões de evaporação podem intensificar os processos metabólicos nos sistemas aquáticos. Esses processos incluem reações químicas e biológicas fundamentais para o equilíbrio desses ecossistemas, como a decomposição de matéria orgânica e os ciclos de nutrientes (Amorim, 2021; Visser *et al.*, 2016). Com temperaturas mais altas e maior evaporação, a disponibilidade de nutrientes aumenta, criando condições favoráveis para o crescimento de cianobactérias nocivas em ambientes aquáticos eutróficos (Visser *et al.*, 2016; Lima, 2021). Além disso, as mudanças no uso da

terra podem alterar a prevalência de cianotoxinas no futuro. No entanto, ainda não está completamente estabelecido como o aumento do aporte de nutrientes afetará a frequência e a intensidade das florações de cianobactérias produtoras de cianotoxinas (Berg e Sutula, 2015).

O aporte de nutrientes em corpos d'água, como o fósforo e nitrogênio, provavelmente, se tornarão mais frequentes devido às mudanças climáticas e à expansão urbana. O aumento da temperatura da água pode levar à liberação de fósforo dos sedimentos (Kosten *et al.*, 2011, Zhao *et al.*, 2022). Esse fato somado à redução do volume de água disponível, ocasionada pelo aumento da evaporação, pode favorecer a proliferação de algas e, como consequência, a perda de macrófitas em muitos lagos rasos (Visser *et al.* 2016; Lima, 2021).

Além dos efeitos da temperatura e da eutrofização, Visser *et al.* (2016) analisaram, em seu estudo de revisão, os efeitos das mudanças climáticas, especificamente das concentrações de CO₂, nas florações de cianobactérias nocivas. O estudo aborda o esgotamento de CO₂ dissolvido por densas florações de cianobactérias, o que cria um gradiente de concentração através da interface ar-água. Dessa forma, com o aumento das concentrações atmosféricas de CO₂, ocorre um maior fluxo de CO₂ para o ambiente aquático, o qual pode ser interceptado pelas florações que habitam a superfície, intensificando a proliferação de cianobactérias em ambientes eutróficos.

O aumento de CO₂ atmosférico gera uma maior dissolução de CO₂ na água, causando uma acidificação gradual dos oceanos (Orr *et al.*, 2005; Doney *et al.*, 2009, Visser *et al.*, 2016). Nos ecossistemas de água doce, o impacto desse aumento parece ser mais complexo, pois os sistemas de água doce variam amplamente em pH e alcalinidade (Lazzarino *et al.*, 2009; Balmer e Downing, 2011).

A decomposição das microalgas pode gerar impactos na cadeia planctônica. O aumento na condutividade elétrica, bem como em uma rápida queda nas concentrações de oxigênio e no pH pode resultar em uma alta taxa de liberação de nutrientes, CO₂ e CH₄, que favorece o crescimento de futuras florações após a decomposição conforme descrito por Yan *et al.* (2017) e Amorim (2021). Esse cenário gera dois círculos viciosos: (1) a liberação de nutrientes aumenta a eutrofização dos lagos e promove novas florações; (2) a decomposição potencializa a liberação CO₂ e CH₄, contribuindo para o aquecimento global, que é outro fator importante que influencia o desenvolvimento das florações (Yan *et al.*, 2017; Amorim, 2021).

Um exemplo conhecido de cianobactéria que prolifera em florações é a *Raphidiopsis raciborskii*, uma espécie altamente competitiva. Sua dominância está associada ao aumento da temperatura global (Dörr, 2015). Durante um estudo de dois anos no reservatório no nordeste do Brasil, a *Raphidiopsis raciborskii* dominou o fitoplâncton após a seca causada pelo evento de El Niño em 1997. Isso afetou significativamente a biomassa de carbono orgânico e as comunidades bacterianas, que aumentaram após a floração (Bouvy *et al.*, 2001).

Apesar dos diversos estudos desenvolvidos, ainda existem grandes lacunas em nossa compreensão dos impactos potenciais das mudanças climáticas nos ecossistemas de água doce e seus organismos (Harrod, 2015; Yousefi, Jouladeh-Roudbar e Kafash, 2020). Diante disso, Amorim (2021) aponta que medidas de mitigação precisam ser adotadas para melhorar a conservação dos recursos hídricos e eficiência do tratamento de água, garantindo uma maior oferta e segurança de água para abastecimento público.

3.1.1.3 Produção e liberação de cianotoxinas

O fitoplâncton representa um componente fundamental nos ecossistemas de água doce, atuando como regulador de processos ecológicos e indicador de saúde dos ecossistemas. As florações de cianobactérias não são fenômenos restritos a mananciais de abastecimento, podendo ocorrer em lagoas de estabilização de estações de tratamento de esgoto, um ambiente hipereutrófico, que sob certas condições climáticas e operacionais favorecem as florações (Ribeiro, 2007). Durante essas florações, as cianobactérias podem produzir uma gama de metabólitos secundários, incluindo cianotoxinas e outras substâncias que causam gosto e odor indesejados na água (Cybis *et al.*, 2006).

O crescimento abundante de cianobactérias em reservatórios de água cria sérios problemas práticos para abastecimento de água, tornando as toxinas de cianobactérias uma preocupação para a saúde humana. No Brasil, a “Tragédia de Caruaru”, em 1996, ficou mundialmente conhecida por causar a morte por intoxicação de aproximadamente 60 pacientes renais após uma sessão de hemodiálise no interior de Pernambuco (Soares, 2009; Jochimsen *et al.*, 1998). A água contaminada utilizada no tratamento dialítico era fornecida pela companhia de saneamento do estado por meio de caminhões-pipa que coletavam água diretamente de açudes com florações de cianobactérias. A água era tratada inadequadamente, e após investigações epidemiológicas, foi constatado a contaminação por microcistina (MCs) e cilindrospermopsina (CYN), liberadas após a lise celular das

cianobactérias (Azevedo *et al.*, 2002; Soares, 2009). Este caso repercutiu em vários ambientes: epidemiológico, clínico, policial, jurídico, social, político, e nos meios de comunicação, e incentivou a comunidade científica brasileira e mundial no estudo dos riscos e impactos das cianotoxinas no meio ambiente e na saúde humana.

À medida que as temperaturas globais aumentam, diversas espécies de cianobactérias estão ampliando sua distribuição geográfica e se tornando presentes em áreas anteriormente não afetadas. Isso é notável, por exemplo, em casos como as espécies *Raphidiopsis* (*Cylindrospermopsis*) *raciborskii* e *Microcystis aeruginosa*, que estão se tornando mais amplamente distribuídas mundialmente (Amorim, 2021; Lopez *et al.* 2008; Lehman *et al.*, 2005).

O aumento das cianobactérias é uma preocupação global, pois a concentração de cianotoxinas aumenta com a densidade dessas cianobactérias (Silva, 2009). A temperatura ótima de crescimento varia entre as espécies de fitoplâncton, o que deve ser considerado ao analisar a comunidade fitoplanctônica (Lurling *et al.*, 2013) No entanto, associar diretamente a proliferação de cianobactérias à eutrofização limita a compreensão dos riscos de toxinas. A toxicidade depende da composição taxonômica do fitoplâncton (Ibelings *et al.*, 2021).

A liberação de cianotoxinas, por secreção ou através da lise celular devido às condições ambientais, pode afetar a biota aquática, animais terrestres e os humanos. A ingestão de água contaminada com cianotoxinas na água de abastecimento ou de forma accidental durante a recreação é um risco para a saúde humana. As cianotoxinas compõem várias classes, com diferentes mecanismos de ação e características próprias. Essas são principalmente categorizadas de acordo com sua capacidade de afetar tecidos ou órgãos específicos (Humpage e Fastner, 2021; Silva, 2009).

As cianotoxinas mais frequentemente detectadas, como as microcistinas, nodularinas, cilindrospermopsina e saxitoxinas, podem ser classificadas de acordo com seu mecanismo de ação. Elas incluem: (i) hepatotóxicas, como as microcistinas e nodularinas; (ii) neurotóxicas, que englobam a anatoxina-a, homoanatoxina-a, anatoxina-a(s) e o grupo das saxitoxinas; (iii) citotóxicas, como a cilindrospermopsina; e (iv) dermatotóxicas, que são as toxinas lipopolissacarídicas presentes em várias espécies de cianobactérias (Buratti *et al.*, 2017; Bortoli e Pinto, 2015).

Uma das toxinas comuns que podem ser produzidas nas florações de cianobactérias é a cilindrospermopsina. As variantes da cilindrospermopsina podem ter estruturas químicas e atividades biológicas que, embora sejam semelhantes (Figura 3.3), podem exercer diferentes efeitos nos organismos expostos. Isso varia conforme a forma como essas variantes impactam a síntese proteica e outras funções celulares essenciais. Por exemplo, algumas variantes podem interferir na produção de proteínas vitais, comprometendo a saúde celular e levando a efeitos adversos em organismos aquáticos, como peixes e invertebrados (Wimmer *et al.*, 2014).

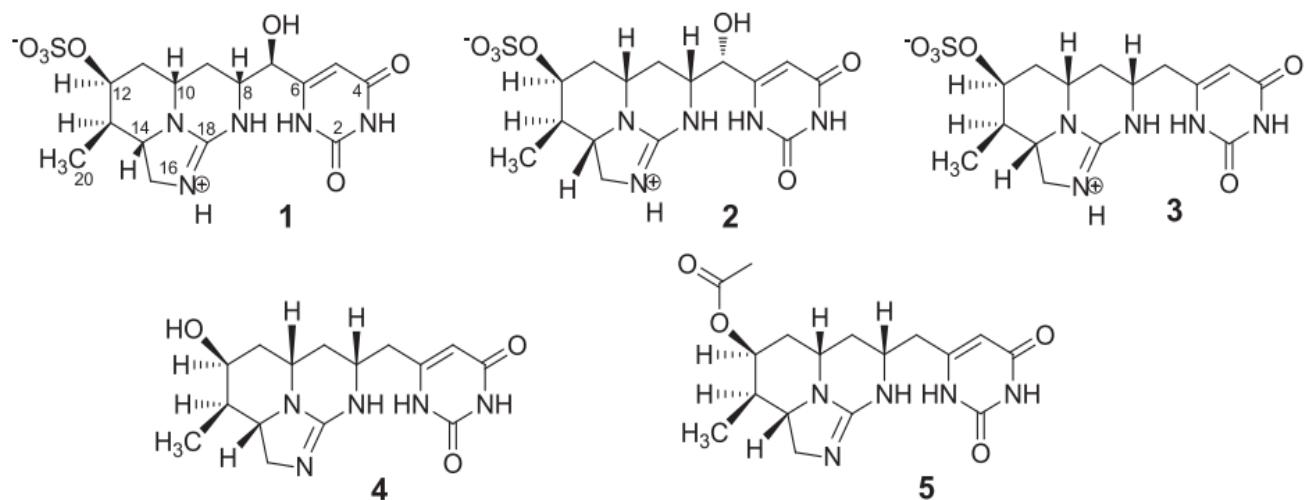


Figura 3.3: Diferentes variantes de cilindrospermopsinas: (1) cilindrospermopsina; (2) 7-epi-cilindrospermopsina; (3) 7-desoxi-cilindrospermopsina; (4) 7-desoxi-desulfo-cilindrospermopsina e (5) 7-desoxi-desulfo-12-acetilcilindrospermopsina (Adaptado de Wimmer e Cols, 2014).

A *Raphidiopsis raciborskii*, que é potencialmente produtora de cilindrospermopsina, é altamente competitiva, e sua dominância está associada ao aumento da temperatura global. Além disso, vários fatores favorecem a dominância dessa espécie em diversos ecossistemas, como sua habilidade de migração, alta taxa de assimilação do amônio, grande afinidade e capacidade de armazenamento de fósforo, resistência à predação pelo zooplâncton, baixo requerimento por luz e capacidade de fixar nitrogênio da atmosfera (Dörr, 2015). A presença de toxinas produzidas por cianobactérias como *R. raciborskii*, representa um perigo tanto para a população quanto para a vida aquática (Santos *et al.*, 2021).

Estudos comprovam a capacidade de cilindrospermopsina de causar impactos, por exemplo, na reprodução de mamíferos, tendo a habilidade de penetrar na parede intestinal e se disseminar pela circulação sistêmica podendo alcançar órgãos periféricos como os ovários (Young *et al.*, 2008). Essa cianotoxina depende de sistemas de transporte facilitado para serem absorvidas no intestino e captadas por diversos tipos de células, como os hepatócitos.

Estudos conduzidos por Young *et al.* (2012) demonstraram que a CYN é uma forte inibidora da síntese proteica, mesmo antes do surgimento de sinais de morte celular.

Essa cianotoxina afeta diversos organismos aquáticos e mamíferos. Em peixes-zebra (*Danio rerio*), concentrações de CYN variando de 0 a 2000 $\mu\text{g.L}^{-1}$ resultam em redução na sobrevivência, taxa de eclosão, crescimento e desenvolvimento dos embriões, além de causar anormalidades como edema pericárdico e deformidades (Wang *et al.*, 2020; Berry *et al.*, 2009; Moraes *et al.*, 2022), com os efeitos observados sendo proporcionais às concentrações. A CYN também afeta a fertilidade masculina em peixes-zebra, com concentrações de 250 a 1000 $\mu\text{g.L}^{-1}$ resultando em redução das células germinativas e alterações nos níveis de testosterona (Moraes *et al.*, 2021).

Há evidências de que as cianotoxinas se bioacumulam facilmente em diferentes cadeias tróficas (Dittmann e Wiegand, 2006). Estudos conduzidos por Saker e Eaglesham (1999) indicaram que o lagostim (*Cherax quadricarinatus*) não metaboliza CYN, semelhante ao observado em mexilhões expostos a outra toxina de cianobactéria (Eriksson *et al.*, 1989). Isso levanta preocupações sobre os potenciais efeitos adversos a longo prazo da acumulação de cilindrospermopsina nos organismos aquáticos após exposição prolongada a florações de *R. raciborskii* (Saker e Eaglesham, 1999).

Em estudos com microalgas como *Chorella vulgaris*, a CYN demonstrou ser mais tóxica do que a microcistina-LR (MC-LR), com a toxicidade sendo aumentada pela combinação das duas, onde concentrações de MC-LR entre 0,4 a 16,7 mg/L intensificaram o efeito da CYN (Pinheiro *et al.*, 2016). Em mamíferos, a CYN é conhecida por causar danos ao fígado, rins, trato gastrointestinal e outros órgãos (citotóxica), podendo alterar a produção hormonal, induzir apoptose e causar genotoxicidade (Buratti *et al.*, 2017). Estudos indicam que a CYN apresenta uma ação tóxica de efeito lento, com a mortalidade podendo ocorrer em até 7 dias. A dose letal para 50% dos animais expostos (DL_{50}) da toxina para camundongos, administrada por via oral, é de aproximadamente 6 mg/kg, de acordo com Seawright *et al.* (1999), resultando em mortalidade após 5 dias. Pela via intraperitoneal, os autores determinaram uma DL_{50} de 0,18 mg CYNeq/kg de peso corporal.

Embora tenham ocorrido avanços nos estudos sobre a cilindrospermopsina (CYN), ainda existem lacunas consideráveis no conhecimento de seus efeitos a longo prazo em diversas espécies e nas suas interações com outros poluentes. É essencial o desenvolvimento de mais estudos para aprofundar a compreensão sobre o impacto da CYN nos ecossistemas e suas

combinações com outras substâncias. Portanto, é necessário implementar um monitoramento mais detalhado dos ecossistemas aquáticos. A qualidade da água deve ser avaliada em múltiplos pontos ao longo do corpo d'água, e a saúde da biota aquática deve ser constantemente monitorada. É essencial estabelecer um plano de manejo para controlar o crescimento de cianobactérias e monitorar vários níveis da cadeia, como fitoplâncton, zooplâncton e peixes, garantindo assim a saúde e a sustentabilidade dos ecossistemas aquáticos a longo prazo (Santos *et al.*, 2021).

3.1.1.4 Monitoramento e aspectos regulatórios de cilindrospermopsis

A Resolução nº 430, de 14 de maio de 2011, do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA), estabelece condições e padrões para o lançamento de efluentes em corpos d'água, incluindo limites para uma série de parâmetros físicos, químicos e biológicos, visando à proteção dos recursos hídricos e da saúde pública (BRASIL, 2011). Os artigos 17 e 18 dessa resolução permitem que o órgão ambiental competente defina padrões específicos para o parâmetro fósforo em casos de lançamento de efluentes em corpos receptores que tenham histórico de floração de cianobactérias, especialmente em trechos onde ocorre captação para abastecimento público. Além disso, determinam que os efluentes não devem causar ou ter potencial para causar efeitos tóxicos aos organismos aquáticos, conforme critérios de ecotoxicidade estabelecidos pelo órgão competente.

Embora a Resolução CONAMA 430/2011 regule o lançamento de efluentes, ela não aborda especificamente a presença de cianotoxinas nesses efluentes. Em contrapartida, a regulamentação da Resolução CONAMA 357/2005 estabelece diferentes condições e padrões para cada classe de água em relação à densidade de cianobactérias. Para águas doces de classe 1, a densidade de cianobactérias não deve exceder 20.000 cél/mL. As águas doces de classe 2 e classe 3, destinadas à dessedentação de animais, a densidade de cianobactérias não deve exceder 50.000 cél/mL.

Enquanto a Resolução CONAMA 357/2005 se concentra na qualidade da água dos corpos hídricos, a Resolução CONAMA 430/2011 foca no controle de efluentes lançados, sem abordar as cianotoxinas especificamente. Essa distinção evidencia uma lacuna na regulamentação do controle de cianotoxinas em efluentes tratados que possam ser lançados em corpos d'água, contribuindo para a eutrofização e proliferação de cianobactérias.

É necessário implementar medidas especiais para remover toxinas da água durante as florações de cianobactérias em sistemas de abastecimento público, devido aos graves riscos à saúde humana. Dada a gravidade dos impactos, surge a necessidade de compreender e coletar informações relevantes sobre cianobactérias e cianotoxinas. Essa compreensão é fundamental para várias áreas, incluindo ecologia, toxicologia, ecotoxicologia aquática, saúde pública e saneamento ambiental (Albuquerque *et al.*, 2023).

3.1.2 Microcontaminantes

Os microcontaminantes são substâncias químicas presentes no ambiente, geralmente, em concentrações baixas, na ordem de microgramas por litro ($\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$), nanogramas por litro ($\text{ng} \cdot \text{L}^{-1}$) ou partícula por litro (part/L). Estes contaminantes incluem uma ampla variedade de compostos orgânicos e inorgânicos, como pesticidas (Viana *et al.*, 2023), fármacos (Castillo *et al.*, 2024), microplásticos (Nguyen *et al.*, 2023), metais e metaloides (Reyes-Marquez *et al.*, 2024), e poluentes orgânicos persistentes (Liu *et al.*, 2023), e geralmente são originados de fontes antropogênicas.

Uma grande variedade de microcontaminantes tem chamado a atenção da comunidade científica por seus impactos, e possíveis impactos, na saúde humana e no meio ambiente, mesmo em baixas concentrações. Essas substâncias, naturais ou sintéticas, possuem o potencial de causar efeitos adversos na saúde dos organismos e na integridade ecológica (Shi *et al.*, 2024; Nguyen *et al.*, 2023; Wang *et al.*, 2023).

Dentro desse contexto, os contaminantes de preocupação emergente apresentam riscos aos ecossistemas aquáticos, e ainda, esses não estão incluídos nos programas de monitoramento. Visto isso, esses são candidatos a uma futura regulamentação dependendo dos resultados obtidos em estudos de ecotoxicidade, efeitos à saúde humana, potencial de bioacumulação, transporte e destino nos diferentes compartimentos ambientais, além da quantidade de lançamento e, por consequência, da concentração no ambiente (Montagner, Vidal e Acayaba, 2017).

Essas substâncias podem permanecer na natureza devido à sua alta estabilidade e, mesmo em pequenas quantidades, têm seu efeito aumentado através da transferência e bioacumulação na teia alimentar. Não existe um mecanismo único que possa simular a ação dos contaminantes e sua interação com outros microrganismos ou compostos, uma vez que

as pesquisas relacionadas às interações ambientais são insuficientes (Fernicola, Bohrer-Morel e Bainy, 2003; Landrigan *et al.* 2003).

3.1.2.1 Dispersão, bioacumulação e degradação de microcontaminantes

3.1.2.1.1 Dispersão Ambiental

Um composto introduzido no ambiente em determinadas concentrações pode ser transportado ou transformado conforme sua distribuição nos compartimentos ambientais (Figura 3.4), ou seja, pode se mover entre a atmosfera, litosfera, hidrosfera e biosfera. Essa distribuição afeta a disponibilidade da substância química para diferentes organismos (Fernicola, Bohrer-Morel e Bainy, 2003).

Os contaminantes podem volatilizar da água para o ar, dissolver-se de volta na água, ou entrar na água a partir do solo por dessorção. Da mesma forma, contaminantes na água podem adsorver-se no solo, e contaminantes no solo podem volatilizar, dependendo da pressão de vapor (P_v) e da afinidade com as partículas do solo (Fernicola, Bohrer-Morel e Bainy, 2003; Montagner, Vidal e Acayaba, 2017).

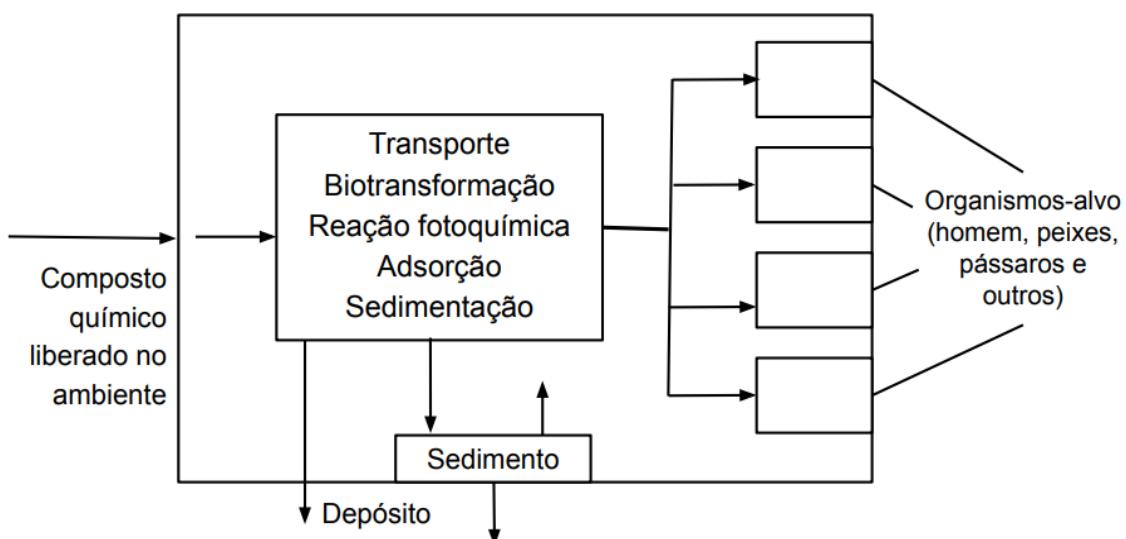


Figura 3.4: Esquemas das propriedades ecocinéticas de uma substância química - o retângulo externo representa o ambiente. (Adaptado - McKinney, 1981; Fernicola, Bohrer-Morel e Bainy, 2003)

3.1.2.1.2 Bioacumulação

A bioacumulação é o processo pelo qual os contaminantes presentes no meio externo são transferidos e se acumulam no organismo em concentrações maiores do que as encontradas no meio, podendo ocorrer através de diferentes rotas, incluindo água, solo e sedimento. No

entanto, a principal via de bioacumulação em organismos aquáticos é a dietética, e o processo depende de fatores ambientais e fisiológicos. Vários fatores influenciam a bioacumulação, como ecologia alimentar, características fisiológicas e bioquímica das espécies, bem como a composição quali-quantitativa de compostos químicos no ambiente (Fernicola, Bohrer-Morel e Bainy, 2003).

Diferentes modelos biológicos, incluindo algas, plantas, poliquetas, minhocas, crustáceos, bivalves, gastrópodes, caranguejos, estrelas-do-mar e peixes são utilizados para descrever e prever o grau de bioacumulação, que são avaliados de maneiras distintas, dependendo do organismo e do xenobiótico de interesse (Hong *et al.*, 2015). Os organismos terrestres podem ser expostos a pesticidas no solo ou xenobióticos lançados em locais de despejo, sendo as plantas, e possivelmente alguns animais, capazes de captar substâncias químicas de mais de um compartimento (Fernicola, Bohrer-Morel e Bainy, 2003).

Nos ecossistemas aquáticos, a bioacumulação de xenobióticos pode ser particularmente problemática, uma vez que alguns desses compostos são insolúveis em água e tendem a se acumular nos tecidos gordurosos de peixes e outros organismos aquáticos. Embora existam diferentes mecanismos de bioacumulação, a maior relevância em relação aos xenobióticos é a partição dos compostos lipofílicos nos tecidos lipídicos dos organismos, especialmente nos peixes e outras espécies aquáticas. Isso ocorre porque a exposição aos xenobióticos no ambiente aquático pode ser mais intensa, favorecendo uma absorção mais eficiente de compostos químicos potencialmente bioacumulativos (Fernicola, Bohrer-Morel e Bainy, 2003; Miranda *et al.*, 2021).

3.1.2.1.3 Biodegradação

A biotransformação ou biodegradação de um composto se refere à sua eliminação do ambiente devido a alguma mudança em sua estrutura química, que pode ocorrer tanto no ambiente quanto dentro dos organismos, resultando na eliminação ou na transformação do composto original em produtos menos tóxicos ou mais facilmente degradáveis (Fernicola, Bohrer-Morel e Bainy, 2003).

A degradação biótica depende da composição química do produto e de fatores ambientais como a temperatura, pH, potencial redox, concentração de contaminante, concentração e espécies de microrganismos viáveis, tempo de adaptação, nutrientes e teor de água (Pedrozo e Kuno, 2008). Alguns compostos podem ser mineralizados, liberando moléculas

inorgânicas mais simples, como dióxido de carbono (CO_2), metano (CH_4) e água (H_2O), o que é considerado biodegradação completa (Fernicola, Bohrer-Morel e Bainy, 2003).

Os processos de degradação abiótica dos xenobióticos podem ser divididos em quatro categorias: (1) hidrólise: alteração da estrutura química por reação direta com água; (2) oxidação: a modificação química envolve uma transferência de elétrons do xenobiótico para um oxidante; (3) redução: a modificação química envolve transferência de elétrons de um agente redutor para o xenobiótico; e (4) degradação fotoquímica: a quebra da molécula de xenobiótico ocorre através da absorção de radiação eletromagnética, como a luz, resultando em novos compostos que apresentam propriedades diferentes dos seus precursores (Pedrozo e Kuno, 2008).

Em ambientes anaeróbios, a degradação microbiana é geralmente mais lenta e nem sempre resulta na mineralização completa das substâncias químicas. Em certos casos, a biodegradação pode ser um processo tão lento que leve à bioacumulação do xenobiótico, causando comprometimento da saúde dos organismos de toda a cadeia alimentar (Fernicola, Bohrer-Morel e Bainy, 2003). Em contraste, o processo metabólico mais eficiente para a degradação de substâncias químicas é a biodegradação aeróbia, que geralmente resulta em degradação mais rápida.

Os contaminantes ambientais são frequentemente descartados no meio ambiente. Esse descarte impróprio afeta o meio biótico e abiótico, provocando desequilíbrio ecológico, a depender da sua toxicidade. Devido à sua estabilidade, alguns desses compostos são altamente resistentes à degradação (como exemplo, PFAS, plásticos e alguns pesticidas) e, consequentemente, se acumulam na cadeia alimentar. Dessa forma, eles podem ser transportados a grandes distâncias a partir do local onde foram originalmente utilizados, alcançando regiões que nunca foram expostas. Como resultado, a preocupação com o risco de contaminação desses ambientes para a saúde humana e para o ecossistema tem aumentado continuamente.

3.1.2.2 Compostos per- e polifluoroalquilados

Os compostos per- e polifluoroalquilados (PFAS) são uma grande classe de substâncias químicas sintéticas caracterizadas por suas fortes ligações carbono-flúor, que os tornam altamente estáveis e resistentes à degradação no meio ambiente e nos organismos (Galloway

et al., 2020). Por essa persistência, são frequentemente chamados de "produtos químicos eternos".

Esses compostos são amplamente utilizados devido às suas características únicas. A ligação carbono-flúor confere-lhes estabilidade e baixa reatividade, tornando-os ideais para aplicações comerciais que exigem repelência a água, óleo e sujeira, além de resistência ao calor e produtos químicos (Ford *et al.*, 2024).

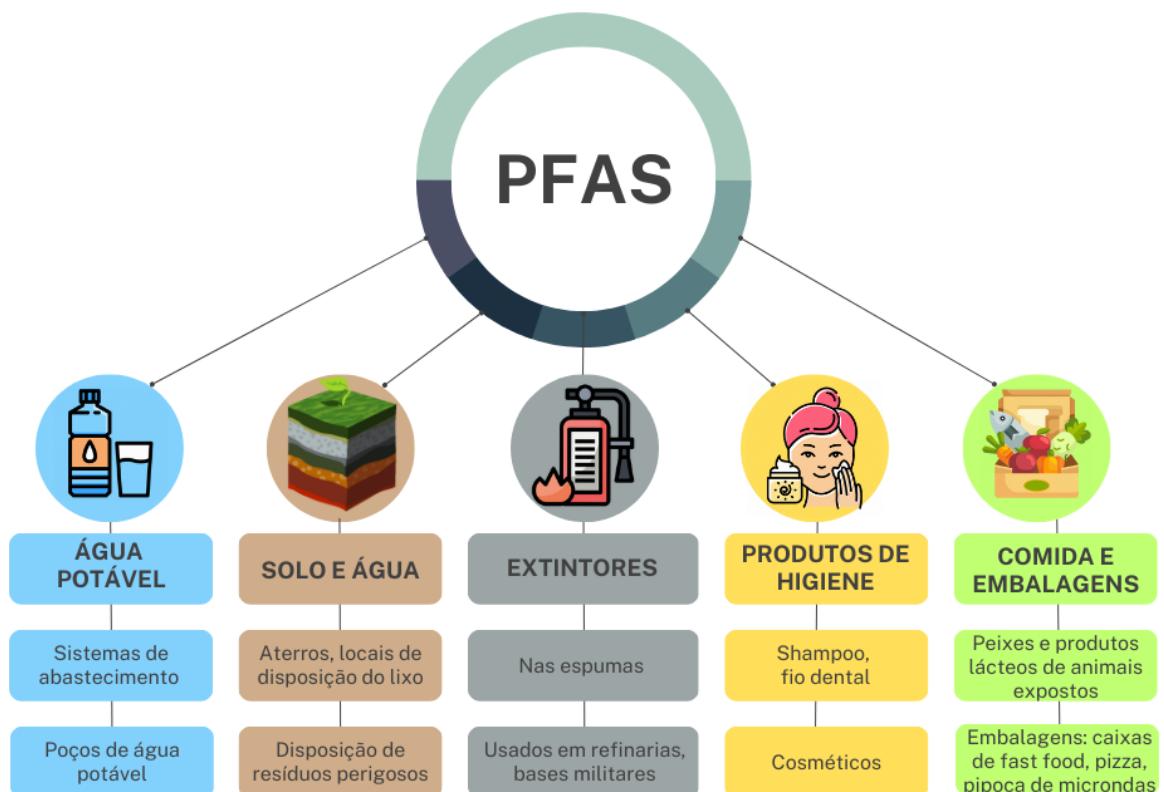


Figura 3.5: Locais onde os compostos PFAS podem ser encontrados (Fonte: próprio autor).

Por essas razões, os PFAS são encontrados em diversos produtos e indústrias, como surfactantes, impermeabilizantes, espumas para combate a incêndios, embalagens alimentícias, produtos de limpeza e antiaderentes (Figura 3.5). Contudo, sua decomposição é extremamente lenta, o que contribui para sua persistência ambiental. Essa durabilidade resulta na detecção desses compostos no sangue de pessoas e animais em várias partes do mundo, onde podem se acumular nos tecidos vivos (Galloway *et al.*, 2020; US-EPA, 2022).

Os PFAS estão presentes em diversos ambientes, incluindo água, solo, ar, alimentos e materiais em residências e locais de trabalho (US-EPA, 2022; Wendee, 2013). No mesmo ambiente, os PFAS de cadeia curta ($C \leq 7$) são mais comumente encontrados em amostras de águas superficiais, sendo mais propensos a se deslocarem em ambientes aquáticos em

comparação aos PFAS de cadeia longa ($C \geq 8$), que possuem mais átomos de carbono em sua estrutura química. Esses compostos de cadeia longa tendem a ser detectados com maior frequência em sedimentos e organismos aquáticos, como peixes (Goodrow *et al.*, 2020; Brown *et al.*, 2023; McFarlan e Lemke, 2024).

No entanto, a distribuição de contaminantes variam ao longo do tempo e do espaço, e são interações complexas e poucos compreendidas (Brown *et al.*, 2023). A previsão do comportamento dos PFAS no ambiente aquático é complexa, devido à dinâmica envolvidas no meio aquático, às condições biogeoquímicas e às prováveis variações sazonais nas concentrações de PFAS (McFarlan e Lemke, 2024).

Segundo a Agência de Proteção Ambiental dos EUA, o ácido perfluorooctanoico (PFOA) e o sulfonato de perfluorooctano (PFOS), por exemplo, são dois dos produtos químicos mais amplamente utilizados e estudados no grupo PFAS. Muitos estudos mostraram que o PFOA-C8 é o PFASs de cadeia longa (Figura 3.6) mais comum (átomos de carbono ≥ 7) no ambiente (Olsen *et al.*, 2007; Benskin *et al.*, 2012; Miranda, 2021; Liu *et al.*, 2023). Essa substância tem uma meia-vida longa e uma ampla gama de riscos à saúde (Haimbaugh *et al.*, 2022). Os Ácidos Dímero de Óxido de Hexafluoropropileno (HFPO-DA) e Ácido Trímero de Óxido de Hexafluoropropileno (HFPO-TA) são alternativas ao PFOA. No entanto, poucas informações sobre a comparação de suas toxicidades estão disponíveis (Wang *et al.*, 2023).

O PFOA é encontrado no sangue de cerca de 98% dos americanos (Calafat, 2007). O estudo realizado pelo C8 Science Panel PFOA aponta que a exposição ao PFOA estava associada a seis condições: câncer renal, câncer testicular, colite ulcerativa, doença da tireoide, hipercolesterolemia e hipertensão induzida pela gravidez. O estudo encontrou uma associação positiva entre os níveis estimados de PFOA e o câncer de tireoide, mas não houve uma tendência dose-resposta consistente e a associação não foi estatisticamente significativa. O câncer de tireoide era de interesse porque o C8 Science Panel havia concluído anteriormente que existe uma “ligação provável” entre o PFOA e doenças não cancerosas da tireoide, como hipo e hipertireoidismo, que afetam o metabolismo.

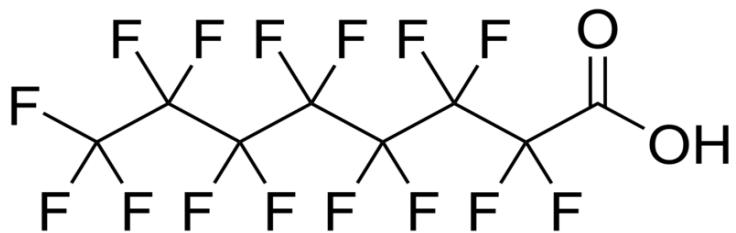


Figura 3.6: Estrutura química do ácido perfluorooctanoico (PFOA)

Apesar de a fabricação do PFOA estar sendo gradualmente eliminada, sua composição química o torna efetivamente indestrutível por processos ambientais, fazendo com que permaneça presente na água (Liu *et al.*, 2023). Essa é uma característica comum de preocupação dos PFAS, uma vez que eles se decompõem lentamente e podem se acumular em pessoas, animais e no meio ambiente ao longo do tempo (Miranda, 2021; US-EPA, 2022).

Miranda *et al.* (2021) avaliaram a bioacumulação de PFAS em diferentes grupos de organismos, incluindo bivalves (*Crassostrea rhizophorae*, *Mytella guyanensis*, *Anomalocardia brasiliiana*), crustáceos (*Callinectes sapidus*, *Ucides cordatus*, *Litopenaeus sp.*, *Goniopsis cruentata*), poliquetas (pool de espécies) e peixes (*Mugil sp.*, *Genyatremus luteus*, *Eucinostomus sp.*, *Cathorops spixii*, *Centropomus parallelus*, *Caranx sp.*, *Aspistor luniscutis*, *Centropomus undecimalis*, *Ctenosciaena gracilicirrhus*), destacando a influência de fatores físicos, químicos, biológicos e espaciais nesse processo. O estudo, realizado no estuário do Subaé, localizado na Baía de Todos os Santos, Bahia, Brasil, revelou que PFOS, PFNA e EtFOSA são bioacumulativos na cadeia alimentar marinha. No entanto, a bioacumulação de EtFOSA deve ser interpretada com cautela devido à sua baixa detecção nos organismos analisados. O estudo concluiu que a presença de PFAS em ambientes marinhos é preocupante, considerando o potencial de exposição humana por meio do consumo desses organismos (Miranda *et al.*, 2021).

Os mecanismos tóxicos dos poluentes orgânicos persistentes (POPs) em microalgas e cianobactérias são diversos e incluem danos oxidativos, interrupção do ciclo celular, indução de apoptose e inibição da fotossíntese. No entanto, os estudos de toxicologia aquática, especialmente aqueles focados nos produtores primários, ainda são limitados em relação aos efeitos dos POPs (Lu *et al.*, 2021).

Haimbaugh *et al.* (2022) conduziu um estudo que apontou efeitos multigeracionais da exposição ao PFOA no comportamento do peixe-zebra, assim como os efeitos da exposição

a uma mistura de PFOA e PFOS na expressão gênica e comportamento. Além disso, pela primeira vez, o estudo documentou os efeitos transgeracionais de PFOA, PFOS e de uma mistura em proporção 1:1 desses compostos em termos de transcriptômica e comportamento. Os resultados indicaram que baixas concentrações de PFAS continuaram a afetar gerações subsequentes mesmo após a interrupção da exposição, sugerindo efeitos em gerações não diretamente expostas a essas concentrações. Esses contaminantes estão presentes em diversos ambientes e se acumulam ao longo da cadeia alimentar, eventualmente chegando ao corpo humano e sendo associados a vários tipos de câncer (Galloway *et al.*, 2020; Wendee, 2013).

O PFOA e o ácido perfluoro-octanossulfônico (PFOS) foram substituídos nos Estados Unidos por outros PFAS nos últimos anos (US-EPA, 2022). Em razão disso, a demanda por dados de toxicidade aumentou devido à crescente atenção à segurança dos substitutos de cadeia curta. Um estudo realizado por Wang *et al.* (2023) demonstrou que a exposição ao PFOA, HFPO-DA e HFPO-TA, nas concentrações de 5 e 500 µg/L, aumentou as frequências cardíacas e inibiu a atividade locomotora em embriões de peixe-zebra (*Danio rerio*) durante um período de 120 horas de exposição. Além disso, a exposição alterou a atividade de enzimas relacionadas ao estresse oxidativo (SOD, CAT e GPx) e à acetilcolinesterase (AChE), assim como o conteúdo de ATP e a expressão de genes associados ao eixo hipotálamo-hipófise-tireoide (HPT), apoptose e metabolismo lipídico. Os resultados indicaram que HFPO-DA e HFPO-TA podem não ser alternativas seguras ao PFOA devido aos seus efeitos específicos em mecanismos neurodesenvolvimentais e metabólicos. Estudos recentes vêm demonstrando potenciais tóxicos de compostos de cadeia curta semelhantes aos compostos de cadeia longa (Miranda, 2021).

Existem milhares de produtos químicos PFAS, e eles são encontrados em diversos produtos de consumo, comerciais e industriais. Isso torna desafiador avaliar os riscos potenciais à saúde humana e ao meio ambiente. Para uma melhor compreensão dos riscos apresentados pelos PFAS e para tomar ações eficientes de proteção da saúde humana e do meio ambiente, é necessário informações mais robustas a respeito desses produtos químicos. Uma vez que a toxicidade dos produtos químicos varia à medida em que cada substância se altera, em diferentes concentrações e/ou com diferentes misturas (Miranda, 2021; US-EPA, 2022).

3.1.2.3 Monitoramento, aspectos regulatórios de microcontaminantes e panorama geral dos PFAS

Na Convenção de Estocolmo, adotada em 2001, os países signatários concordaram em reduzir ou eliminar a produção, o uso e a liberação de compostos organoclorados, com o objetivo de proteger a saúde humana e o meio ambiente dos efeitos adversos de produtos químicos persistentes, bioacumuláveis e tóxicos. A lista desses compostos é atualizada à medida que novos poluentes orgânicos persistentes (POPs) são avaliados e classificados. Desde a implementação da convenção em 2001, os países têm se empenhado em diminuir as concentrações desses poluentes no ambiente, principalmente através da eliminação e controle das fontes de poluição (UNEP, 2019; Miranda, 2021).

Em 2009, alguns PFAS foram incluídos na lista de produtos da Convenção de Estocolmo com restrições na comercialização, produção e uso, e mais recentemente, em 2018, o PFOA foi adicionado à lista de produtos proibidos (UNEP, 2019). Contudo, mesmo com o Brasil sendo um signatário da Convenção de Estocolmo desde 2001, os dados de importação e exportação indicam que houve um aumento na utilização de PFAS no país (Miranda, 2021).

Diversos Estados-Membros da União Europeia (UE) apresentaram novas propostas de restrição para ácidos carboxílicos perfluorados, conhecidos como PFAS. Essas propostas foram endossadas pelos comitês científicos da Agência Europeia dos Produtos Químicos (ECHA), que concordam com as medidas restritivas. O uso de ácido perfluorooctanoanossulfônico (PFOS) e seus derivados, bem como outras substâncias classificadas como PFAS, já é alvo de restrições na UE. Além disso, vários Estados-Membros da UE e a Noruega propuseram a restrição de diversas outras substâncias PFAS (ECHA, 2023).

Recentemente, o governo federal dos Estados Unidos (EUA) estabeleceu regulamentações inéditas sobre a presença de PFAS na água potável. Essa é a primeira atualização significativa das normas de qualidade da água desde a revisão da Lei de Água Potável de 1996. Em 2023, a EPA propôs limites legais para seis compostos PFAS, incluindo PFOA e PFOS, com valores definidos em 4 nanogramas por litro (ng.L^{-1}) para os dois primeiros e 10 ng.L^{-1} para outros compostos como PFHxS e GenX (US-EPA, 2022), regulamentação que foi oficialmente aprovada em 2024.

A regulamentação da EPA dos EUA estabelece que os sistemas públicos de abastecimento de água devem reduzir os níveis desses contaminantes para atender aos novos limites,

utilizando tecnologias como carvão ativado granular e osmose reversa, as quais já demonstraram eficiência na remoção de PFAS em algumas localidades (Crone *et al.*, 2019). Além disso, várias questões ainda precisam ser esclarecidas, como o desenvolvimento de métodos mais eficientes de detecção e quantificação de PFAS em diferentes matrizes ambientais, a avaliação do impacto dessas substâncias na saúde humana e ecológica, bem como a gestão e descarte desses compostos (EPA, 2024). Essas regulamentações representam um avanço significativo na proteção da saúde pública e da qualidade ambiental, marcando a primeira grande atualização das normas de segurança hídrica nos Estados Unidos após décadas de inatividade regulatória em relação aos PFAS. Essas medidas propostas pela EPA visam não apenas a redução da exposição humana a esses compostos, mas também a melhoria geral da qualidade da água, potencialmente beneficiando a remoção de outros contaminantes ainda não regulamentados, promovendo uma maior segurança hídrica a longo prazo (US-EPA, 2023).

No Brasil, apesar de várias instituições estarem cientes do problema, são escassos os estudos que investigam a presença de microcontaminantes, como PFOA e PFOS, em águas superficiais, subterrâneas e em efluentes sanitários, bem como o seu destino durante os tratamentos de água e esgoto. A Portaria de Potabilidade MS 888/2021 estabelece os limites de alguns compostos e substâncias químicas orgânicas e inorgânicas, mas ainda não há legislação que monitore os poluentes da classe PFAS. No entanto, encontra-se em tramitação um projeto de lei apresentado no legislativo brasileiro para Instituir a Política Nacional de Controle dos PFAS (n.º 2.726, de 2023). As iniciativas propostas no projeto de lei têm como meta regular a presença de PFAS no meio ambiente e promover a adoção de práticas sustentáveis na produção e consumo de bens e serviços.

3.2 ECOTOXICOLOGIA

A Ecotoxicologia é a ciência que caracteriza, comprehende e estima os efeitos negativos de substâncias tóxicas e alterações físicas em organismos vivos e ecossistemas (Guaratini *et al.*, 2008). Esse campo explora como esses poluentes afetam populações e comunidades, considerando a transferência e interação desses agentes com o ambiente (Fernicola, Bohrer-Morel e Bainy, 2003). A ecotoxicologia aborda sistemas complexos e pode ser desafiadora devido à dificuldade de entender completamente os processos ecológicos envolvidos. No entanto, modelos específicos podem ajudar a fornecer informações sobre as interações entre poluentes e o meio ambiente.

Diversas espécies de organismos têm sido utilizadas na ecotoxicologia ao redor do mundo, oferecendo dados essenciais para a análise e compreensão dos impactos dos xenobióticos no ambiente. Os principais organismos utilizados em experimentos laboratoriais são escolhidos de maneira a representar uma variedade de ecossistemas e níveis tróficos (Magalhães e Ferrão-Filho, 2008; Miranda, 2021).

3.2.1 Bioindicadores e biomarcadores

O biomonitoramento é definido como a prática de utilizar organismos vivos para avaliar alterações no meio ambiente, frequentemente relacionadas às ações antropogênicas. Essa abordagem é essencial para identificar e quantificar os efeitos de xenobióticos, permitindo o monitoramento da saúde dos ecossistemas e fornecendo dados para a gestão ambiental. Os testes ecotoxicológicos em ambientes aquáticos, que incluem a utilização de biomarcadores, são capazes de revelar impactos de poluição que podem não ser detectados apenas por análises químicas (Mirnenko, 2024).

Os biomarcadores são amplamente definidos como indicadores ou eventos de sinalização em sistemas biológicos, abrangendo níveis molecular, bioquímico, celular, fisiológicos, patológicos ou comportamentais em resposta aos xenobióticos (Gupta, 2014). Eles podem se manifestar de várias formas, incluindo alterações fisiológicas (funções de órgãos), físicas (estruturas biológicas), histológicas (tecidos obtidos por biópsia) e anatômicas. Entre os tipos de biomarcadores estão as moléculas, genes, enzimas e hormônios.

Biomarcadores e bioindicadores são essenciais para avaliar a saúde ambiental. O bioindicador é um organismo ou grupo de organismos cuja presença, ausência ou estado de saúde indica a qualidade geral do ambiente e ajuda a detectar mudanças na saúde do ecossistema. A padronização dos bioindicadores é uma ferramenta fundamental para programas de biomonitoramento (Magalhães e Ferrão-Filho, 2008).

O biomonitoramento é realizado por meio de diversos protocolos e índices, utilizando bioindicadores para avaliar e monitorar a qualidade ambiental. Avaliar organismos em diferentes níveis tróficos é fundamental, pois cada organismo reage de forma distinta aos poluentes no ambiente. Alguns exemplos de organismos usados no biomonitoramento aquático incluem microalgas, crustáceos, equinoides, poliquetas, oligoquetas, peixes e bactérias, que representam diferentes ecossistemas e níveis tróficos (Magalhães e Ferrão-Filho, 2008; Hong *et al.*, 2015; Miranda, 2021).

A análise quantitativa dos biomarcadores é essencial para estabelecer a relação entre a exposição a um agente químico e seus efeitos no organismo de interesse (Amorim, 2003). Por exemplo, os biomarcadores permitem avaliar o nível de dano oxidativo causado ao organismo pela exposição a xenobióticos (Pikula *et al*, 2019). Goulart, M. e Callisto, M. (2003) apontam que alguns estudos têm destacado a importância do desenvolvimento de biomarcadores para uma avaliação mais precisa do potencial efeito de contaminantes no ambiente. Os autores (2003) também destacam que esses biomarcadores geram informações rapidamente, em comparação com outros testes de sensibilidade toxicológica, tais como: testes agudos, que só conseguem determinar concentrações letais após 24 a 96 horas de exposição; ou testes crônicos, que fornecem respostas em longo prazo (por exemplo, crescimento e reprodução).

Além disso, diferentemente das análises físico-químicas, os bioindicadores fornecem uma indicação integrada dos poluentes, incluindo efeitos sinérgicos e antagônicos, o que é útil para o monitoramento da qualidade da água. A toxicologia avaliada em nível celular é muito importante, pois suas alterações podem desencadear reações em cadeia (Figura 3.7), resultando em impactos ecológicos (Guaratini *et al*, 2008).



Figura 3.7: Reação em cadeia desencadeada por poluentes, atingindo até os níveis mais complexos da natureza (Adaptado - Guaratini *et al*, 2008).

3.2.1.1 *Microalgas*

As microalgas são organismos fotossintetizantes unicelulares que pertencem a diversos grupos taxonômicos. Elas são sensíveis a mudanças em parâmetros ambientais como temperatura, pH, salinidade, disponibilidade de nutrientes e exposição a poluentes (Lee, Jalalizadeh e Zhang, 2015; Bergami *et al.*, 2017; Wang *et al.*, 2022). Variações nas comunidades de microalgas podem indicar mudanças nas condições ambientais. Por exemplo, as alterações na abundância ou na composição de espécies podem sinalizar mudanças na qualidade da água, como poluição ou eutrofização.

Devido a essas características, as microalgas têm sido um modelo importante para investigar questões urgentes relacionadas à poluição ambiental (Mallick e Mohn, 2000). Embora seu crescimento seja um processo complexo, afetado por diversos recursos limitantes e fatores ambientais (Lee, Jalalizadeh e Zhang, 2015), as microalgas são comumente utilizadas em testes de ecotoxicidade devido à facilidade de cultivo e às rápidas taxas de divisão celular (Stone *et al.*, 2019). Além disso, elas são vistas como organismos com adaptabilidade, resistência das cepas e alta relação superfície-volume (Devi *et al.*, 2023).

Algumas e cianobactérias são componentes fundamentais em ecossistemas aquáticos, ocupando uma grande parte da biomassa, diante disso, suas respostas toxicológicas vêm sendo investigadas (Lu *et al.*, 2021; Pikula *et al.*, 2018). Como esses organismos contribuem com grande parte da produção primária, os efeitos tóxicos dos contaminantes podem ter impactos consideráveis sobre esses organismos e desencadear efeitos em cadeia em todo o ecossistema (Prata *et al.*, 2019; Barbosa, 2009).

Um estudo detalhado das interações entre microalgas, cianobactérias e diferentes poluentes pode fornecer entendimentos sobre como os poluentes alteram o desenvolvimento dos organismos e os impactos no meio ambiente (Lu *et al.*, 2021), uma vez que fornecem nutrientes para organismos de níveis tróficos superiores, contribuem para a produção primária em ecossistemas aquáticos e influenciam os ciclos biogeoquímicos.

As microalgas formam um grupo muito diverso com um potencial genético significativo para fins de pesquisa. Além disso, estudos sobre genômica de microalgas estão descobrindo uma variedade de novos genes e uma grande diversidade genética funcional (Brasil *et al.*, 2017). Os estudos relacionados aos genes e proteínas podem revelar os mecanismos pelos

quais as microalgas se adaptam a diversos ambientes e como suas características genéticas podem ser exploradas em novos contextos de alterações ambientais (Wang *et al.*, 2022).

Além disso, essas espécies são selecionadas porque frequentemente coexistem, predominam ou sobrevivem em ambiente naturais contaminados por xenobióticos (Zhang *et al.*, 2014; Chia *et al.*, 2017). Os indicadores tradicionalmente usados na ecotoxicologia, como taxa de crescimento, aumento de biomassa são adequados para avaliar os efeitos de xenobióticos, mas não são para elucidar os mecanismos de toxicidade (Pikula *et al.*, 2018). Por essa razão, os biomarcadores relacionados ao estresse oxidativo têm mostrado resultados mais promissores na identificação desses mecanismos.

3.2.1.2 *Enzimas Antioxidantes*

Os organismos vivos possuem a habilidade natural de detectar, comunicar e reagir a mudanças em seu ambiente. Essa capacidade é essencial para a manutenção dos processos vitais do organismo sob condições de estresse ambiental. Em resposta ao estresse causado por poluentes, o organismo age para se proteger, prevenir ou reduzir a interação dos poluentes com seus componentes celulares e até mesmo recuperar-se de danos já causados (Guaratini *et al.*, 2008).

Devido à ampla distribuição das algas, esses organismos enfrentam uma variedade de estresses. Como são organismos aeróbicos, as microalgas geram espécies reativas de oxigênio (ERO) durante a respiração e a oxidação de substratos. As ERO atuam como mensageiros secundários em inúmeros processos celulares (Rezayian, Niknam e Ebrahimzadeh, 2019). A exposição a fatores ambientais gera desequilíbrio entre a produção e a supressão de ERO, causando aumento dessas espécies. Alguns exemplos dos fatores que podem interferir na produção são: a exposição a luz intensa, xenobióticos, radiação UV, altas concentrações de sal e temperaturas extremas (Campos *et al.*, 2012 e Wang *et al.*, 2023).

O aumento descontrolado de espécies reativas de oxigênio pode causar danos a vários componentes celulares, como membranas, DNA, proteínas e lipídios. Em resposta, diversos organismos desenvolveram um sistema antioxidante que ajuda a proteger contra esses danos oxidativos (Mallick e Mohn, 2000; Brasil *et al.*, 2017). O excesso de radicais livres, incluindo as espécies reativas de oxigênio, no organismo é combatido por antioxidantes

(Barreiros e David, 2006). Os mecanismos de defesa antioxidante podem ser classificados em duas categorias principais: enzimáticos e não enzimáticos.

As enzimas antioxidantes incluem a superóxido dismutase (SOD), glutationa redutase (GR), glutationa peroxidase (GPx), catalase (CAT), entre outras. Já os antioxidantes não enzimáticos incluem carotenoides, tocoferol, ácido ascórbico, glutationa, flavonoides e compostos fenólicos (Rezayian, Niknam e Ebrahimzadeh, 2019). Essas enzimas são encontradas em quase todas as espécies, desde plantas e bactérias até animais (Bladeren, 2000), e as mudanças em sua atividade afetam diretamente a capacidade do organismo em neutralizar substâncias nocivas, influenciando a resposta a xenobióticos.

Existem três sistemas enzimáticos antioxidantes principais, incluindo a SOD, que converte o radical ânion superóxido em oxigênio e peróxido de hidrogênio. Esse processo facilita a eliminação do radical superóxido, mesmo em baixas concentrações (Babior, 1997; Barreiros e David, 2006). A SOD está amplamente distribuída tanto em plantas quanto em animais, e sua quantidade em ambientes celulares e extracelulares é essencial para a prevenção de doenças relacionadas ao estresse oxidativo.

O segundo sistema de prevenção consiste na enzima catalase, que realiza a dismutação do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em oxigênio e água. O terceiro sistema antioxidante envolve a glutationa (GSH) e duas enzimas, GPx e GR. Esse sistema também catalisa a conversão do peróxido de hidrogênio em água e oxigênio, com o auxílio da glutationa que fica sendo convertida entre suas formas oxidada e reduzida (Barreiros e David, 2006).

A glutationa (GSH) atua como um antioxidante essencial nas células, protegendo contra danos oxidativos. A GSH é sintetizada a partir de aminoácidos dentro das células, as variações em seus níveis podem indicar mudanças no estado antioxidante celular. O aumento na concentração de GSH beneficia a defesa contra estresse oxidativo, enquanto reduções podem aumentar a vulnerabilidade a danos celulares (Barreiros e David, 2006).

Por outro lado, a glutationa-S-transferase (GST) desempenha um papel essencial na destoxificação celular, facilitando a conjugação de glutationa a compostos tóxicos, tornando-os mais solúveis em água para excreção (Soares, 2009). Existe uma grande ênfase na investigação da conjugação dos compostos tóxicos eletrofílicos gerados durante a fase I da biotransformação com a glutationa (GSH), uma reação catalisada pelas enzimas

glutatona S-transferases (GST). A GST também está envolvida no transporte intracelular, manutenção do balanço oxidativo e controle da peroxidação lipídica. A toxicidade de muitos compostos exógenos pode ser reduzida pela atividade da GST (Guaratini *et al*, 2008).

A diminuição ou aumento de algumas respostas antioxidantes são específicas da espécie e do tipo de estresse (Mallick e Mohn, 2000). As ERO são moléculas altamente reativas que podem ser geradas como resultado de estresses ambientais gerados por condições adversas. Geralmente, quando ocorre indução do estresse oxidativo, é comum que as atividades das enzimas antioxidantes sejam aumentadas. Contudo, se a condição oxidativa for demasiadamente severa, pode ocorrer uma redução na atividade enzimática, pois o excesso de espécies reativas de oxigênio (ERO) pode danificar as enzimas, prejudicando sua função e capacidade de neutralizar os radicais livres (Pizzino *et al.*, 2017). As mudanças nas atividades das enzimas são variáveis que indicam a resposta ao estresse oxidativo (Wang *et al*, 2023).

As células possuem mecanismos de defesa e reparo para evitar danos causados por poluentes, abrangendo as respostas adaptativas de curto e médio prazo, que envolvem a reorganização de vias bioquímicas e a ativação de proteínas de defesa dentro de limites geneticamente determinados. Assim, essa adaptação bioquímica é um importante atributo de todos os organismos vivos e é responsável por expandir a resistência às adversidades ambientais, conforme destacado por Guaratini *et al.*, (2008). A longo prazo, a plasticidade e a eficácia desse mecanismo de resistência molecular parecem ser fundamentais no estabelecimento de características adaptativas que podem aumentar a aptidão de um organismo ao longo da evolução (Guaratini *et al*, 2008).

3.2.2 Efeitos sinérgicos, aditivos e antagônicos

Os microcontaminantes, individualmente, podem causar alterações na qualidade das águas, equilíbrio químico dos solos, efeitos adversos no desenvolvimento de espécies aquáticas e terrestres, e também podem gerar problemas de saúde nos seres humanos. Quando os microcontaminantes estão ocorrendo conjuntamente com outras substâncias ou microrganismos, podem surgir efeitos em decorrência dessa coocorrência, mas esses efeitos combinados são poucos explorados. Os efeitos combinados podem ser classificados como sinérgicos, aditivos ou antagônicos. O sinergismo ocorre quando a interação de dois ou mais

agentes resulta em um efeito combinado maior do que a soma dos efeitos individuais, ou seja, quando uma substância amplifica os efeitos de outra (Olszowy-Tomczyk, 2020).

Por outro lado, o efeito antagônico ocorre quando uma substância reduz ou neutraliza o efeito de outra. Em química, o antagonismo é observado quando a combinação de agentes resulta em um efeito total menor do que a soma dos efeitos individuais, indicando que a interação é menos eficaz do que os efeitos esperados somados (Wang *et al.*, 2011).

Quando a combinação de produtos resulta no mesmo efeito que a soma dos seus efeitos individuais, o efeito é considerado aditivo. Esse efeito indica a ausência de interações complexas entre os componentes, como sinergismo ou antagonismo, durante o processo. No caso do efeito aditivo, cada componente age de forma independente, sem influenciar a ação dos outros presentes na mistura. Assim, o efeito total da mistura é simplesmente a soma dos efeitos individuais de seus componentes (Olszowy-Tomczyk, 2020).

A maioria dos estudos ecotoxicológicos têm se concentrado na análise dos efeitos de um único poluente em uma única espécie, como o que ocorre com as substâncias per- e polifluoroalquil (Zheng, Liu, Shi, 2012; Hagenaars *et al.*, 2013; Jantzen, Annuziato e Cooper, 2016 e Jantzen *et al.*, 2017) e das cianotoxinas (Ferrão Filho, 2009; Pinheiro *et al.*, 2016; Sopezki, 2017; Walter *et al.*, 2018, Moraes *et al.*, 2021). Esta abordagem simplificada não consegue entender a real toxicidade dos poluentes no ambiente natural (Lu *et al.*, 2021), devido à complexidade dos efeitos interativos e singularidade de cada ecossistema.

3.2.3 Ensaios Ecotoxicológicos

A toxicidade dos poluentes varia em função do tempo de exposição e da concentração, podendo ser dividida em efeitos agudos ou crônicos: os efeitos agudos são causados por rápidas exposições às altas concentrações de poluentes. São os efeitos mais perigosos, podendo causar graves desordens fisiológicas até a morte. Os efeitos crônicos estão relacionados com a exposição prolongada de concentrações baixas, o que resulta em efeitos por acumulação (Guaratini *et al.*, 2008).

A conexão entre os estudos toxicológicos e o aumento das florações de cianobactérias está relacionada ao impacto de substâncias tóxicas presentes no ambiente. Enquanto a cianotoxina cilindrospermopsina (CYN) é uma das cianotoxinas possivelmente liberadas por cianobactérias durante suas florações, compostos perfluoroalquilados (PFOA) são

introduzidos no meio aquático principalmente por atividades industriais. Ambas as substâncias podem causar estresse oxidativo em organismos expostos, o que pode afetar a dinâmica do ecossistema. Isso destaca a importância de compreender os efeitos diretos e indiretos desses poluentes, como o impacto sobre a saúde dos organismos afetados e o desequilíbrio na cadeia alimentar.

Devido à lacuna nesta área, há uma necessidade premente de investigar esses contaminantes e suas interações para compreender as características e modos de ação nos organismos expostos a elas, de forma que se possa prevenir presentes e futuros efeitos danosos à saúde do ecossistema, e consequentemente, à saúde humana.

4 MATERIAL E MÉTODOS

O desenvolvimento do trabalho foi dividido em 4 etapas: (1) levantamento da revisão bibliográfica, para adquirir informações sobre os efeitos do contaminante PFOA e de CYN em microalgas; (2) planejamento e procedimentos experimentais (3) procedimentos analíticos; (4) processamento dos dados obtidos nos ensaios e análises estatística.

4.1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A revisão bibliográfica foi realizada em diversas bases de dados para garantir uma cobertura ampla nas áreas de saúde ambiental e toxicidade, buscando artigos científicos relacionados ao tema nas bases de dados do Science Direct, SciELO, Portal de Periódicos Capes e no Google Acadêmico. Foram utilizadas palavras-chave como "PFOA", "ácido perfluorooctanoico", "cilindrospermopsina", "microalgas", "bioindicadores", "poluentes aquáticos" e "efeitos combinados" para a busca, em inglês, devido à maior diversidade de artigos disponíveis na língua. Até o momento deste trabalho, não foram encontrados estudos na literatura que investigassem os efeitos combinados de cilindrospermopsina e PFOA em conjunto. No entanto, foram selecionados artigos que exploraram interações entre as substâncias da classe das cianotoxinas e dos compostos perfluoroalquilados.

4.2 PLANEJAMENTO E PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

As microalgas verdes foram utilizadas em ensaios com o objetivo de avaliar a toxicidade crônica de CYN e PFOA, tanto isolados quanto em mistura, para investigação de efeitos no crescimento e estresse oxidativo. A norma adotada para realizar ensaios de toxicidade crônica foi a ABNT NBR 12.648 de 2018. Vale ressaltar que o ensaio de toxicidade crônica foi prolongado para 12 dias na avaliação do crescimento das microalgas, em contraste com o período de 4 dias estabelecido pela norma (Figura 4.1).

As definições estabelecidas propõem um método para avaliar a toxicidade crônica de amostras líquidas e produtos/substâncias químicas solúveis ou dispersas em água para microalgas, incluindo *Chlorella vulgaris*, *Desmodesmus subspicatus*, *Monoraphidium dybowskii*, *Raphidocelis subcapitata* (também conhecida como *Pseudokirchneriella subcapitata*) e outras algas verdes unicelulares, como a *Monoraphidium capricornutum* e *Ankistrodesmus striptatus*, que foram utilizadas neste estudo.

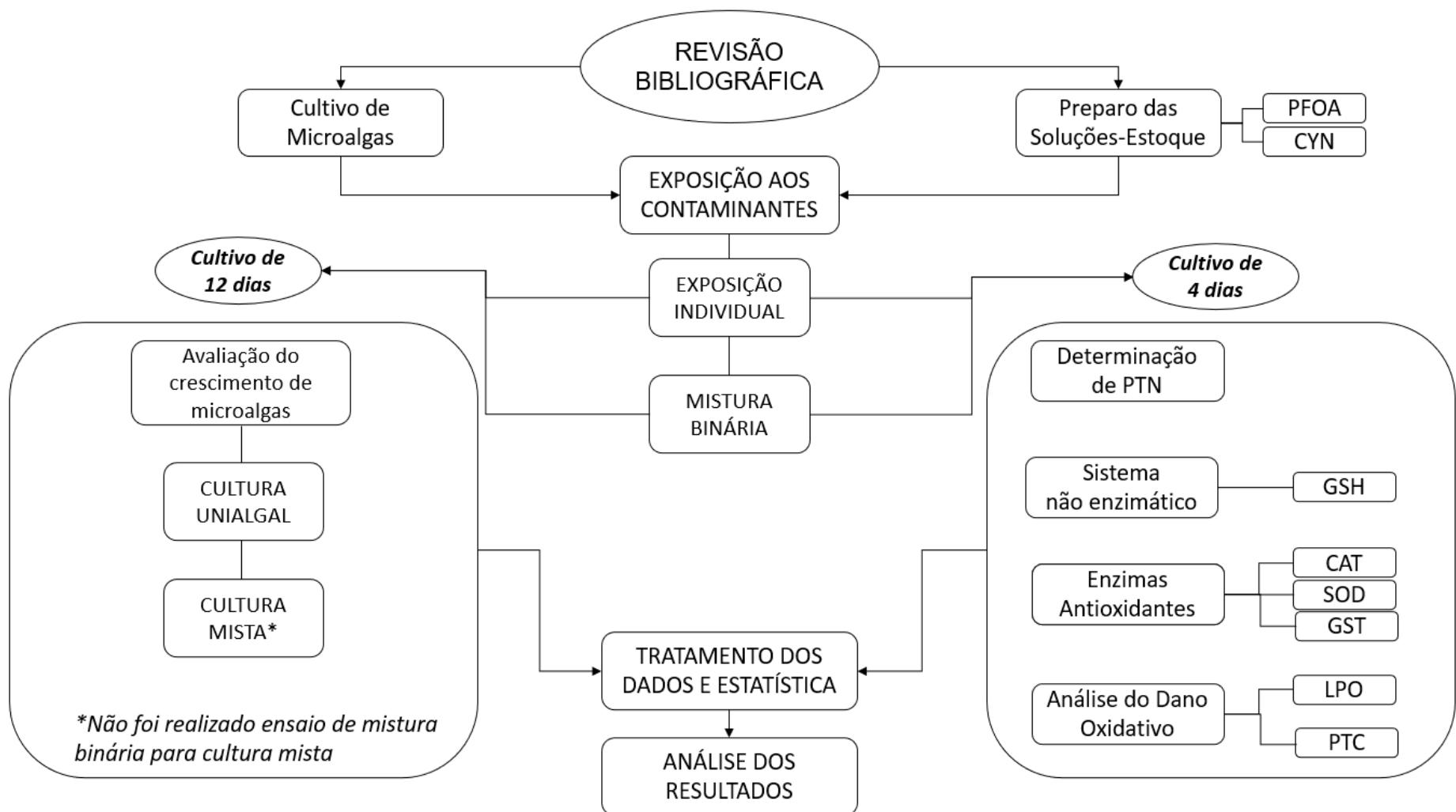


Figura 4.1: Fluxograma metodológico da pesquisa

O ensaio de sensibilidade com substância referência (sulfato de zinco) foi previamente realizado em estudos anteriores, para verificar se haveria resposta adequada da espécie de cultivo, bem como o ensaio preliminar, para definição das diluições mais relevantes para o estudo. A Figura 4.1 apresenta um fluxograma sucinto do planejamento experimental da pesquisa, etapas que serão desenvolvidas nos capítulos seguintes.

4.3 CULTIVO DE MICROALGAS

4.3.1 Espécies Cultivadas

Todas as cepas de microalgas utilizadas neste estudo foram cultivadas originalmente em condições unialgais. As clorofíceas foram gentilmente cedidas pela Professora Sandra Azevedo do Laboratório de Ecofisiologia e Toxicologia de Cianobactérias (LETC) do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho (IBCCF) da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ) e cultivada no Laboratório de Saneamento Ambiental (LSA) da Universidade de Brasília (UnB). As espécies de clorofíceas utilizadas incluem *Monoraphidium capricornutum* e *Ankistrodesmus striptatus* (Figura 4.2), além da cianobactéria *Raphidiopsis raciborskii*.

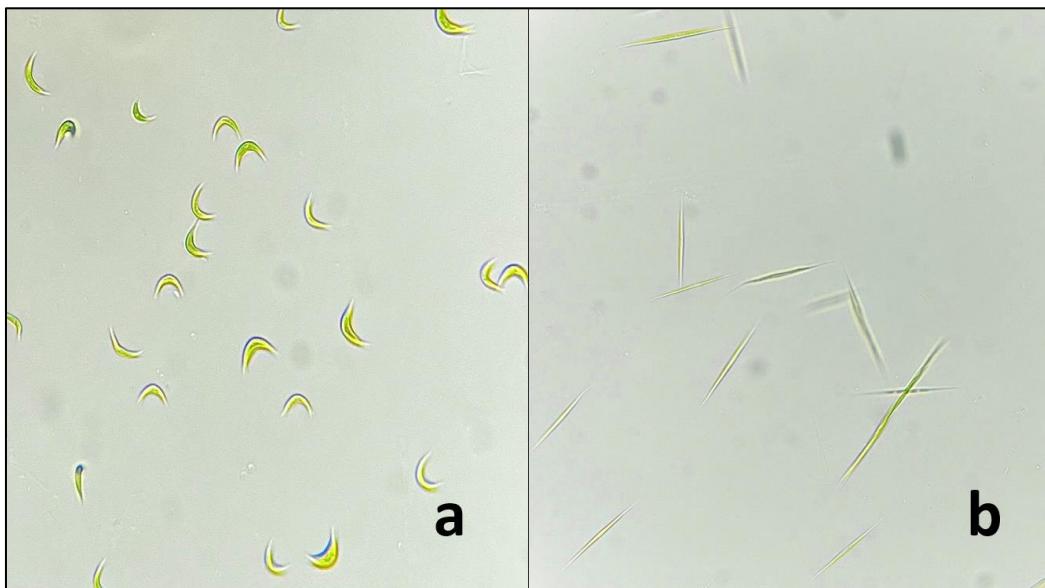


Figura 4.2: Cultura de *Monoraphidium capricornutum* (a), Cultura de *Ankistrodesmus striptatus* (b), Ampliação 40x (microscopia óptica).

4.3.2 Condições de cultivo

Para a manutenção das cepas das microalgas em estudo, foi utilizado o meio de cultivo líquido AMS-1 (Gibson, 1982), preparado no laboratório a partir de quatro soluções-estoque

(A, B, C e D) com concentrações pré-determinadas de reagentes e água destilada. Os meios foram preparados em erlenmeyers com capacidade adequada para o volume necessário. Antes do cultivo, o pH de todos os meios foi ajustado para 7 usando HCl (1N) ou NaOH (1N) conforme necessário, em seguida, esterilizados por autoclavagem a 121 °C por 25 minutos. As culturas foram mantidas a 25 ± 2 °C sob um ciclo de claro/escuro de 12:12 horas e agitação manual, com uma intensidade luminosa aproximadamente igual a 49,95 $\mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$, utilizando LEDs brancos. A intensidade de luz foi estimada pelo aplicativo “Light Meter”, onde a unidade medida em lux foi convertida para microsiemens utilizando a calculadora online da *Waveform Lighting*.

4.3.3 Preparo das soluções-estoque

4.3.3.1 Ácido Perfluorooctanoico (PFOA)

O composto foi adquirido comercialmente (*Sigma Aldrich*) com pureza analítica de 96% e dissolvido em água deionizada para preparar uma solução-estoque a uma concentração de 1000 mg/L. Para montar o experimento de exposição das microalgas aos compostos, calculou-se a diluição necessária para alcançar a concentração determinada neste trabalho.

4.3.3.2 *Cilindrospermopsis* (CYN)

A cepa CYP011K de cianobactéria da espécie *Raphidiopsis raciborskii* foi obtida através do Laboratório de Ecofisiologia e Toxicologia de Cianobactérias (LETC) do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho (IBCCF) da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ). As culturas foram mantidas a 25 ± 2°C com um ciclo de claro/escuro de 12 horas, iluminadas por LEDs brancos com intensidade de 49,95 $\mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e agitados manualmente com frequência. A cultura da cepa CYP011K utilizada para a obtenção do extrato tóxico foi cultivada até a fase exponencial de crescimento, sendo posteriormente desmontada para a extração da toxina.

O processo da produção do extrato tóxico, contendo a cianotoxina cilindrospermopsis, foi realizado no laboratório de Saneamento Ambiental da UnB, através de um processo de três ciclos de gelo-degelo, seguido de filtração utilizando membranas de celulose com 47 mm de diâmetro e poro de 0,45 μm , do volume de cultivo para rompimento das células e liberação das toxinas intracelulares no meio líquido.

Para a detecção de cilindrospermopsina e 7-deoxi-cilindrospermopsina, a amostra de extrato bruto aquoso foi filtrada, armazenada em vial e submetida à análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada à espectrometria de massas (LC-MS/MS), conforme descrito em Eaglesham *et al.* (1999). A análise foi realizada no Laboratório de Ecofisiologia e Toxicologia de Cianobactérias (LETC) da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ). Os resultados mostraram concentrações de 282,1 ng/mL para cilindrospermopsina (CYN) e 39,87 ng/mL para 7-deoxi-cilindrospermopsina. Os limites de detecção (LoD) e quantificação (LoQ) do método LC-MS/MS foram de 0,6 ng/mL e 1,0 ng/mL, respectivamente. As razões m/z analisadas, os cortes de quebra de molécula e o tratamento de dados seguiram o protocolo descrito em Eaglesham *et al.* (1999), que utiliza monitoramento de íons específicos para identificação e quantificação das toxinas.

4.3.4 Exposição individual aos contaminantes

A exposição individual a cada contaminante foi realizada com o objetivo de investigar os efeitos específicos de cada substância no crescimento de *Monoraphidium capricornutum* em cultura unialgal, e no crescimento tanto de *Ankistrodesmus striptatus* quanto de *Monoraphidium capricornutum* em cultura mista. Isso permite uma análise detalhada dos efeitos individuais de cada contaminante, preparando o caminho para avaliar posteriormente como esses contaminantes interagem quando combinados.

As concentrações adotadas na exposição individual foram: CYN-AC (100 $\mu\text{g}.\text{L}^{-1}$); CYN-BC (50 $\mu\text{g}.\text{L}^{-1}$); PFOA-AC (2000 $\mu\text{g}.\text{L}^{-1}$) e PFOA-BC (1000 $\mu\text{g}.\text{L}^{-1}$). Os sufixos AC e BC indicam alta concentração e baixa concentração, respectivamente.

O primeiro experimento com a cultura unialgal de *Monoraphidium capricornutum* foi iniciado com uma densidade celular de $2,20 \times 10^4$ células por mL. No experimento com a cultura mista (*A. striptatus* e *M. capricornutum*), as densidades iniciais de cada cenário estão apresentadas na Tabela 4.1.

As amostras expostas e os controles foram cultivados por 12 dias em ambiente controlado. As culturas expostas e o grupo controle foram mantidos a 25 ± 2 °C sob um ciclo de claro/escuro de 12:12 horas, com uma intensidade de $49,95 \mu\text{E}.\text{m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, utilizando LEDs brancos e foram agitadas diariamente de forma manual.

Tabela 4.1: Densidade celular inicial de *Monoraphidium capricornutum* e *Ankistrodesmus striptatus* nos experimentos de exposição ao PFOA e CYN, individualmente, em diferentes cenários em cultura mista de microalgas

Cenário	Densidade celular <i>M. capricornutum</i> (x 10 ⁴ cél/ mL)	Densidade celular <i>A. striptatus</i> (x 10 ⁴ cél/ mL)
Sem Predominância	0,48	0,51
Predominância <i>M. capricornutum</i>	1,44	0,50
Predominância <i>A. striptatus</i>	0,52	0,98

4.3.5 Exposição à mistura binária

Além da exposição individual a cada contaminante, foi conduzido um ensaio de mistura binária para investigar os efeitos interativos da combinação de CYN e PFOA na microalga *Monoraphidium capricornutum*. Foram aplicados três tratamentos distintos: alta concentração de CYN combinada com baixa concentração de PFOA, baixa concentração de CYN combinada com alta concentração de PFOA, e altas concentrações de ambos.

Como observado na Tabela 4.2, as concentrações combinadas foram: CYN (100 µg.L⁻¹) + PFOA (1000 µg.L⁻¹), CYN (50 µg.L⁻¹) + PFOA (2000 µg.L⁻¹), CYN (100 µg.L⁻¹) + PFOA (2000 µg.L⁻¹). O objetivo foi avaliar quais combinações de concentrações demonstram efeitos observáveis após o período de tempo adotado pela metodologia utilizada.

Tabela 4.2: Diferentes tratamentos aplicados no ensaio de mistura binária

	CYN (µg.L ⁻¹)	PFOA (µg.L ⁻¹)
Cenário 1	100	1000
Cenário 2	50	2000
Cenário 3	100	2000

Da mesma forma que na exposição individual, o experimento foi realizado em triplicata para cada um dos grupos. O experimento teve início com uma densidade celular inicial de 2,24 x 10⁴ células por mL de *Monoraphidium capricornutum*, mantidas por 12 dias em ambiente controlado. As condições de exposição são as mesmas citadas anteriormente. As amostras para as análises bioquímicas foram coletadas e preparadas após 96 horas de exposição em cada tratamento (exposição individual e mistura binária) da cultura unialgal de *M. capricornutum* para posterior análise.

Para uma melhor compreensão e a análise dos cenários experimentais realizados, a Tabela 4.3 resume as informações de todos os cenários dos experimentos realizados, incluindo as culturas unialgais (*Monoraphidium capricornutum*) e mistas (*Monoraphidium capricornutum* e *Ankistrodesmus striptatus*), as concentrações dos contaminantes utilizados e os tempos de exposição.

Tabela 4.3: Tabela Resumo das Condições Experimentais: Culturas Unialgais e Mistas.

CULTURA UNIALGAL (<i>Monoraphidium capricornutum</i>)			
	TEMPO DE EXPOSIÇÃO	CONCENTRAÇÕES	
AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO	2, 4, 6, 8, 10 e 12 dias	INDIVIDUAL	PFOA: 1000 e 2000 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ CYN: 50 e 100 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$
ANÁLISES BIOQUÍMICAS	4 dias	INDIVIDUAL	PFOA: 1000 e 2000 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ CYN: 50 e 100 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$
AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO	2, 4, 6, 8, 10 e 12 dias	MISTURA BINÁRIA	CYN 100 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ + PFOA 1000 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ CYN 50 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ + PFOA 2000 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ CYN 100 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ + PFOA 2000 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$
ANÁLISES BIOQUÍMICAS	4 dias	MISTURA BINÁRIA	CYN 100 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ + PFOA 1000 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ CYN 50 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ + PFOA 2000 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ CYN 100 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ + PFOA 2000 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$
CULTURA MISTA (<i>Monoraphidium capricornutum</i> e <i>Ankistrodesmus striptatus</i>)			
	TEMPO DE EXPOSIÇÃO	CONCENTRAÇÕES	
AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO	2, 4, 6, 8, 10 e 12 dias	INDIVIDUAL	PFOA: 1000 e 2000 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ CYN: 50 e 100 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$

4.4 PROCEDIMENTOS ANALÍTICOS

Os ensaios de exposição de microalgas e preparo das amostras para análise bioquímica foram realizados no Laboratório de Saneamento Ambiental (LSA) do Departamento de Engenharia Civil e Ambiental (ENC) da Universidade de Brasília (UnB). No entanto, as

análises bioquímicas e de biomarcadores de danos oxidativos foram realizadas no Laboratório de Avaliação e Promoção da Saúde Ambiental (LAPSA) do Instituto Oswaldo Cruz (IOC/Fiocruz).

4.4.1 Avaliação do crescimento de microalgas

Para avaliar o crescimento das microalgas expostas aos contaminantes nos diferentes tratamentos, contagens de células foram realizadas a intervalos de 48 h durante o período de exposição das algas, tanto para as amostras controle quanto para as amostras expostas aos contaminantes em estudo. O método descrito por Andersen (2005) foi utilizado para realizar a contagem de células tanto na cultura unialgal quanto na cultura mista. Para isso, foram utilizados uma câmara de Neubauer e um microscópio óptico de campo claro (Leica DM LB2) operando com ampliação de 200x. Foram contados os quatro campos da câmara utilizando um contador manual para maior precisão, realizando as diluições necessárias para evitar que a densidade celular fosse excessivamente alta, o que poderia comprometer a contagem.

No caso das culturas mistas, compostas por *Ankistrodesmus striptatus* e *Monoraphidium capricornutum*, a contagem foi realizada em duplicata, primeiro para uma espécie e depois para a outra, utilizando a mesma amostra depositada na câmara de Neubauer (Figura 4.3). Em cenários em que a biomassa celular atingiu níveis consideravelmente elevados, diluições seriadas foram realizadas até alcançar uma concentração apropriada para a contagem celular.

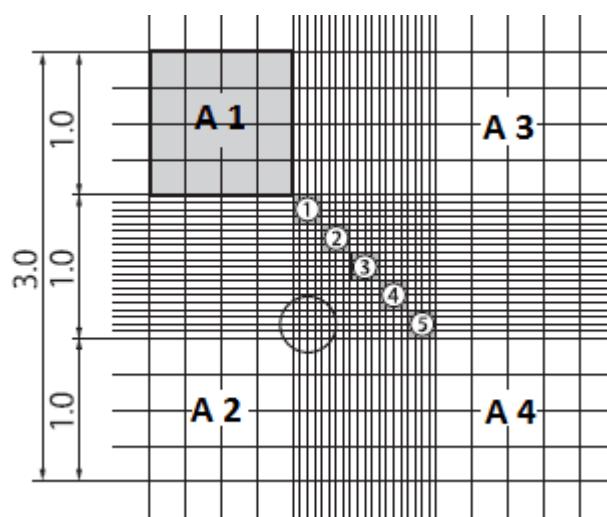


Figura 4.3: Representação da Câmara de Neubauer utilizada na Contagem de Células.

A determinação do número de células observadas na câmara de Neubauer foi realizada com base na equação proposta por Guillard (1973), conforme a seguinte equação:

$$N^{\circ} \text{ de } \frac{\text{células}}{\text{mL}} = \frac{\text{número total de células} \times \text{fator de diluição} \times 10^4}{\text{número de quadrantes contados}}$$

4.4.2 Preparo e conservação das amostras para análises do sistema antioxidante

As análises do sistema antioxidante foram realizadas com a cultura unicelular de *M. capricornutum*, incluindo tanto os tratamentos individuais com PFOA (AC: 2000 µg.L⁻¹; BC: 1000 µg.L⁻¹) e cilindrospermopsina (AC: 100 µg.L⁻¹; BC: 50 µg.L⁻¹) quanto os tratamentos de mistura binária (CYN-AC + PFOA-BC; CYN-BC + PFOA-AC e CYN-AC + PFOA-AC). Foram realizadas a quantificação de proteínas totais, assim como análises enzimáticas e não enzimáticas para cada um dos tratamentos.

As amostras de microalgas foram centrifugadas (ROTANTA 460, *Hettich Lab Technology*) em tubos falcon estreitos (15 mL) a 2.012 × g por 15 minutos utilizando alíquotas de 10 mL. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado, e foram adicionados mais 10 mL das amostras dos respectivos tratamentos e controle para garantir uma quantidade suficiente de biomassa para a realização dos ensaios planejados. Este processo foi repetido por cinco vezes, resultando em um precipitado representativo de 50 mL da amostra.

Após serem centrifugadas, adicionou-se 1 mL do meio ASM-1 para assegurar a conservação das amostras. O precipitado resultante foi refrigerado a -80°C, para impedir as atividades de organismos degradadores, até posterior quantificação de proteínas e testes enzimáticos.

A extração do precipitado foi realizada em tubos eppendorf (2mL) utilizando tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ (pH 7,0) para os ensaios de enzimas antioxidantes (glutationa S-transferase, superóxido dismutase e catalase). Para a extração, foram adicionadas esferas de vidro com diâmetro de 212-300 µm (*SIGMA*) para garantir o rompimento celular. Os tubos, contendo as amostras e as esferas de vidro, foram agitados vigorosamente por 3 minutos utilizando o Vortex Mixer (KASVI), com intervalos de um minuto. A cada minuto durante a agitação no Vortex, os tubos foram rapidamente colocados em um banho de gelo para manter o extrato resfriado.

Após a agitação, os tubos eppendorfs foram centrifugados a 3000 × g, a 4 °C por 15 minutos. Uma parte do sobrenadante resultante foi utilizada para análises de enzimas mais sensíveis

a variações, visando assegurar sua estabilidade (GST, SOD e CAT). A outra parte do sobrenadante foi armazenada e congelada para análise posterior. Esse método de extração foi adotado após verificar que era adequado para romper as células das microalgas utilizadas neste estudo.

4.5 ANÁLISES BIOQUÍMICAS

As análises dos biomarcadores foram conduzidas no Laboratório de Avaliação e Promoção da Saúde Ambiental (LAPSA), sob a supervisão do professor Enrico Mendes Saggioro. Todos os ensaios realizados neste estudo seguiram os protocolos estabelecidos pelo grupo de pesquisa de Saneamento e Saúde Ambiental da Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz).

4.5.1 Extração de proteínas e enzimas das células de microalgas

Para a extração, 100 μ L de cada réplica dos grupos controle e tratados (500 μ L para a análise de MDA) foram homogeneizados em vórtex, juntamente com esferas de vidro (212-300 μ m de diâmetro, SIGMA). Em seguida, foi realizada a adição fracionada de 50 nmol L^{-1} de tampão fosfato de potássio (pH 7,0), sendo 500 μ L na primeira e segunda etapas e 1000 μ L na terceira. No caso da análise de MDA, o tampão utilizado foi RIPA em substituição ao tampão fosfato de potássio.

Para garantir a lise celular, sucessivas homogeneizações foram realizadas em vórtex por 1 minuto, intercaladas com incubação em banho de gelo para manter o extrato resfriado. Após esse processo, as amostras foram centrifugadas a $3000 \times g$ por 15 minutos a 4°C, e o sobrenadante foi coletado para futuras quantificações.

A extração de proteínas seguiu o protocolo descrito por Slocombe *et al.* (2013), com adaptações. A quantificação das proteínas extraídas foi realizada pelo método de Lowry (1977), e os valores obtidos foram utilizados para normalizar os biomarcadores analisados.

4.5.2. Atividades de enzimas antioxidantes

4.5.2.1 Atividade da Glutationa-S-Transferase (GST)

A atividade da Glutationa S-transferase (GST) foi determinada de acordo com o método de Habig *et al.* (1974). Este método visa quantificar a atividade da enzima GST, por meio da quantificação da formação de 1 μ mol de GS-DNB/min, monitorada em um comprimento de onda de 340 nm, ao longo de 60s no espectrofotômetro UV-Visível (*BEL Photonics*).

O meio reacional contendo as amostras para análise foi preparado em uma cubeta de quartzo da seguinte forma: foram adicionados 1350 μL de tampão fosfato (100 nmol L^{-1} e $\text{pH} = 6,5$) + 50 μL de glutatona reduzida (GSH; 30 nmol L^{-1}) + 50 μL de 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB; 30 nmol L^{-1}) + 50 μL da amostra. Após uma rápida homogeneização, a leitura foi realizada e a atividade da GST foi calculada. Os cálculos de atividade enzimática são baseados na Lei de Beer e estão apresentados nas equações abaixo, onde é utilizada unidade internacional de atividade enzimática (U), corrigida pela quantidade de proteínas.

$$\text{Lei de Beer: } \text{Abs} = \epsilon \cdot b \cdot c$$

Onde:

ϵ = absorvância molar ou coeficiente de extinção molar a 340 nm (em $\text{nmol L}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$)

b = caminho ótico = 1 cm

c = concentração da amostra

4.5.2.2 Atividade da Superóxido Dismutase (SOD)

A atividade da superóxido dismutase (SOD) foi avaliada de acordo com o Kit de Ensaio de Superóxido Dismutase da fabricante *Cayman Chemical* (Michigan, Estados Unidos), com adaptações. Para o ensaio, um sal tetrazólio foi utilizado para detecção de radicais superóxido gerados pela xantina oxidase e hipoxantina (Figura 4.4). O método oferece uma maneira simples, reproduzível e rápida para medir a atividade de SOD em lisados celulares. Os valores de absorbância encontrados para a curva-padrão e amostras devem ter sua média calculada, sendo que o valor do branco foi descontado das amostras.

Para a leitura ($\lambda = 450 \text{ nm}$), foram utilizados 10 μL da amostra + 200 μL de RD (solução de sal de tetrazólio) + 20 μL de XO (Xantina Oxidase). Posteriormente, a atividade das amostras deve ser calculada usando a curva de regressão linear das taxas linearizadas (LR): curva Atividade SOD x LR. A LR foi plotada da curva de SOD como uma função da atividade de SOD (U/mL).

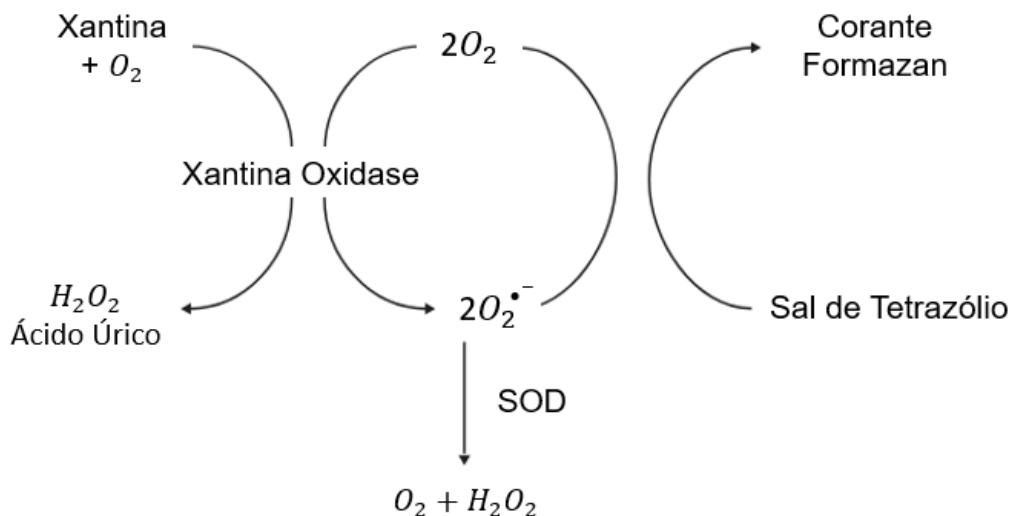


Figura 4.4: Esquema do Ensaio da Superóxido Dismutase (Adaptado - Kit de Ensaio, Cayman Chemical)

A atividade de SOD das amostras foi calculada usando a equação de regressão linear ($y = ax + b$) obtida na curva Atividade SOD x LR, aplicada na seguinte fórmula:

$$\text{Atividade da SOD} = \left[\left(\frac{LR \text{ Amostra} - b}{a} \right) \times \frac{0,23 \text{ mL}}{0,01 \text{ mL}} \right] \times FD$$

Uma unidade (U) é definida como a quantidade de enzima necessária para realizar 50% da dismutação do ânion radical superóxido (O₂[•]), medida pela mudança na absorbância por minuto a 25°C e pH 8,0. Ou seja, esta reação de dismutação inibe a redução do sal tetrazólio (*Radical Detector* ou detector de radicais). Esta inibição impede a conversão do sal tetrazólio (composto de cor amarelo-forte) para o corante Formazan, de tom amarelo-fraco ou quase transparente. A interpretação é dada da seguinte forma: um aumento na atividade da SOD resulta em uma diminuição na coloração do formazan, enquanto uma redução na atividade da SOD leva a um aumento na coloração do formazan.

4.5.2.3 Atividade da Catalase (CAT)

A atividade de catalase foi determinada através do método estabelecido por Aebi (1984). O meio reacional utilizado na análise foi preparado em uma cubeta de quartzo. Para a leitura inicial, foram adicionados 400 µL da amostra e 200 µL de tampão fosfato (50 nmol.L⁻¹). Após 15 segundos, realizou-se a leitura final, adicionando 200 µL de peróxido de hidrogênio (30 nmol.L⁻¹), seguido de uma rápida homogeneização.

Durante o ensaio, foi fundamental seguir essa ordem para garantir a homogeneização adequada e evitar que a reação de degradação ocorra antes do início da leitura. Para cada nova amostra, uma nova cubeta de referência deve ser preparada para a leitura inicial. O meio reacional da cubeta amostra deve ser preparado no momento da análise, a cada leitura de replicata. A leitura das amostras foi realizada no espectrofotômetro UV-Visível (BEL Photonics) em um intervalo de 15 segundos. As absorbâncias foram medidas a $\lambda = 240$ nm. Com base nessas medições, calcularam-se as variações na atividade da enzima sob diferentes tratamentos das amostras.

4.5.3 Análise do dano oxidativo

4.5.3.1 Ensaio de quantificação da Peroxidação Lipídica (LPO)

A quantificação de malondialdeído (MDA) foi realizada utilizando o método de Esterbauer e Cheeseman, (1990) utilizando uma adaptação do Kit de Ensaio de TBARS (*Cayman Chemical*, Michigan, Estados Unidos). Para o método em questão, foram adicionados aos eppendorfs 100 μ L de amostra ou padrão, 100 μ L de TCA a 10% e 800 μ L de TBA a 0,53%. As amostras foram homogeneizadas no vórtex antes de serem colocadas em um banho-maria a 90-100 °C por 1 hora. Para evitar a abertura dos eppendorfs devido à pressão interna, todos foram devidamente travados.

Após o aquecimento, tanto os padrões quanto as amostras foram imediatamente transferidos para um banho de gelo por 10 minutos, com o objetivo de interromper a reação. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a $1.600 \times g$ por 10 minutos a 4 °C. Após a centrifugação, a remoção das amostras foi realizada com cuidado, evitando agitação para não ressuspender o precipitado.

Os pontos da curva padrão foram preparados com diferentes concentrações de MDA, na faixa do branco até 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Uma alíquota de 300 μL de cada branco, padrão e amostra e foi retirada e transferida para uma microplaca. As amostras foram lidas em triplicatas e a leitura espectrofotométrica foi realizada na leitora de microplacas ELISA (DR-200BN – Kasuaki) em $\lambda = 535$ nm.

Uma curva de regressão linear ($y = ax + b$) foi produzida utilizando as absorbâncias finais da curva. Esta curva gerou resultados em $\mu\text{mol/L}$ (μM). As absorbâncias finais das amostras foram aplicadas na equação da curva:

$$x \text{ } (\mu\text{mol/L}) = \frac{(y - b)}{a}$$

4.5.3.2 Análise de Proteínas Carboniladas (PTC)

A quantificação de proteínas carboniladas (PTC) foi realizada pelo método de Mesquita *et al.*, (2014). O ensaio foi conduzido para detectar grupos carbonila, indicativos de modificações oxidativas em proteínas, e foi realizado utilizando o reagente DNPH.

Na etapa de quantificação, o meio reacional foi montado na própria placa, utilizando 80 μL de ácido fosfórico (H_3PO_4 ; 0,5 mol L^{-1}) e 80 μL de amostra para o controle (branco); e 80 μL de 2,4-Dinitrofenilhidrazina (DNPH; 10 mmol L^{-1}) para 80 μL das amostras. Após 10 minutos de incubação, 40 μL de Hidróxido de Sódio (NaOH , 6 mol L^{-1}) foram adicionados em todos os poços.

As placas foram então incubadas por mais 10 minutos, com o tempo de incubação rigorosamente controlado devido à instabilidade do complexo formado (dinitrofenilhidrazonas em meio alcalino). A leitura espectrofotométrica foi realizada em uma leitora de microplacas ELISA (DR-200BN – Kasuaki) a 450 nm.

O método proporciona uma abordagem sensível e específica para a quantificação de proteínas carboniladas, essencial para investigações relacionadas a estresse oxidativo e danos em proteínas induzidos por espécies reativas de oxigênio (ROS). Posteriormente, os resultados foram calculados utilizando a lei de Beer.

4.5.3.3 Determinação da Concentração de Glutationa (GSH)

A quantificação de glutationa (GSH) foi realizada pelo método de Wilhelm *et al.* (2005) por espectrofotometria. As soluções de GSH (10 mM) e DTNB (0,25 mM) foram preparadas no dia do experimento. Para a construção da curva analítica, na faixa do branco até 120 μM , alíquotas das soluções estoque de GSH foram diluídas em tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} (pH 7,0). Em seguida, cada amostra e concentração padrão receberam a adição da solução de DTNB. Antes da leitura, as amostras foram incubadas durante 15 minutos no escuro, e em seguida, foram lidas na leitora de microplacas ELISA (DR-200BN – Kasuaki).

Para a leitura, o volume utilizado da amostra de algas foi 100 μL ; 50 μL de solução de GSH e 100 μL de DTNB. As absorbâncias das amostras foram medidas a $\lambda = 412$ nm para determinação da concentração de GSH presente.

4.5 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os resultados do crescimento celular e das análises bioquímicas foram compilados no *software* Excel. As concentrações celulares das amostras expostas ao tratamento e do grupo controle foram calculadas, além de outras medidas estatísticas, incluindo médias e dispersão (variância, desvio padrão e erro padrão).

As análises de dados obtidos nos ensaios foram realizadas através do *GraphPad Prism*, um *software* de modelagem estatística. Os *outliers* foram desconsiderados e os resultados analisados no *software* estão apresentados em disposições gráficas e tabelas.

As diferenças entre os resultados do grupo controle, os contaminantes e sua mistura foram testadas estatisticamente. Inicialmente, o teste de normalidade (Shapiro-Wilk) foi realizado para determinar se os dados obtidos são paramétricos ou não. Para dados com distribuição normal, a análise de variância (ANOVA) foi aplicada para avaliar estatisticamente as diferenças entre as médias, considerando um nível de significância de $p = 0,05$.

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 EFEITOS DE PFOA E CYN NO CRESCIMENTO CELULAR DE *Monoraphidium capricornutum*

Este capítulo apresenta os resultados obtidos a partir da análise do crescimento das espécies de algas expostas a diferentes concentrações de CYN e PFOA, bem como sua mistura. Os resultados de crescimento de *Monoraphidium capricornutum* estão apresentados na Figura 5.1, enquanto os resultados da cultura mista (*Monoraphidium capricornutum* e *Ankistrodesmus striptatus*) estão apresentados nas Figura 5.2. A compreensão desses efeitos é fundamental para avaliar o impacto desses contaminantes e das possíveis interações entre eles nas populações de microalgas com consequências para os ecossistemas aquáticos.

5.1.1 Exposição de *Monoraphidium capricornutum* à PFOA e CYN individualmente

Os resultados de efeitos no crescimento de *Monoraphidium capricornutum* exposta aos tratamentos com contaminantes individualmente: CYN-AC (100 $\mu\text{g.L}^{-1}$); CYN-BC (50 $\mu\text{g.L}^{-1}$); PFOA-AC (2000 $\mu\text{g.L}^{-1}$) e PFOA-BC (1000 $\mu\text{g.L}^{-1}$) estão apresentados na Figura 5.1. Nos tratamentos com os contaminantes individuais, no quarto dia de exposição, não houve inibição significativa do crescimento ($p > 0,05$) em comparação ao grupo controle.

Durante as 96 horas de exposição, o tratamento CYN-AC apresentou o menor crescimento em comparação aos demais grupos, mas sem significância estatística. A partir do sexto dia de exposição, as concentrações mais altas de PFOA (2000 $\mu\text{g.L}^{-1}$) e de CYN (100 $\mu\text{g.L}^{-1}$) começaram a apresentar efeitos de inibição no crescimento, mostrando diferenças em relação ao controle. No entanto, ao longo do experimento, uma recuperação no crescimento foi observada, de modo que no 12º dia as diferenças em relação ao controle não eram mais significativas.

Observou-se que, no último dia de exposição, o tratamento CYN-BC (50 $\mu\text{g.L}^{-1}$) mostrou um crescimento ligeiramente maior em relação aos grupos. Por um lado, não foi estatisticamente significativo em relação ao grupo controle, mas foi significativamente maior ($p = 0,038$) do que o tratamento com concentração mais alta da cianotoxina, CYN-AC (100 $\mu\text{g.L}^{-1}$), que apareceu ter o crescimento mais afetado entre os tratamentos.

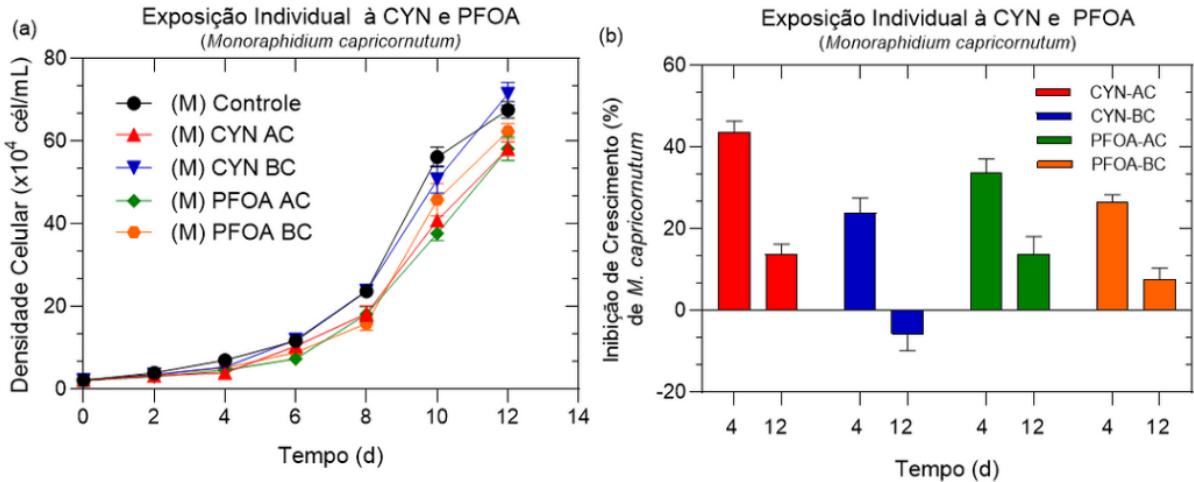


Figura 5.1: Densidade Celular (a) e Inibição de Crescimento (b) de *Monoraphidium capricornutum* expostas aos tratamentos: PFOA-AC ($2000 \mu\text{g.L}^{-1}$); PFOA-BC ($1000 \mu\text{g.L}^{-1}$); CYN-AC ($100 \mu\text{g.L}^{-1}$) e CYN-BC ($50 \mu\text{g.L}^{-1}$), individualmente, durante 12 dias. Os valores representam média \pm erro padrão (número amostral igual a 3).

As taxas de crescimento, divisão por dia e duplicação foram calculadas para os diferentes tratamentos individuais, conforme apresentados na Tabela 5.2. Os valores de taxa de crescimento (μ), taxa de divisões por dia (K) e taxa de duplicação (G) para *Monoraphidium capricornutum* exposta isoladamente a CYN e PFOA apresentam diferenças sutis entre os tratamentos no 12º dia de exposição. De modo geral, esses valores permanecem próximos aos do controle, indicando que as microalgas conseguiram se adaptar ao estresse causado pelos contaminantes testados.

Tabela 5.1: Valores calculados para a taxa de crescimento (μ), taxa de divisão por dia (K) e taxa de duplicação (G) para *Monoraphidium capricornutum* exposta a CYN e PFOA individualmente.

TRATAMENTO	TAXA DE CRESCIMENTO	TAXA DE DIVISÕES POR DIA	TAXA DE DUPLICAÇÃO
CONTROLE	0,2850	0,4112	2,4321
CYN-AC	0,2719	0,3923	2,5489
CYN-BC	0,2917	0,4208	2,3763
PFOA-AC	0,2659	0,3837	2,6064
PFOA-BC	0,2836	0,4091	2,4441

As cianobactérias podem atuar como organismos alelopáticos, ou seja, organismos que liberam substâncias químicas no ambiente que afetam o crescimento, desenvolvimento, sobrevivência ou reprodução de outros organismos ao seu redor (Béres *et al.*, 2015), embora seu papel ecológico em interações cianobactéria-alga seja em grande parte desconhecido. Nos resultados de ensaios de exposição individual, observou-se que a maior inibição ocorreu na concentração mais alta de cilindrospermopsina ($100 \mu\text{g.L}^{-1}$). Por outro lado, ao final dos 12 dias de exposição, quando a concentração de CYN era mais baixa ($50 \mu\text{g.L}^{-1}$), o

crescimento médio foi superior ao observado no controle. Contudo, a ausência de significância estatística nos dados pode estar relacionada ao tamanho amostral reduzido ($n=3$), sendo provável que, com um N amostral maior, o valor médio se aproximasse do crescimento observado no grupo controle.

Pinheiro *et al.* (2016) demonstraram que MC-LR e CYN, em exposições individuais, tiveram impactos diferentes nas taxas de crescimento de *Chlorella vulgaris* nas concentrações mais altas testadas, sendo a CYN a mais tóxica. Os autores (2016) observaram que a exposição à CYN em concentrações acima de 38,7 mg/L impacta significativamente o crescimento de *Chlorella vulgaris*, reduzindo suas taxas de crescimento após 4 e 7 dias. É importante ressaltar que, além dos efeitos tóxicos diretos das cianotoxinas, variáveis ambientais, como altas temperaturas e pH elevados, podem influenciar o crescimento das cianobactérias, favorecendo espécies como *R. raciborskii* (Singh, 1962). Essas condições ambientais podem criar um ambiente propício para a proliferação das cianobactérias, o que, por sua vez, pode resultar em maior exposição a cianotoxinas em organismos aquáticos. Embora o efeito tóxico de CYN e MC-LR dentro das células alvo seja bem documentado, os impactos das cianotoxinas nas espécies de fitoplâncton ainda são pouco compreendidos (Bittencourt *et al.*, 2016).

Quando poluentes entram no ambiente aquático, as microalgas são geralmente as primeiras a serem afetadas (Niu *et al.*, 2019), ressaltando sua relevância como bioindicadores, uma vez que são essenciais para manter a estabilidade da produtividade e do equilíbrio ecológico nesses ambientes. Os resultados mostraram uma maior inibição de crescimento nos primeiros quatro dias de exposição (Figura 5.2), tanto para a concentração mais alta de PFOA-AC (33,93%), quanto para a menor concentração de PFOA-BC (26,56%). No entanto, a inibição de crescimento foi revertida ao longo dos 12 dias, indicando que a *M. capricornutum* apresentou uma resposta de recuperação.

Além disso, nenhuma concentração de PFOA demonstrou estimular o crescimento de *M. capricornutum*; a ação foi sempre inibitória nos primeiros dias de exposição. No entanto, após 12 dias, a inibição foi revertida, e os resultados foram semelhantes aos do controle para os tratamentos com exposição individual. Liu *et al.* (2022) investigaram os efeitos dos PFAS (PFBS e FBSA) no crescimento da microalga *Chlorella pyrenoidosa* por 12 dias. O FBSA mostrou maior toxicidade, reduzindo a densidade celular e afetando a fotossíntese, enquanto o PFBS promoveu o crescimento em baixa concentração (100 ng.L^{-1}) antes de inibir o

desenvolvimento em níveis mais altos. Apesar da inibição temporária observada, os tratamentos empregados não inibiram o crescimento de *M. capricornutum* ao longo do tempo.

5.1.2 Exposição de *Monoraphidium capricornutum* à Mistura Binária (PFOA e CYN)

O crescimento de *Monoraphidium capricornutum* foi avaliado quando a mesma foi exposta à mistura binária em três diferentes cenários: (1) CYN-AC (100 $\mu\text{g.L}^{-1}$) + PFOA-BC (1000 $\mu\text{g.L}^{-1}$); (2) CYN-BC (50 $\mu\text{g.L}^{-1}$) + PFOA-AC (2000 $\mu\text{g.L}^{-1}$); e (3) CYN-AC (100 $\mu\text{g.L}^{-1}$) + PFOA-AC (2000 $\mu\text{g.L}^{-1}$), que estão apresentados graficamente na Figura 5.2. Embora os tratamentos tenham apresentado sinais de inibição do crescimento das microalgas ao longo do experimento, ao final dos 12 dias a densidade celular não apresentou diferença significativa em relação ao controle, com exceção do tratamento CYN-AC + PFOA-BC ($p < 0,05$). Nesse tratamento, mesmo havendo uma resposta mais variada no dia 4, houve diferença estatística ao final de 12 dias com inibição de crescimento de 30,10%. Para os outros tratamentos, assim como observado no experimento anterior, os resultados sugerem que a *M. capricornutum* possui uma capacidade de resposta ao contaminante, mesmo em cenários de exposição a misturas binárias, indicando uma recuperação do crescimento, a depender da concentração da mistura, após o período de exposição.

Nos resultados dos ensaios de misturas binárias, observou-se que a maior inibição ocorreu na mistura em que a concentração de cilindrospermopsina era mais alta (100 $\mu\text{g.L}^{-1}$) e a de PFOA mais baixa (1000 $\mu\text{g.L}^{-1}$), apresentando diferença significativa no final dos 12 dias de exposição. O crescimento demonstrou maior inibição sempre quando a CYN está em concentração mais elevada (Figura 5.2).

No entanto, ao analisar conjuntamente as duas maiores concentrações (CYN-AC + PFOA-AC), sugere-se um possível efeito antagônico, pois esse tratamento teve um valor médio de inibição de crescimento menor do que na mistura com PFOA-BC. Entretanto, é preciso uma avaliação mais aprofundada e com um maior número amostral.

Esses achados corroboram com os resultados obtidos por Bemquerer (2023), e reforçam a possibilidade de interações antagônicas, como as observadas entre CYN e o pesticida clorpirimifós em bioensaios com células humanas SH-SY5Y (Hinojosa *et al.*; Metcalf e Codd, 2020). Estudos também relataram um efeito antagônico entre bisfenóis e CYN em células HepG2, sugerindo que a combinação de CYN (500 $\mu\text{g.L}^{-1}$) e BPA (10.000 $\mu\text{g.L}^{-1}$) induziu

uma quantidade ligeiramente menor de quebras de DNA (DSBs) em comparação com CYN isolada, e essa diferença foi estatisticamente significativa com 72h de exposição. Isso é um indicativo que essa interação pode ter um efeito antagonista, ou seja, pode reduzir a indução de DSBs causada pela CYN, provavelmente através de algum mecanismo de interação entre as duas substâncias (Hercog *et al*, 2020; Metcalf e Codd, 2020).

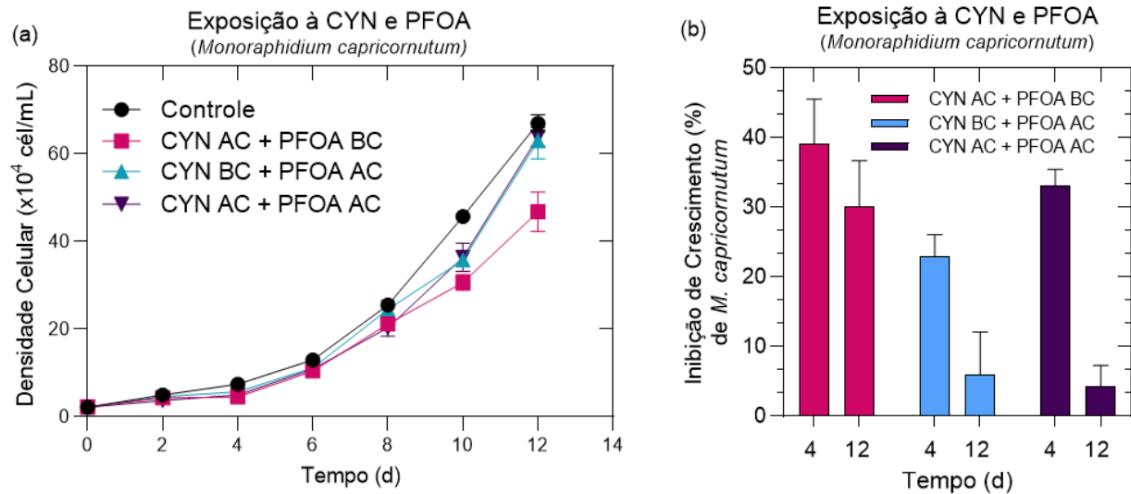


Figura 5.2: Densidade Celular (a) e Inibição no Crescimento (b) de *Monoraphidium capricornutum* quando expostas à mistura de PFOA e CYN: (1) CYN-AC ($100 \mu\text{g.L}^{-1}$) + PFOA-BC ($1000 \mu\text{g.L}^{-1}$); (2) CYN-BC ($50 \mu\text{g.L}^{-1}$) + PFOA-AC ($2000 \mu\text{g.L}^{-1}$); e (3) CYN-AC ($100 \mu\text{g.L}^{-1}$) + PFOA-AC ($2000 \mu\text{g.L}^{-1}$). Os valores representam média \pm erro padrão (número amostral igual a 3).

A taxa de crescimento, a taxa de divisões por dia e a taxa de duplicação foram calculadas para os diferentes tratamentos em mistura, conforme apresentado na Tabela 5.2. Os resultados indicam que, nos ensaios com misturas binárias, os valores de μ , K e G permaneceram relativamente próximos aos do controle no último dia de exposição. Embora o tratamento CYN-AC + PFOA-BC tenha apresentado uma taxa de crescimento ligeiramente menor em relação aos demais, os outros tratamentos exibiram valores semelhantes aos do controle, sugerindo que *Monoraphidium capricornutum* conseguiu se recuperar e manter seu crescimento mesmo na presença dos contaminantes combinados. Esses achados reforçam a hipótese de uma adaptação fisiológica eficiente frente à exposição prolongada às misturas.

Tabela 5.2: Valores calculados para a taxa de crescimento (μ), taxa de divisão por dia (K) e taxa de duplicação (G) para *Monoraphidium capricornutum* exposta à CYN e ao PFOA em mistura binária.

TRATAMENTO	TAXA DE CRESCIMENTO	TAXA DE DIVISÕES POR DIA	TAXA DE DUPLICAÇÃO
CONTROLE	0,2794	0,4030	2,4811
CYN-AC + PFOA-BC	0,2359	0,3404	2,9380
CYN-BC + PFOA-AC	0,2870	0,4140	2,4155
CYN-AC + PFOA-AC	0,2764	0,3987	2,5079

Alguns estudos têm investigado o efeito aditivo de misturas binárias de contaminantes. Pinheiro *et al.* (2016) que examinou os impactos de duas cianotoxinas (MC-LR e CYN) na taxa de crescimento da alga de água doce *Chlorella vulgaris*, revelando que a presença de MC-LR em concentrações 0,4–16,7 mg/L aumentou a toxicidade de CYN. O estudo sugeriu que esse efeito pode estar relacionado à inibição da síntese de proteínas e ao estresse oxidativo, mecanismos-chave da toxicidade da CYN. Além disso, Liu *et al.* (2022) avaliaram os efeitos da exposição a PFAS (PFBS e FBSA) no crescimento de *Chlorella pyrenoidosa* ao longo de 12 dias, utilizando concentrações entre 100 ng.L⁻¹ e 100 mg/L. O estudo indicou que a inibição do crescimento foi dependente da concentração, apresentando um efeito aditivo em concentrações mais altas (mg/L) e sinérgico em concentrações ambientais (ng.L⁻¹ – µg.L⁻¹). Os efeitos tóxicos foram atribuídos a disruptões na fotossíntese, aumento do estresse oxidativo e inibição da replicação do DNA. A mistura de PFBS e FBSA teve um impacto mais severo sobre o crescimento das microalgas do que os compostos individuais, reforçando a necessidade de avaliar misturas de contaminantes em vez de apenas poluentes isolados.

No presente estudo, embora as concentrações utilizadas possam ter causado inibição temporária do crescimento, elas não foram suficientemente tóxicas para impedir completamente o desenvolvimento de *M. capricornutum* ao longo do tempo. Zhao *et al.* (2015) destacaram que os mecanismos antioxidantes das microalgas podem ser ativados em resposta a exposições ambientalmente relevantes de contaminantes. Isso pode ocorrer mediante aumento da atividade enzimática e/ou regulação da fotossíntese e metabolismo (Hu *et al* 2023; Zhao *et al*, 2024) para garantir a sobrevivência em condições de estresse. No entanto, considerando os achados Liu *et al.* (2022) e Pinheiro *et al.* (2016), são necessárias investigações adicionais para compreender melhor como a CYN e os PFAS interferem no crescimento em diferentes concentrações e tempos de exposição, além de seus potenciais efeitos interativos nos ecossistemas aquáticos.

5.1.3. Efeitos de PFOA e CYN no Crescimento de Cultura Mista (*Monoraphidium capricornutum* e *Ankistrodesmus striptatus*)

A maior parte dos estudos ecotoxicológicos com microalgas são realizados com monoculturas, o que limita sua extração para sistemas reais (Lee, Jalalizadeh e Zhang, 2015) que envolvem diversas espécies em comunidades complexas (Stone *et al.*, 2019). As alterações na população de microalgas podem desencadear efeitos significativos em todo o

ecossistema. Portanto, há uma necessidade considerar a diversidade de espécies de microalgas e compreender os efeitos em um cenário mais realista (Lee, Jalalizadeh e Zhang, 2015).

Os resultados apresentados neste capítulo abordam três cenários distintos da cultura mista de *M. capricornutum* e *A. striptatus*, expostas as concentrações de PFOA ($2000 \mu\text{g.L}^{-1}$ e $1000 \mu\text{g.L}^{-1}$) e CYN ($100 \mu\text{g.L}^{-1}$ e $50 \mu\text{g.L}^{-1}$), são eles: (1) Cultura Mista sem Predominância de espécie; (2) Cultura Mista com Predominância de *M. capricornutum*; e (3) Cultura Mista com Predominância de *A. striptatus*.

5.1.3.1 Cenário 1: Cultura Mista Sem Predominância

O crescimento de *Monoraphidium capricornutum* e *Ankistrodesmus striptatus* foi avaliado durante 12 dias de exposição aos contaminantes CYN e PFOA individualmente (em duas diferentes concentrações) em um cenário sem predominância. Os resultados de densidade celular e inibição de crescimento estão apresentados nas Figuras 5.3 e 5.4, respectivamente. A densidade inicial do ensaio foi $0,51 \times 10^4$ cél/mL para *A. striptatus* e $0,48 \times 10^4$ cél/mL para *M. capricornutum*.

O crescimento das espécies *M. capricornutum* e *A. striptatus* não apresentou diferença estatisticamente significativa ($p>0,05$) no quarto dia (96h) de exposição nos seus respectivos grupos em relação ao controle. No entanto, no 12º dia a CYN-AC mostrou uma inibição significativa em relação ao controle e em relação à concentração mais baixa da mesma toxina (CYN-BC).

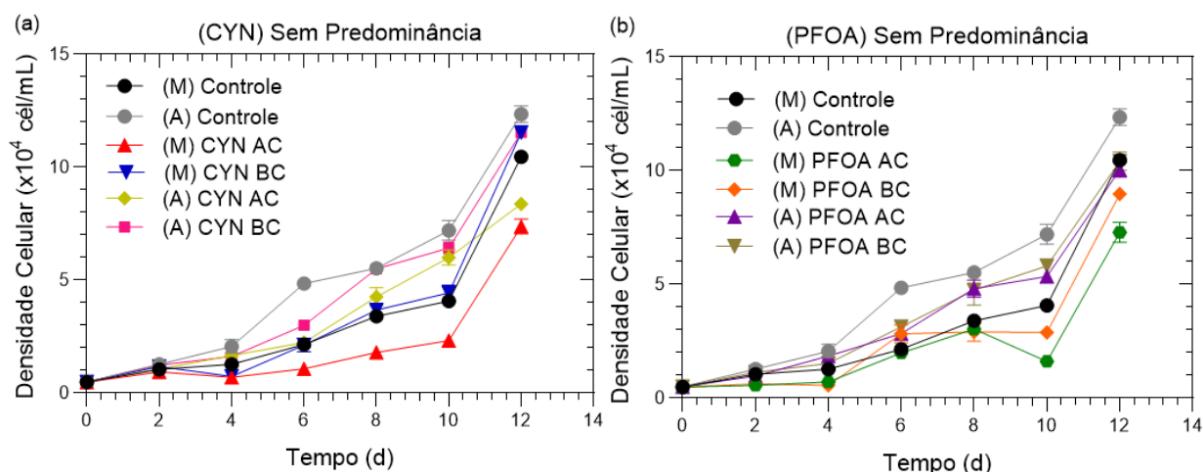


Figura 5.3: Densidade Celular de Cultura Mista (*Monoraphidium capricornutum* (M) e *Ankistrodesmus striptatus* (A)) em cenário sem predominância expostas aos tratamentos: CYN-AC ($100 \mu\text{g.L}^{-1}$); CYN-BC ($50 \mu\text{g.L}^{-1}$) - Figura (a); PFOA-AC ($2000 \mu\text{g.L}^{-1}$) e PFOA-BC ($1000 \mu\text{g.L}^{-1}$)

- Figura (b), individualmente, durante 12 dias. Os valores representam média \pm erro padrão (número amostral igual a 3).

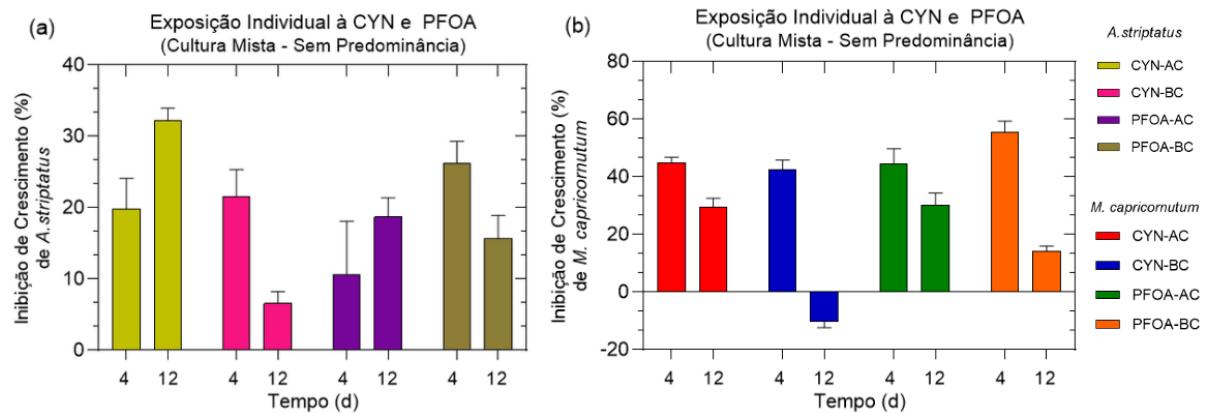


Figura 5.4: Inibição de Crescimento de Cultura Mista (*Monoraphidium capricornutum* e *Ankistrodesmus striptatus*) em cenário sem predominância expostas aos tratamentos: CYN-AC (100 $\mu\text{g.L}^{-1}$); CYN-BC (50 $\mu\text{g.L}^{-1}$); PFOA-AC (2000 $\mu\text{g.L}^{-1}$) e PFOA-BC (1000 $\mu\text{g.L}^{-1}$), individualmente, durante 12 dias. Figura (a): inibição de crescimento de *A. striptatus*; Figura (b) inibição de crescimento de *M. capricornutum*. Os valores representam média \pm erro padrão (número amostral igual a 3).

No sexto dia de exposição, *A. striptatus* apresentou um crescimento significativamente diferente para todos os tratamentos adotados. Após esse período, houve uma aparente adaptação no último dia de exposição, com exceção da concentração mais alta de CYN (CYN-AC), onde o crescimento ainda estava inibido significativamente.

No último dia de exposição (12º dia), observou-se que a maior concentração da cianotoxina (CYN-AC) teve um impacto significativo no crescimento tanto de *A. striptatus* quanto de *M. capricornutum*, comparado aos seus respectivos grupos controle. Esses resultados sugerem que a cilindrospermopsina, em altas concentrações e exposições prolongadas pode inibir o crescimento geral de diferentes espécies de microalgas (como *A. striptatus* e *M. capricornutum*), afetando a viabilidade dessas espécies em curto e longo prazo.

A cianotoxina teve um efeito diferenciado nas duas espécies estudadas: enquanto causou uma redução no crescimento de *M. capricornutum* na concentração mais alta, promoveu um estímulo ao crescimento na concentração mais baixa. Para a espécie *A. striptatus*, a cianotoxina não resultou em estímulo algum, mas apenas inibição do crescimento. Isso destaca a variabilidade na resposta de cada espécie ao mesmo contaminante, mesmo em concentrações iguais.

Os valores calculados para a taxa de crescimento (μ), taxa de divisão por dia (K) e taxa de duplicação (G) para *Monoraphidium capricornutum* e *Ankistrodesmus striptatus* expostas à

CYN e ao PFOA individualmente em cultura mista sem predominância estão apresentados nas Tabelas 5.3 e 5.4, respectivamente. De modo geral, as taxas avaliadas apresentaram variações pouco expressivas entre os tratamentos, sem alterações acentuadas em relação ao grupo controle, ao final de 12 dias, o que pode indicar que no final do período havia uma resposta de adaptação. No entanto, reduções nas taxas de crescimento foram observadas em ambas as microalgas na presença de CYN-AC no 12º dia.

Tabela 5.3: Valores calculados para a taxa de crescimento (μ), taxa de divisão por dia (K) e taxa de duplicação (G) para *Monoraphidium capricornutum* exposta à CYN e ao PFOA individualmente em cultura mista sem predominância.

TRATAMENTO	TAXA DE CRESCIMENTO	TAXA DE DIVISÕES POR DIA	TAXA DE DUPLICAÇÃO
CONTROLE	0,2544	0,3671	2,7243
CYN-AC	0,2260	0,3261	3,0669
CYN-BC	0,2611	0,3767	2,6543
PFOA-AC	0,2341	0,3377	2,9612
PFOA-BC	0,2454	0,3540	2,8249

Tabela 5.4: Valores calculados para a taxa de crescimento (μ), taxa de divisão por dia (K) e taxa de duplicação (G) para *Ankistrodesmus scriptatus* exposta à CYN e ao PFOA individualmente em cultura mista em cenário sem predominância.

TRATAMENTO	TAXA DE CRESCIMENTO	TAXA DE DIVISÕES POR DIA	TAXA DE DUPLICAÇÃO
CONTROLE	0,2606	0,3759	2,6600
CYN-AC	0,2350	0,3391	2,9491
CYN-BC	0,2578	0,3719	2,6886
PFOA-AC	0,2480	0,3578	2,7950
PFOA-BC	0,2569	0,3707	2,6980

5.1.3.2 Cenário 2: Cultura Mista com Predominância de *Monoraphidium capricornutum*

O crescimento de *Monoraphidium capricornutum* e *Ankistrodesmus scriptatus* foi avaliado durante 12 dias de exposição em um cenário com predominância de *M. capricornutum*, considerando as concentrações adotadas de PFOA e CYN. Os resultados de densidade celular e inibição de crescimento estão apresentados nas Figuras 5.5 e 5.6, respectivamente. A densidade inicial do ensaio foi $0,50 \times 10^4$ cél/mL para *A. scriptatus* e $1,44 \times 10^4$ cél/mL para *M. capricornutum*.

Após 12 dias de exposição, *M. capricornutum* começou predominando e manteve essa posição até o final do experimento. Nos experimentos anteriores, em que ambas as espécies iniciaram com densidades iguais, *M. capricornutum* perdeu sua vantagem competitiva, evidenciando a influência inicial na dinâmica entre as espécies. Tanto a CYN quanto o PFOA afetaram o crescimento das microalgas, com *Ankistrodesmus scriptatus* sendo significativamente inibida pelas concentrações mais altas (CYN-AC e PFOA-AC) no 12º

dia. Já o crescimento de *M. capricornutum* foi inibido de forma significativa apenas pelo tratamento CYN-AC ao final do experimento.

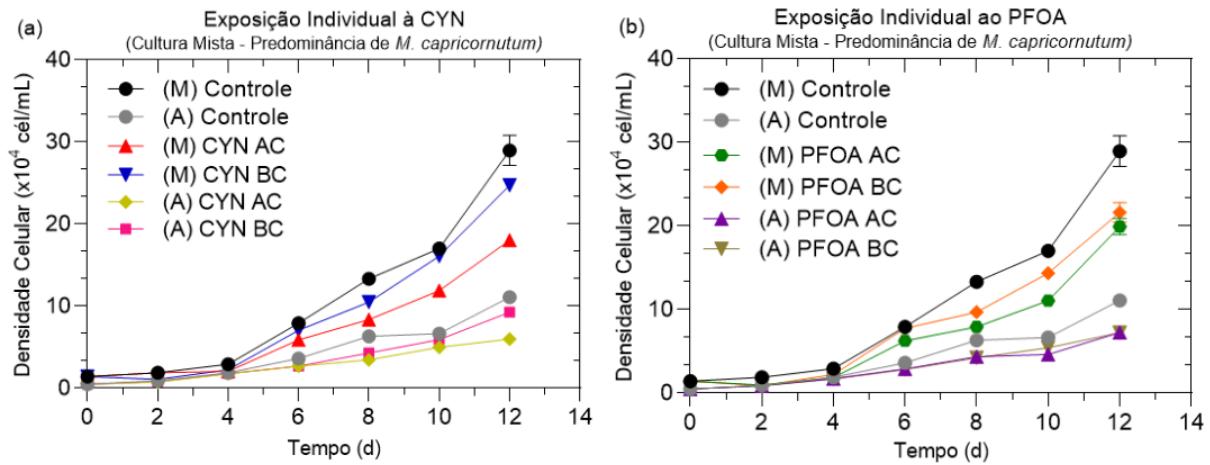


Figura 5.5: Densidade Celular de Cultura Mista (*Monoraphidium capricornutum* (M) e *Ankistrodesmus striptatus* (A)) em cenário com predominância de *M. capricornutum* expostas aos tratamentos: CYN-AC ($100 \mu\text{g.L}^{-1}$); CYN-BC ($50 \mu\text{g.L}^{-1}$) - Figura (a); PFOA-AC ($2000 \mu\text{g.L}^{-1}$) e PFOA-BC ($1000 \mu\text{g.L}^{-1}$) - Figura (b), individualmente, durante 12 dias. Os valores representam média \pm erro padrão (número amostral igual a 3).

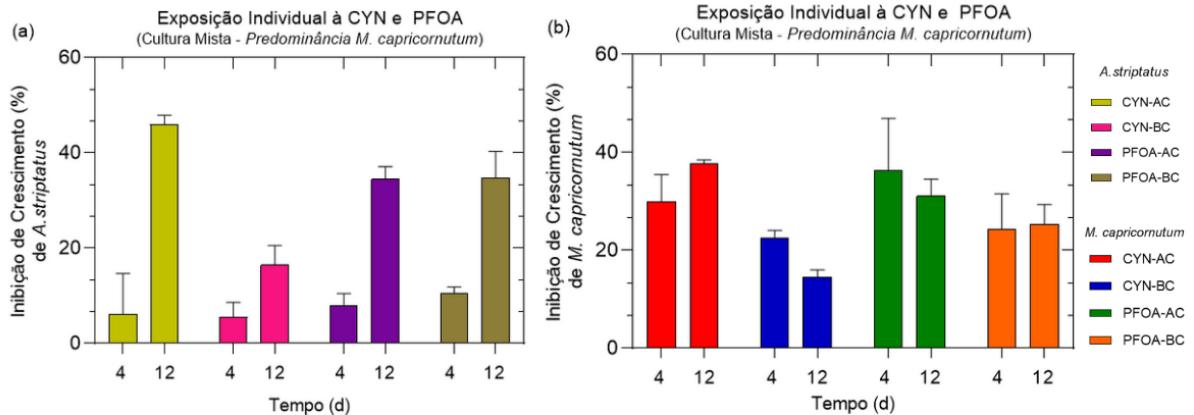


Figura 5.6: Inibição de Crescimento de Cultura Mista (*Monoraphidium capricornutum* e *Ankistrodesmus striptatus*) em cenário de predominância de *M. capricornutum* expostas aos tratamentos: CYN-AC ($100 \mu\text{g.L}^{-1}$); CYN-BC ($50 \mu\text{g.L}^{-1}$); PFOA-AC ($2000 \mu\text{g.L}^{-1}$) e PFOA-BC ($1000 \mu\text{g.L}^{-1}$), individualmente, durante 12 dias. Figura (a): inibição de crescimento de *A. striptatus*; Figura (b) inibição de crescimento de *M. capricornutum*. Os valores representam média \pm erro padrão (número amostral igual a 3).

Esses resultados sugerem que os contaminantes limitaram o desempenho competitivo de *A. striptatus* em cenários onde começou em desvantagem. A maior vulnerabilidade de *A. striptatus*, particularmente nas exposições às concentrações mais altas, reforça a influência da competição e dos poluentes na dinâmica entre as espécies.

Os valores calculados para a taxa de crescimento (μ), taxa de divisão por dia (K) e taxa de duplicação (G) para *Monoraphidium capricornutum* e *Ankistrodesmus striptatus* expostas à CYN e ao PFOA individualmente em cultura mista com predominância de *Monoraphidium capricornutum* estão apresentados nas Tabelas 5.5 e 5.6, respectivamente. Os resultados mostram uma maior taxa de crescimento no grupo controle e uma redução mais evidente nas taxas avaliadas para os grupos expostos à CYN-AC e PFOA-BC, impactando o crescimento de ambas as microalgas ao longo dos 12 dias.

Tabela 5.5: Valores calculados para a taxa de crescimento (μ), taxa de divisão por dia (K) e taxa de duplicação (G) para *Monoraphidium capricornutum* exposta à CYN e ao PFOA individualmente em cultura mista com predominância de *Monoraphidium capricornutum*.

TRATAMENTO	TAXA DE CRESCIMENTO	TAXA DE DIVISÕES POR DIA	TAXA DE DUPLICAÇÃO
CONTROLE	0,2544	0,3671	2,7244
CYN-AC	0,2114	0,3049	3,2796
CYN-BC	0,2351	0,3392	2,9482
PFOA-AC	0,2260	0,3261	3,0668
PFOA-BC	0,2345	0,3382	2,9565

Tabela 5.6: Valores calculados para a taxa de crescimento (μ), taxa de divisão por dia (K) e taxa de duplicação (G) para *Ankistrodesmus striptatus* exposta à CYN e ao PFOA individualmente em cultura mista em cenário com predominância de *Monoraphidium capricornutum*.

TRATAMENTO	TAXA DE CRESCIMENTO	TAXA DE DIVISÕES POR DIA	TAXA DE DUPLICAÇÃO
CONTROLE	0,2576	0,3716	2,6909
CYN-AC	0,2097	0,3025	3,3058
CYN-BC	0,2355	0,3398	2,9432
PFOA-AC	0,2176	0,3140	3,1850
PFOA-BC	0,2361	0,3406	2,9358

5.1.3.3 Cenário 3: Cultura Mista com Predominância *Ankistrodesmus striptatus*

O crescimento de *Monoraphidium capricornutum* e *Ankistrodesmus striptatus* foi avaliado durante 12 dias de exposição em um cenário com predominância de *A. striptatus*, considerando as concentrações adotadas de PFOA e CYN. Os resultados de densidade celular e inibição de crescimento estão apresentados nas Figuras 5.7 e 5.8, respectivamente. A densidade inicial do ensaio foi $0,98 \times 10^4$ cél/mL para *A. striptatus* e $0,52 \times 10^4$ cél/mL para *M. capricornutum*.

Após 12 dias de exposição, *A. striptatus* começou predominando e manteve essa posição ao final do experimento. A CYN mostrou efeitos mais intensos sobre *M. capricornutum*, com impacto significativo observado no 12º dia de exposição para ambas as concentrações (CYN-AC e CYN-BC). No caso de PFOA, ambas as concentrações (PFOA-AC e PFOA-BC) afetaram significativamente *M. capricornutum* no 4º dia, mas a espécie apresentou uma

recuperação ao final do experimento. Já *A. striptatus* sofreu inibição significativa em CYN-AC ao final do período de 12 dias.

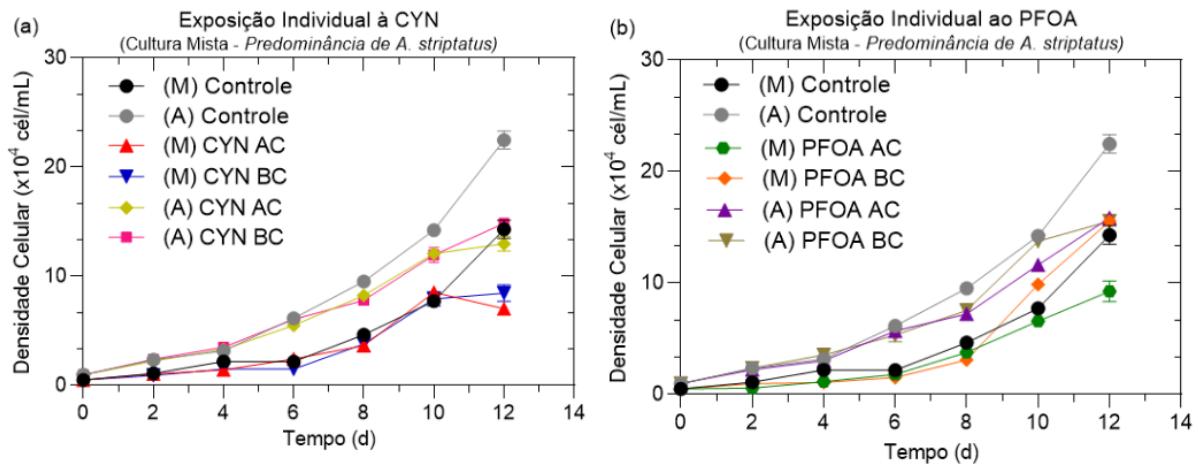


Figura 5.7: Densidade Celular de Cultura Mista (*Monoraphidium capricornutum* (M) e *Ankistrodesmus striptatus* (A)) em cenário com predominância de *A. striptatus* expostas aos tratamentos: CYN-AC ($100 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$); CYN-BC ($50 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$) - Figura (a); PFOA-AC ($2000 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$) e PFOA-BC ($1000 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$) - Figura (b), individualmente, durante 12 dias. Os valores representam média \pm erro padrão (número amostral igual a 3).

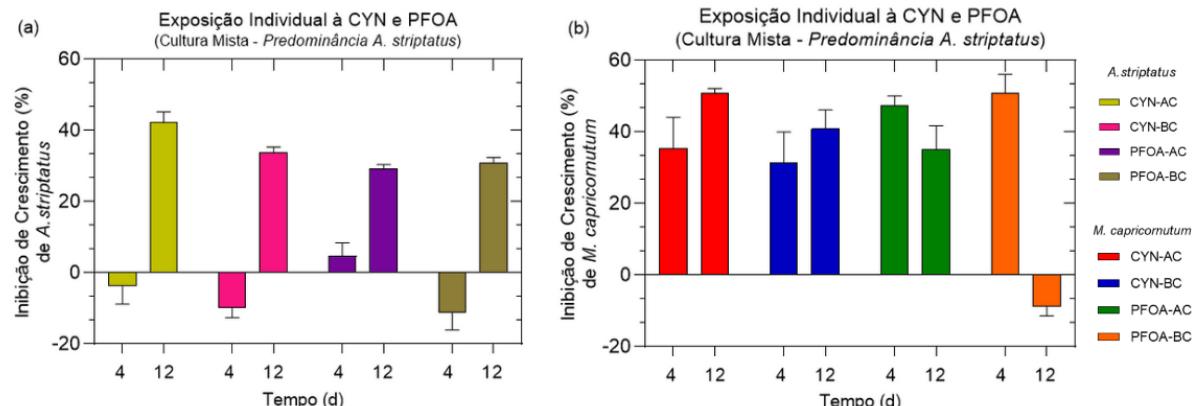


Figura 5.8: Inibição de Crescimento de Cultura Mista (*Monoraphidium capricornutum* e *Ankistrodesmus striptatus*) em cenário de predominância de *A. striptatus* expostas aos tratamentos: CYN-AC ($100 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$); CYN-BC ($50 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$); PFOA-AC ($2000 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$) e PFOA-BC ($1000 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$), individualmente, durante 12 dias. Figura (a): inibição de crescimento de *A. striptatus*; Figura (b) inibição de crescimento de *M. capricornutum*. Os valores representam média \pm erro padrão (número amostral igual a 3).

Os valores calculados para a taxa de crescimento (μ), taxa de divisão por dia (K) e taxa de duplicação (G) para *Monoraphidium capricornutum* e *Ankistrodesmus scriptatus* expostas à CYN e ao PFOA individualmente em cultura mista com predominância de *Ankistrodesmus scriptatus* estão apresentados nas Tabelas 5.7 e 5.8, respectivamente. É possível observar que os tratamentos com CYN e PFOA-AC geraram menor taxa de crescimento para ambas as microalgas. Enquanto a taxa de duplicação se mostrou menor em *M. capricornutum* no tratamento com PFOA-BC.

Tabela 5.7: Valores calculados para a taxa de crescimento (μ), taxa de divisão por dia (K) e taxa de duplicação (G) para *Monoraphidium capricornutum* exposta à CYN e ao PFOA individualmente em cultura mista com predominância de *Ankistrodesmus scriptatus*.

TRATAMENTO	TAXA DE CRESCIMENTO	TAXA DE DIVISÕES POR DIA	TAXA DE DUPLICAÇÃO
CONTROLE	0,2752	0,3970	2,5188
CYN-AC	0,2144	0,3093	3,2336
CYN-BC	0,2203	0,3178	3,1469
PFOA-AC	0,2245	0,3239	3,0877
PFOA-BC	0,2812	0,4057	2,4648

Tabela 5.8: Valores calculados para a taxa de crescimento (μ), taxa de divisão por dia (K) e taxa de duplicação (G) para *Ankistrodesmus scriptatus* exposta à CYN e ao PFOA individualmente em cultura mista em cenário com predominância de *Ankistrodesmus scriptatus*.

TRATAMENTO	TAXA DE CRESCIMENTO	TAXA DE DIVISÕES POR DIA	TAXA DE DUPLICAÇÃO
CONTROLE	0,2634	0,3801	2,6311
CYN-AC	0,2212	0,3192	3,1329
CYN-BC	0,2249	0,3244	3,0824
PFOA-AC	0,2317	0,3343	2,9911
PFOA-BC	0,2284	0,3295	3,0348

Os resultados apresentados sugeriram que diferentes cenários podem influenciar distintamente na inibição de crescimento das microalgas (Tabela 5.9). Houve inibição de crescimento devido à CYN-AC em ambas as espécies ao final do período de exposição para todos os cenários analisados. *A. scriptatus* apresentou um desempenho competitivo superior ao de *M. capricornutum*, especialmente no cenário sem predominância e no cenário com *A. scriptatus* predominando. O tratamento com CYN-AC pode ter intensificado o pior desempenho de *M. capricornutum*, o que sugere que a concentração da toxina fez diferença para essa espécie. No cenário com *M. capricornutum* predominando, os efeitos foram menos pronunciados, mas ainda assim a toxina impactou o crescimento. Quanto aos efeitos do PFOA, *M. capricornutum* se mostrou mais sensível ao contaminante. No 4º dia de exposição, o crescimento de *M. capricornutum* foi inibido nos tratamentos PFOA-AC e PFOA-BC quando estava no cenário com predominância de outra espécie. No entanto, essa inibição não se manteve no 12º dia, indicando uma possível recuperação. O PFOA-AC

também causou inibição em *A. striptatus* no 12º dia, quando esta estava no cenário com predominância de *M. capricornutum*.

Estudos sugerem que essas respostas distintas podem ser atribuídas à competição por recursos e à variabilidade entre as espécies na tolerância a estressores químicos. A exposição conjunta a contaminantes, especialmente aqueles com mecanismos de ação diversos, como o PFOA e a CYN, pode gerar interações aditivas ou sinérgicas, amplificando os efeitos ecotoxicológicos (Hu, 2020; Moraes *et al.*, 2022). Esse cenário reforça a importância de investigar misturas em sistemas mais complexos, já que os efeitos observados em culturas mistas refletem melhor as condições naturais, onde as interações ecológicas desempenham papel fundamental.

Tabela 5.9: Matriz de verificação para comparar diferenças estatisticamente significativas em relação ao grupo controle para cada tratamento adotado em diferentes cenários.

CENÁRIO	DIA 4 (96h)				DIA 12			
	CYN	CYN	PFOA	PFOA	CYN	CYN	PFOA	PFOA
	AC	BC	AC	BC	AC	BC	AC	BC
Sem Predominância	(A)				✓			
	(M)				✓			
Predominância de <i>Monoraphidium</i> <i>capricornutum</i>	(A)				✓		✓	
	(M)				✓			
Predominância de <i>Ankistrodesmus</i> <i>striptatus</i>	(A)				✓			
	(M)				✓	✓	✓	✓

Os resultados da cultura individual e da cultura com duas espécies de microalgas apresentaram resultados diferentes na exposição da mesma concentração dos mesmos contaminantes. Por outro lado, Stone *et al.* (2019) realizaram testes de toxicidade em três espécies de microalgas tropicais utilizando dois herbicidas com modos de ação distintos (Atrazina e Imazapic) e os autores apontaram que as taxas de crescimento populacional em culturas multiespécies foram semelhantes às observadas em testes com espécies individuais. No entanto, foi identificado que a atrazina foi significativamente mais tóxica que o imazapic para todas as espécies testadas, o que evidencia os diferentes mecanismos de ação desses herbicidas.

A fotólise e a biodegradação são os dois principais mecanismos responsáveis pela remoção da CYN em ambientes aquáticos. A biodegradação envolve a decomposição do composto por meio da ação de microrganismos, enquanto a fotólise consiste na degradação do contaminante pela

ação da luz, principalmente a radiação ultravioleta (UV) do sol. Embora a CYN seja relativamente estável em diversas condições de luz, calor e pH, a eficácia da fotólise pode variar significativamente, dependendo da intensidade solar e da composição química da água (De La Cruz *et al.*, 2013).

O estudo realizado por Wörmer *et al.* (2008) foi conduzido em condições laboratoriais durante um período de 40 dias. O estudo avaliou a biodegradação de cylindrospermopsina (CYN) produzida por *Aphanizomenon ovalisporum* utilizando comunidades bacterianas naturais provenientes de dois corpos d'água — um com exposição prévia à cianotoxina e outro sem essa exposição. Apesar do crescimento das bactérias e do consumo de carbono orgânico dissolvido (DOC), a CYN não sofreu degradação significativa em 40 dias. As concentrações se mantiveram acima de 90% do valor inicial, indicando que a biodegradação da CYN em laboratório é muito limitada ou inexistente, mesmo com diferentes fontes da toxina e exposição bacteriana prévia. Assim, conclui-se que a degradação de CYN ocorre principalmente por fotodegradação. Além disso, a degradação dessa molécula frequentemente produz metabólitos secundários (Liu *et al.*, 2022), como deoxycilindrospermopsina e 7-epicilindrospermopsina, sendo este último citotóxico (Weirich e Miller, 2014). Esses metabólitos podem ter efeitos adicionais nos organismos expostos, potencializando os efeitos adversos ao longo do tempo.

As cilindrospermopsinas provocam duas formas de toxicidade: uma imediata, que parece ser causada pela produção de um metabólito tóxico mediado pela enzima citocromo P-450, como observado em vertebrados, e outra mais gradual, que decorre da inibição da síntese proteica provocada por essa cianotoxina (Soares, 2009). O mecanismo de ação da cilindrospermopsina na inibição da síntese proteica é fundamental para entender como essa toxina afeta organismos expostos ao longo do tempo. Embora a inibição da síntese proteica seja provavelmente um efeito universal na maioria dos seres vivos, a presença de enzimas P-450 em microalgas e seu papel na ativação da toxina ainda não são completamente compreendidos, requerendo mais estudos para confirmar essa via de ação em organismos aquáticos.

A toxicidade do PFOA varia dependendo da espécie exposta ao contaminante e do estágio de vida dos organismos aquáticos (Santos, 2023). Os resultados do presente estudo demonstraram que o impacto de PFOA é maior nas microalgas que não está em condição prevalente, como demonstrado pelas espécies *A. striptatus* e *M. capricornutum* quando essas foram expostas às concentrações mais elevadas de PFOA. Além disso, algumas espécies

podem ser mais suscetíveis do que outras. No décimo segundo dia, houve uma inibição significativa nos tratamentos com CYN-AC e CYN-BC.

A suscetibilidade variada de espécies foi corroborada em outro estudo conduzido por Mojiri *et al.*, (2023). Os autores avaliaram duas espécies de microalgas (*C. vulgaris* e *S. obliquus*) expostas a diferentes concentrações de uma mistura de PFOS e PFOA. À medida que o tempo de exposição e a concentração de PFAS aumentaram de (1-7 dias e de 0,5-10 mg/L, respectivamente), a viabilidade celular, o conteúdo total de clorofila e o conteúdo de proteínas diminuíram. Essa redução foi notavelmente maior em *S. obliquus*, indicando que essa espécie de microalga foi mais afetada pelos PFAS do que *C. vulgaris*.

A bioacumulação verificada de substâncias PFASs, como PFOA tem enfatizado a necessidade de pesquisas sobre organismos aquáticos na base da cadeia alimentar, dado que isso pode afetar a transferência de energia e matéria para os níveis tróficos superiores e, consequentemente, desestruturar os ecossistemas aquáticos (Ma *et al.*, 2022). Os resultados destacam a complexidade das interações entre microalgas e o crescimento das diferentes espécies, evidenciando a importância de considerar não apenas a concentração e o tempo de exposição, mas também a resposta adaptativa das espécies e os mecanismos específicos de ação dos contaminantes.

5.2 ANÁLISES BIOQUÍMICAS

Neste capítulo, foram investigados os mecanismos bioquímicos possivelmente associados às respostas de crescimento da microalga *Monoraphidium capricornutum* descritas anteriormente. Dada a falta de entendimento sobre a toxicidade das misturas de compostos do grupo PFAS, como o PFOA, combinados à cianotoxina CYN, este trabalho analisou os efeitos dessas substâncias nos produtores primários aquáticos por meio de respostas bioquímicas. A literatura ainda carece de estudos que abordem os impactos combinados de diferentes classes de contaminantes em organismos aquáticos, especialmente no contexto de interações bioquímicas. Assim, esta seção busca conectar as alterações identificadas às respostas previamente observadas, contribuindo para uma visão mais integrada dos efeitos tóxicos do PFOA e da CYN, isolados e em combinação após 4 dias de exposição.

5.2.1 Resposta ao estresse oxidativo de *M. capricornutum* sob diferentes concentrações de PFOA e CYN

Neste capítulo, são discutidos os resultados das análises bioquímicas realizadas, incluindo a avaliação de enzimas antioxidantes e biomarcadores de estresse oxidativo. Os resultados obtidos revelam alterações nos parâmetros bioquímicos avaliados em resposta aos diferentes tratamentos. A concentração de glutationa reduzida (GSH) e a atividade da glutationa S-transferase (GST) apresentaram alterações significativas, especialmente nas misturas de CYN e PFOA. A atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD) e catalase demonstrou um padrão variável. Além disso, a peroxidação lipídica, medida pela concentração de malondialdeído (MDA), e a carbonilação de proteínas indicaram níveis diferenciados de danos oxidativos, sugerindo que a interação entre os contaminantes pode amplificar ou atenuar as respostas celulares.

5.2.2.1 Atividade da Glutationa S-Transferase (GST) e concentração de Glutationa (GSH)

A atividade de glutationa S-transferase (GST) de *M. capricornutum* no tratamento de exposição individual PFOA-AC e as misturas CYN-AC + PFOA-BC e CYN-BC + PFOA-AC apresentou diferença significativa em relação ao grupo controle (Figura 5.9). A redução na atividade de GST nesses grupos pode ser interpretada como uma consequência do estresse oxidativo sofrido pelas células, gerando uma menor capacidade de metabolizar e eliminar substâncias tóxicas ou oxidativas. Como GST catalisa a ligação do GSH a compostos xenobióticos, essa redução compromete a detoxificação e excreção do PFOA e da CYN (Mazari *et al.*, 2023; Soares, 2009).

Embora os níveis de GSH tenham aumentado significativamente, indicando uma resposta compensatória ao estresse oxidativo, a atividade da GST foi reduzida. No entanto, como a GST não atua diretamente na neutralização das espécies reativas de oxigênio (ROS), esse aumento de GSH provavelmente está associado à sua participação na via da glutationa peroxidase (GPx), responsável pela degradação do peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Assim, a célula pode estar priorizando a ativação da GPx para mitigar o acúmulo de peróxidos. A inibição da GST pode comprometer a conjugação de GSH com xenobióticos, dificultando a eliminação dos contaminantes e prolongando sua permanência no organismo, o que pode potencializar seus efeitos tóxicos ao longo do tempo. Por outro lado, o aumento de GSH, sem seu consumo pela GST, sugere que essa molécula esteja sendo reciclada na via de redução/oxidação via glutationa redutase (GR), tornando-se disponível para a GPx. Esse

processo pode indicar um acúmulo excessivo de peróxidos, reforçando a hipótese de que o sistema antioxidante está sobrecarregado e insuficiente para neutralizar completamente o estresse oxidativo gerado pela exposição aos contaminantes (Mao *et al.*, 2023; Campos *et al.*, 2013; Mazari *et al.*, 2023; Kumar e Trevedi, 2018; Zhao *et al.*, 2023).

Nos tratamentos de mistura (CYN-HC + PFOA-LC e CYN-LC + PFOA-HC), foi observada uma redução significativa da GST, acompanhada por um aumento na concentração de GSH, sugerindo que houve síntese celular de GSH. Esse aumento pode ser um mecanismo compensatório para neutralizar os ROS gerados pela exposição às misturas, funcionando como uma tentativa de proteção contra danos oxidativos (Hong, Boiti e Foulkes, 2024).

Entretanto, mesmo com níveis elevados de GSH, enzimas detoxificantes como a GST podem ser comprometidas pelo excesso de ROS, resultando em danos estruturais e funcionais. Esse cenário pode levar a uma redução da atividade enzimática, apesar da maior demanda por detoxificação (Mao *et al.*, 2023; Campos *et al.*, 2013).

Apesar dos dados não terem indicado estatisticamente que individualmente os contaminantes causem efeitos em GST e concentração de GSH, é necessário confirmar esses resultados em novas análises com um tamanho amostral maior. Como exemplo, os resultados obtidos por Campos *et al* (2013) na microalga *C. vulgaris*, onde a atividade das enzimas GST e GPx aumentou na concentração de CYN igual a $18,4 \mu\text{g.L}^{-1}$ e diminuiu a $179 \mu\text{g.L}^{-1}$, reforçando a ideia de que a CYN individualmente pode induzir estresse oxidativo em *M. capricornutum*.

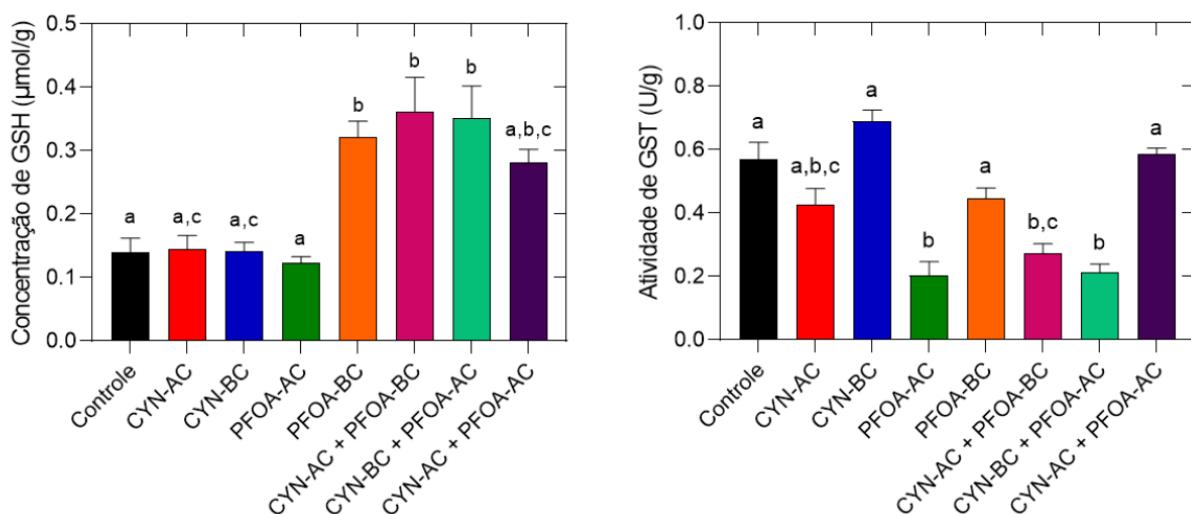


Figura 5.9: Concentração de Glutationa (à esquerda) e Atividade de Glutationa S-transferase (à direita) em Condições Experimentais: (1) Controle; (2) Exposição Individual de PFOA e CYN (PFOA-AC: $2000 \mu\text{g.L}^{-1}$; PFOA-BC: $1000 \mu\text{g.L}^{-1}$; CYN-AC: $100 \mu\text{g.L}^{-1}$; CYN-BC: $50 \mu\text{g.L}^{-1}$; e (3)

Exposição de Mistura Binária de PFOA e CYN (I) CYN-AC: 100 $\mu\text{g.L}^{-1}$ + PFOA-BC: 1000 $\mu\text{g.L}^{-1}$; (II) CYN-BC: 50 $\mu\text{g.L}^{-1}$ + PFOA-AC: 2000 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (III) CYN-AC: 100 $\mu\text{g.L}^{-1}$ + PFOA-AC: 2000 $\mu\text{g.L}^{-1}$). As letras diferentes indicam diferença significativa ($p<0,05$). *Os valores representam média \pm erro padrão (n=3).*

Os resultados gerais sugerem que as células estão enfrentando estresse oxidativo significativo, como evidenciado pela análise combinada de GST e GSH. O excesso de EROS excede a capacidade antioxidante celular, prejudicando o desempenho da GST e indicando falhas no sistema detoxificante sob estresse intenso (Mazari *et al.*, 2023; Kumar e Trevedi, 2018). O aumento de GSH, combinado à redução na atividade da GST, reflete uma sobrecarga no sistema antioxidante, com possíveis inativações ou modificações da GST por EROS (Mazari *et al.*, 2023; Hong, Boiti e Foulkes, 2024).

Essas conclusões se tornam mais expressivas quando são observadas as misturas dos contaminantes em estudo (CYN-AC + PFOA-BC e CYN-BC + PFOA-AC), refletindo uma complexa interação entre as vias de defesa antioxidante. No tratamento com PFOA-AC, uma significativa diminuição na GST e nenhuma mudança na GSH foram observados, o que sugere um grau de estresse oxidativo que impede a resposta de aumento de síntese de GSH. Por outro lado, o PFOA-BC aumentou significativamente a concentração de GSH, sugerindo que a célula está ativando mecanismos de defesa, o que indica sua capacidade de sintetizar GSH nas concentrações mais baixas desse contaminante (Mao *et al.*, 2023; Mazari *et al.*, 2023).

5.2.2.2 Atividade de Superóxido Dismutase (SOD) e de Catalase (CAT)

A superóxido dismutase (SOD) atua como a primeira linha de defesa antioxidante da microalga, catalisando a conversão de ânions superóxido ($\text{O}_2\cdot^-$) em peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Em seguida, o H_2O_2 é decomposto em água e oxigênio por enzimas como a catalase, a peroxidase de glutatona e as peroxirredoxinas (Hong, Boiti e Foulkes, 2024). A catalase, em particular, desempenha um papel crucial na eliminação do peróxido de hidrogênio, prevenindo seu acúmulo e protegendo as células contra danos oxidativos.

Nos resultados obtidos, a atividade de superóxido dismutase e atividade catalase apresentaram uma considerável variação, resultando em uma ampla dispersão dos valores obtidos (Figura 5.10). Apesar disso, a ativação de CAT se mostrou mais pronunciada nos tratamentos CYN-AC; CYN-AC + PFOA-BC e CYN-BC + PFOA-AC, sendo mais evidenciada para este último. Enquanto as altas concentrações de ácido perfluorooctanoico,

tanto individualmente (PFOA-AC), quanto em mistura (CYN-BC + PFOA-AC e CYN-AC + PFOA-AC), sugerem uma possível maior ativação da SOD, observado na Figura 5.10.

Estudos demonstram que a modulação da atividade da SOD e CAT em microalgas é influenciada pela concentração dos contaminantes, tempo de exposição e respostas específicas de cada espécie. Niu *et al.* (2019) relataram um aumento na atividade da SOD em *Chlorella sp.* exposta a PFAS, enquanto CAT e SOD foram inibidas, sugerindo um desequilíbrio nas defesas antioxidantes. Zhao *et al.* (2023) observaram que a coexposição ao PFOA e microplásticos de poliestireno (PS-MPs) intensificou o estresse oxidativo em *Chlorella sorokiniana*, alterando a resposta enzimática antioxidante. Os resultados de Xu *et al.* (2013) indicam que a exposição prolongada a altas concentrações de PFOA (30–120 mg/L) levou a mudanças significativas na atividade da SOD e CAT em *Chlorella pyrenoidosa* e *Selenastrum capricornutum*, reforçando que as respostas ao estresse oxidativo são dependentes da concentração. Xu *et al.* (2013) demonstraram que as concentrações mais altas de PFOA (207,46 mg/L) causaram uma geração excessiva de EROS, aumentando a atividade de SOD em *Chlorella pyrenoidosa*, resultando em danos oxidativos e causando permeabilidade da célula. No presente estudo, as concentrações de PFOA-AC (2 mg/L ou 2000 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) e PFOA-BC (1 mg/L ou 1000 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) também resultaram em aumento da atividade de SOD. Apesar de serem muito inferiores às empregadas por Xu *et al.* (2013) e de envolverem uma espécie distinta, os resultados indicaram uma ativação enzimática semelhante.

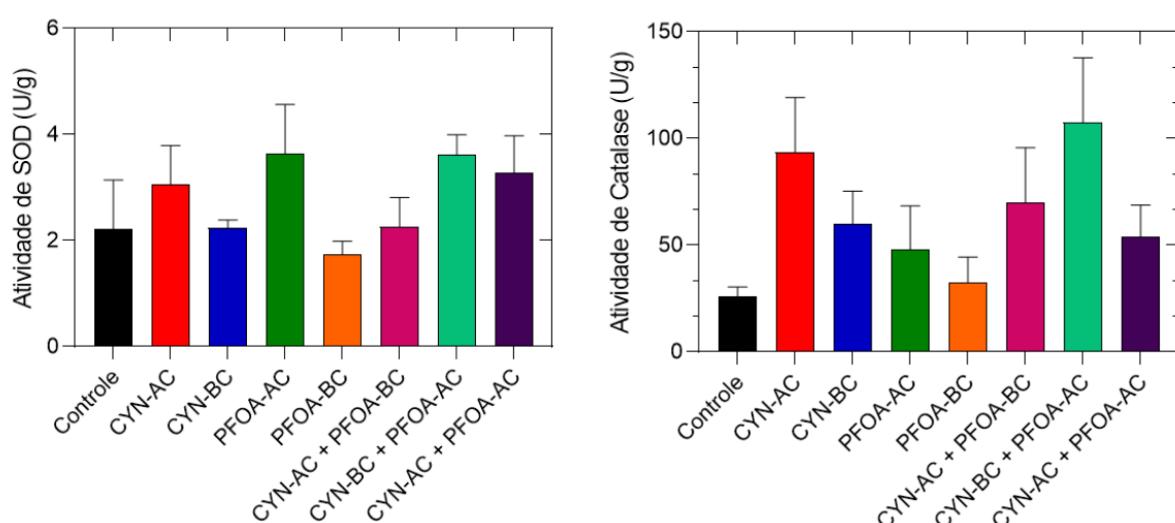


Figura 5.10: Atividade de Superóxido Dismutase (à esquerda) e Atividade de Catalase (à direita) em Condições Experimentais: (1) Controle; (2) Exposição Individual de PFOA e CYN (PFOA-AC: 2000 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$; PFOA-BC: 1000 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$; CYN-AC: 100 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$; CYN-BC: 50 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$); e (3) Exposição de Mistura Binária de PFOA e CYN (I) CYN-AC: 100 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ + PFOA-BC: 1000 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$; (II) CYN-

BC: 50 $\mu\text{g.L}^{-1}$ + PFOA-AC: 2000 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (III) CYN-AC: 100 $\mu\text{g.L}^{-1}$ + PFOA-AC: 2000 $\mu\text{g.L}^{-1}$). Os valores representam média \pm erro padrão ($n=3$). Não houve diferença significativa entre os tratamentos ($p>0,05$).

Além disso, Zhao *et al* (2023) observaram que as atividades de SOD e CAT aumentaram proporcionalmente com a concentração crescente de PFOA, sendo que a exposição a PFOA (5 mg/L), assim como os grupos de coexposição, resultaram em atividades significativamente mais elevadas dessas enzimas em relação ao controle ($p < 0,05$).

A maior concentração de cilindrospermopsina (CYN-AC) indicou um aumento na atividade de SOD, mas não houve significância estatística. Esses resultados corroboram os achados de Campos *et al.* (2013), que, ao utilizarem concentrações ambientalmente relevantes de CYN, observaram a ausência de efeitos inibitórios de crescimento e de alterações bioquímicas significativas em certas espécies de fitoplâncton marinho e de água doce. No entanto, no presente estudo, uma possível ativação da SOD só foi evidenciada na maior concentração (CYN-AC: 100 $\mu\text{g.L}^{-1}$), sugerindo que respostas oxidativas mais marcantes estão associadas a níveis elevados dessa toxina.

As espécies de fitoplâncton respondem de maneira variada à CYN dependendo das condições ambientais. Chia *et al* (2017) mostraram que a presença de CYN aumentou a atividade de SOD em *Microcystis aeruginosa*, independentemente das condições de luz e nitrogênio. Em *Acutodesmus acuminatus*, a atividade de SOD foi inibida sob luz ótima e foi aumentada sob luz limitada em concentrações diferentes de CYN (10-50 $\mu\text{g.L}^{-1}$). Em relação à catalase, no tratamento CYN-AC, um possível aumento na atividade de catalase foi evidenciado em relação ao controle e ao tratamento CYN-BC, sugerindo que a presença de CYN pode ter induzido um estresse oxidativo, que resultou em uma resposta antioxidante. A catalase atua na decomposição do peróxido de hidrogênio gerado pela SOD (Hong, Boiti e Foulkes, 2024), indicando que, mesmo que a SOD não tenha sido fortemente ativada pela CYN, a catalase pode ter respondido ao peróxido gerado por outros processos de desequilíbrio oxidativo nas células afetadas pela toxina.

A exposição ao PFOA, nos grupos PFOA-AC e PFOA-BC, também parece ter havido uma resposta antioxidante, embora menos pronunciada que a observada com a CYN isolada. Nas combinações de CYN e PFOA, especialmente em CYN-BC + PFOA-AC, observa-se uma atividade de catalase maior que nos tratamentos isolados, o que poderia sugerir um aumento na demanda antioxidante devido à combinação dos contaminantes.

Os resultados obtidos destacam a diferença entre os mecanismos de ação dos contaminantes, afetando as enzimas de formas diferentes. A cilindrospermopsina é uma toxina que interfere na síntese proteica e pode causar danos ao fígado e outros órgãos em organismos vertebrados (De La Cruz *et al.*, 2013). Em microalgas, sua exposição pode principalmente levar ao acúmulo de EROs, indicando o estresse oxidativo e forçando a ativação da catalase (Chia *et al.*, 2017; Campos *et al.*, 2013). Isso explica a alta atividade de CAT nos grupos contendo CYN, tanto individualmente como em mistura.

O PFOA é um composto orgânico persistente que pode induzir a produção de espécies reativas de oxigênio, incluindo superóxidos, contribuindo para o estresse oxidativo em células. Além disso, o PFOA promove a peroxidação lipídica, comprometendo a integridade das membranas celulares e intensificando os danos oxidativos. Esses processos resultam em um aumento na atividade de enzimas antioxidantes, como a SOD (Zhao *et al.*, 2023). Isso é observado na maior resposta da SOD nos grupos expostos ao PFOA-AC.

5.2.2.3 Marcadores de Peroxidação Lipídica e Quantificação de Proteínas Carboniladas

Os resultados obtidos demonstraram que a carbonilação de proteínas foi significativamente maior entre os três tratamentos com mistura (CYN-AC + PFOA-BC, CYN-BC + PFOA-AC e CYN-AC + PFOA-AC) em comparação com o grupo controle. O tratamento com a menor concentração individual de PFOA (PFOA-BC) também demonstrou diferença estatisticamente significativa na carbonilação de proteínas, observado na Figura 5.11.

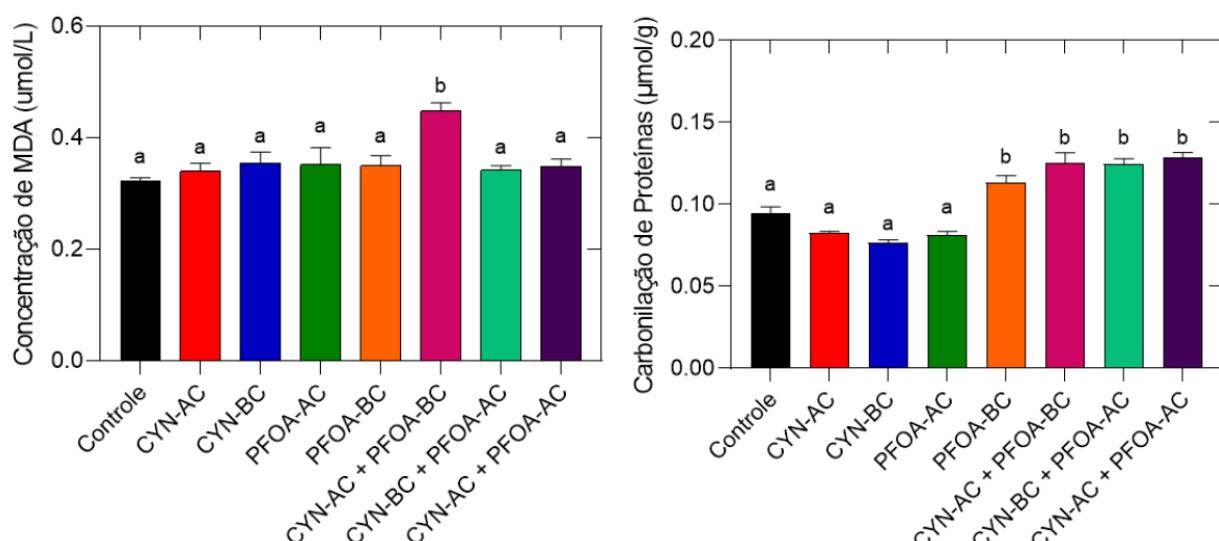


Figura 5.11: Concentração de Malondialdeído (à esquerda) Carbonilação de Proteínas (à direita) em Condições Experimentais: (1) Controle; (2) Exposição Individual de PFOA e CYN (PFOA-AC: 2000 $\mu\text{g.L}^{-1}$; PFOA-BC: 1000 $\mu\text{g.L}^{-1}$; CYN-AC: 100 $\mu\text{g.L}^{-1}$; CYN-BC: 50 $\mu\text{g.L}^{-1}$; e (3) Exposição de Mistura Binária de PFOA e CYN (I) CYN-AC: 100 $\mu\text{g.L}^{-1}$ + PFOA-BC: 1000 $\mu\text{g.L}^{-1}$; (II) CYN-

BC: 50 $\mu\text{g.L}^{-1}$ + PFOA-AC: 2000 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (III) CYN-AC: 100 $\mu\text{g.L}^{-1}$ + PFOA-AC: 2000 $\mu\text{g.L}^{-1}$). As letras diferentes indicam diferença significativa ($p<0,05$). Os valores representam média \pm erro padrão ($n=3$).

As proteínas carboniladas são um marcador importante de danos oxidativos em proteínas e podem se formar pelo ataque direto por EROs, que oxidam aminoácidos suscetíveis, como prolina, arginina, lisina e treonina. Esse processo afeta a estrutura tridimensional das proteínas, prejudica sua função e as torna mais suscetíveis à degradação. Um segundo tipo de dano protéico envolve a ligação com produtos da peroxidação lipídica, como malondialdeído (MDA) e 4-hidroxinonenal (4-HNE), que se ligam covalentemente às proteínas (Madian e Regnier, 2010; Weng *et al.*, 2017; Colombo *et al.*, 2018). Apesar desse segundo processo causar danos oxidativos e modificar a estrutura proteica, ele não é considerado carbonilação de proteínas no sentido estrito, mas uma consequência do estresse oxidativo. Dessa forma, esses processos interferem na função proteica, aceleram o acúmulo de proteínas danificadas e comprometem a integridade celular. E a presença de proteínas carboniladas indica danos que podem comprometer as funções metabólicas e a viabilidade celular (Marques, 2019).

A peroxidação lipídica de *M. capricornutum*, avaliada pelos níveis de malondialdeído (MDA), não apresentou variações significativas, exceto no tratamento com a mistura CYN-AC + PFOA-BC. O MDA, marcador indireto de estresse oxidativo, reflete o grau de peroxidação lipídica nas células ou tecidos (Rezayan, Niknam e Ebrahimzadeh, 2019). O aumento significativo de MDA nesse tratamento sugere um maior estresse oxidativo e danos aos lipídios das membranas celulares (Zhao *et al.*, 2023).

Os resultados de CYN-AC + PFOA-BC apontam um possível desequilíbrio entre a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) e a capacidade antioxidante das células, frequentemente associado ao aumento de MDA. Os lipídios desempenham papéis essenciais na estrutura e função das membranas celulares, como a regulação da permeabilidade e o transporte de substâncias, e a alteração nos lipídios podem comprometer vias metabólicas e de sinalização (Yang *et al.*, 2021; Hu *et al.*, 2014) causando consequências negativas para a microalga *M. capricornutum*.

Hu, Luo e Huang (2014) observaram um aumento significativo no conteúdo de MDA nas algas *Chlamydomonas reinhardtii* e *Scenedesmus obliquus* expostas ao PFOA por oito dias, em concentrações de 20 mg/L e 40 mg/L, valores superiores aos utilizados no presente

estudo. Os resultados obtidos pelos autores (2014) indicaram danos celulares associados ao estresse oxidativo, refletidos pela intensificação da peroxidação lipídica, um processo que compromete a integridade estrutural da célula devido ao excesso de EROs. No presente estudo, embora tenham sido avaliadas respostas ao estresse oxidativo, a peroxidação lipídica não foi detectada, sugerindo a atuação de mecanismos distintos de dano oxidativo.

Embora não existam estudos que investiguem especificamente a combinação entre PFOA e CYN, pesquisas com outras misturas de contaminantes oferecem pistas relevantes. Zhao *et al.* (2023) demonstraram que a exposição simultânea ao PFOA e a microplásticos de poliestireno (PS-MPs) por 96 horas aumentou a toxicidade, incluindo estresse oxidativo e danos celulares, em comparação com a exposição isolada dos poluentes. Esses resultados indicam que a coexposição a diferentes agentes pode intensificar o estresse celular, sugerindo que a combinação entre CYN e PFOA também pode promover efeitos sinérgicos, agravando o estresse oxidativo e os danos físicos nas células. Essa interação é corroborada e evidenciada pelos resultados de carbonilação de proteínas obtidos, onde todos os tratamentos que envolveram a mistura dos dois contaminantes (PFOA e CYN) apresentaram um aumento significativo em relação ao grupo controle.

Os resultados bioquímicos apresentados demonstraram uma resposta significativa das microalgas ao estresse oxidativo induzido por PFOA e CYN. A ativação de sistemas antioxidantes, como o aumento na síntese de GSH e o possível aumento de atividade de SOD e CAT em vários cenários, sugere que essas espécies possuem mecanismos de defesa que contribuem para sua sobrevivência inicial. Essa capacidade adaptativa pode estar diretamente ligada à recuperação do crescimento celular em diversos cenários ao final de 12 dias. No entanto, foi possível observar que os contaminantes causam dano celular, sobretudo quando em mistura. Esses resultados apontam para impactos que podem influenciar negativamente a sobrevivência dessas espécies em ambientes naturais. Esses achados destacam o equilíbrio entre as respostas antioxidantes e os danos induzidos pelos contaminantes, ressaltando a necessidade de estudos adicionais sobre os mecanismos envolvidos e suas implicações ecológicas.

O presente trabalho ressalta a complexidade das respostas biológicas a agentes estressores e a necessidade de considerar cuidadosamente os efeitos de diferentes concentrações em estudos ecotoxicológicos. A toxicidade do PFOA e seus efeitos adversos sobre as microalgas ainda são pouco compreendidos (Hu *et al.*, 2020). Além disso, devido à sua

natureza hidrofílica e estabilidade química, a CYN pode persistir na água por várias semanas a meses (Fadel *et al.*, 2014). Assim, é fundamental avaliar seus efeitos ao longo do tempo, pois esses efeitos também são pouco conhecidos (Pinheiro *et al.*, 2016), bem como seus efeitos interativos. Portanto, são necessárias mais investigações para preencher as lacunas existentes sobre essas questões.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados obtidos neste estudo reforçam e complementam achados prévios sobre os efeitos adversos da cilindrospermopsina (CYN) e do ácido perfluorooctanoico (PFOA) no crescimento de microalgas (Pietsch *et al.*, 2001; Chia *et al.*, 2017), evidenciando que diferentes espécies respondem de maneira distinta a esses contaminantes. A maior toxicidade da CYN para *Monoraphidium capricornutum* e do PFOA para *Ankistrodesmus striptatus* ressalta a importância de considerar as especificidades das espécies, os mecanismos de ação e a duração da exposição ao avaliar o impacto de contaminantes em ecossistemas aquáticos.

Além disso, os experimentos com culturas mistas indicaram que os efeitos dos contaminantes afeta a competição entre espécies, levando à supressão de espécies menos predominantes, alterando a dinâmica e biodiversidade aquática. Esses resultados reforçam o impacto dos poluentes na modificação das interações ecológicas, com potenciais implicações para toda a cadeia alimentar.

A análise das respostas antioxidantes evidenciou o impacto do estresse oxidativo causado tanto pela CYN quanto pelo PFOA. A atividade das enzimas antioxidantes, como SOD e CAT, bem como os aumentos nas concentrações de GSH, indicam que a microalga depende dos mecanismos antioxidantes para enfrentar os danos causados por esses contaminantes. Além disso, a resposta da glutationa (GSH) e a redução na atividade de GST em algumas combinações (CYN-AC + PFOA-BC e CYN-BC + PFOA-AC), além de PFOA-AC isoladamente, indicam um estado celular alterado, sugerindo uma sobrecarga na capacidade de detoxificação e a possível limitação nos sistemas de defesa antioxidante.

Embora os resultados reforcem a complexidade das interações entre contaminantes, também destacam a necessidade de se investigar os efeitos combinados de poluentes de diferentes classes, como cianotoxinas e PFAS, em vez de se limitar a estudos de misturas dentro da mesma classe química (Liu *et al.*, 2022). Os achados deste estudo representam um avanço importante nesse sentido, ao explorar os efeitos interativos da CYN e do PFOA, contaminantes comumente encontrados em ambientes aquáticos.

Entretanto, para uma compreensão mais completa dos mecanismos de toxicidade e dos efeitos desses poluentes no metabolismo e crescimento de microalgas, é necessário expandir a pesquisa, incluindo análises adicionais como a expressão gênica. Isso permitirá elucidar de

forma mais detalhada os processos biológicos envolvidos, melhorando a compreensão dos riscos ecológicos associados à presença dessas substâncias nos ecossistemas aquáticos.

A importância do monitoramento da poluição aquática é ainda mais evidente, dado o risco de bioacumulação e os impactos a longo prazo de substâncias como PFOA e CYN, que podem afetar não apenas organismos como as microalgas, mas toda a cadeia alimentar aquática (Barry *et al.*, 2013; Mao *et al.*, 2023). A interação entre esses contaminantes pode alterar a estrutura das comunidades aquáticas, comprometendo a biodiversidade e a funcionalidade dos ecossistemas.

O presente estudo também aponta para a necessidade de ajustes nos protocolos experimentais, sugerindo um aumento no número de réplicas e a consideração de variáveis adicionais, como intensidade luminosa e as especificidades de cada espécie. O uso de *software* para modelagem de cenários de toxicidade pode também melhorar a análise dos impactos ambientais, proporcionando uma visão mais ampla dos efeitos combinados de múltiplos contaminantes.

De forma geral, os resultados demonstram que os poluentes CYN e PFOA, isoladamente ou em mistura, afetam de maneira significativa o crescimento e o metabolismo das microalgas, e que as interações entre essas substâncias podem gerar efeitos não previstos. A continuidade dos estudos sobre esses contaminantes e suas misturas é essencial para uma gestão mais eficaz da qualidade da água e a preservação dos ecossistemas aquáticos.

7 CONCLUSÕES

Os resultados deste estudo sugerem que a exposição ao PFOA e à cilindrospermopsisina (CYN), tanto isoladamente quanto em misturas, impacta de maneira variável o crescimento das microalgas *Monoraphidium capricornutum* e *Ankistrodesmus striptatus*, sendo os efeitos mais pronunciados em concentrações mais altas e em culturas mistas. Observou-se que *Monoraphidium capricornutum* apresentou maior inibição de crescimento quando em competição com *Ankistrodesmus striptatus*, especialmente sob altas concentrações de PFOA e CYN, evidenciando uma relação de competição interespecífica modulada pelos contaminantes. Além disso, verificou-se que a exposição às misturas binárias de PFOA e CYN impactou *Monoraphidium capricornutum* de forma mais significativa do que a exposição isolada, sugerindo possíveis efeitos interativos entre os contaminantes.

Os ensaios bioquímicos demonstraram que a exposição ao PFOA e à CYN, individualmente e em misturas, resultou em alterações nos biomarcadores antioxidantes, incluindo a redução da atividade de GST e variações na concentração de GSH, indicando um potencial desequilíbrio e dano oxidativo. Esses achados reforçam a necessidade de mais estudos sobre os efeitos combinados de poluentes em produtores primários para uma compreensão mais aprofundada dos riscos ecológicos em cenários de exposição múltipla.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aebi, H. (1984). Catalase *in Vitro*. *Methods in enzymology*, 105, 121-126.
- Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos - USEPA (2022). Health Effects from Cyanotoxins. EPA - United States Environmental Protection Agency. Disponível em: <<https://www.epa.gov/cyanohabs/health-effects-cyanotoxins>> Último acesso: 11 de setembro de 2022.
- Albuquerque, M. V. C.; Oliveira, E. M. A.; Silva, R. M. P.; Cavalcanti, M. R. e Monteiro, B. S. B. (2023) Cianobactérias e seus efeitos deletérios: Implicações de monitoramento, tratamento e saúde pública. *Revista Foco*, Curitiba (PR), 16(9), 01-17.
- Amorim, C. A. (2021). Florações Algais no estado de Pernambuco: causas, consequências e controle. *Tese de Doutorado*, Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade, Universidade Federal Rural de Pernambuco, PE, 401p.
- Azevedo, S. M F. O. (2021) Assessing exposure and short-term interventions. *Toxic Cyanobacteria in Water*, 2a edição, 389-393. CRC Press, Boca Raton (FL), on behalf of the World Health Organization, Geneva, CH.
- Babior, B. M. (1997) Superoxide: a two-edged sword. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 30, 141-155.
- Barbosa, A. B., (2009) Dynamics of living phytoplankton: implications for paleoenvironmental reconstructions. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 5,(1).
- Barreiros, A. L. B. S e David, J. M. (2006) Estresse Oxidativo: Relação Entre a Geração de Espécies Reativas e a Defesa do Organismo. *Quim. Nova*, 29(1), 113-123.
- Barry V, *et al.* (2013) Perfluorooctanoic acid (PFOA) exposures and incident cancers among adults living near a chemical plant. *Environ Health Perspect* 121, (11–12), 1313–1318.
- B-Béres, V., Vasas, G., Dobronoki, D., Gonda, S., Nagy, S., & Bácsi, I. (2015). Effects of Cylindrospermopsin Producing Cyanobacterium and Its Crude Extracts on a Benthic Green Alga—Competition or Allelopathy? *Marine Drugs*, 13(11), 6703–6722.

Benskin, J. P., Ahrens, L., Muir, D. C. G., Scott, B. F., Spencer, C., Rosenberg, B., ... Martin, J. W. (2011). Manufacturing Origin of Perfluorooctanoate (PFOA) in Atlantic and Canadian Arctic Seawater. *Environmental Science & Technology*, 46(2), 677–685.

Beretta-Blanco, A., & Carrasco-Letelier, L. (2021). Relevant factors in the eutrophication of the Uruguay River and the Río Negro. *Science of The Total Environment*, 761, 143299.

Berg, M. e Sutula, M. (2015) Factors affecting the growth of cyanobacteria with special emphasis on the Sacramento-San Joaquin Delta. Southern California Coastal Water Research Project, Technical Report, 111p.

Bergami, E.; Pugnalini, S.; Vannuccini, M.L.; Manfra, L.; Faleri, C.; Savorelli, F.; Dawson, K. A. e Corsi, I. (2017) Long-term toxicity of surface-charged polystyrene nanoplastics to marine planktonic species *Dunaliella tertiolecta* and *Artemia franciscana*. *Aquatic Toxicology*, 189, 159-169.

Berry, J. P.; Gibbs, P.D.L.; Schmale, M. C. e Saker, M. L. (2009) Toxicity of cylindrospermopsin, and other apparent metabolites from *Cylindrospermopsis raciborskii* and *Aphanizomenon ovalisporum*, to the zebrafish (*Danio rerio*) embryo. *Toxicon*, 53(2), 289–99.

Bladeren, P. J. (2000). Glutathione conjugation as a bioactivation reaction. *Chemico-Biological Interactions*, 129 (1-2), 61–76.

Bohrer-Morel, M. B. C. (2002) Ecotoxicologia no Brasil. Congresso Brasileiro de Ecotoxicologia, 7.

Bortoli, S. e Pinto, E. (2015) Ecologia de reservatórios e interfaces. Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, São Paulo. Cianotoxinas, 21, 321-339.

Bouvy, M.; Pagano, M. e Troussellier, M. (2001) Effects of a cyanobacterial bloom (*Cylindrospermopsis raciborskii*) on bacteria and zooplankton communities in Ingazeira reservoir (northeast Brazil). *Aquatic Microbial Ecology*, 25, 215-227.

Brasel, K. A., Howarth, J., Pearman, J. K., Fitzsimons, S. J., Zaiko, A., Pochon, X., Vandergoes, M. J., Simon, K. S., & Wood, S. A. (2021). Lake microbial communities are not resistant or resilient to repeated large-scale natural pulse disturbances. *Molecular Ecology*, 30(20), 5137–5150.

BRASIL (1997) Ministério do Meio Ambiente dos Recursos Hídricos e da Amazônia Legal. Lei n. 9.433: Política Nacional de Recursos Hídricos. Brasília: Secretaria de Recursos Hídricos.

Brasil, B. dos S. A. F., de Siqueira, F. G., Salum, T. F. C., Zanette, C. M., & Spier, M. R. (2017). Microalgae and cyanobacteria as enzyme biofactories. *Algal Research*, 25, 76–89.

Brown, A.S., Yun, X., McKenzie, E.R., Heron, C.G., Field, J.A., Salice, C.J., (2023). Spatial and temporal variability of per- and polyfluoroalkyl substances (PFAS) in environmental media of a small pond: toward an improved understanding of PFAS bioaccumulation in fish. *Sci. Total Environ.* 880, 163149

Buratti, F. M., Manganelli, M., Vichi, S., Stefanelli, M., Scardala, S., Testai, E., & Funari, E. (2017). Cyanotoxins: producing organisms, occurrence, toxicity, mechanism of action and human health toxicological risk evaluation. *Archives of Toxicology*, 91(3), 1049–1130.

Calafat, A.M., *et al.* (2007) Serum concentrations of 11 polyfluoroalkyl compounds in the U.S. population: data from the National Health and Nutrition Examination Survey, 1999–2000. *Environ Sci Technol* 41, (7), 2237–2242.

Campos, A.; Araújo, P.; Pinheiro, C.; Azevedo, J.; Osório, H. e Vasconcelos, V. (2013) Effects on growth, antioxidant enzyme activity and levels of extracellular proteins in green alga *Chlorella vulgaris* exposed to crude cyanobacterial extracts and pure microcystin and cylindrospermospin. *Ecotoxicol Environ Saf.*, 94, 45–53.

Carapeto, C. (1999) Poluição das águas: causas e efeitos. Lisboa, Universidade Aberta, 241 p. ISBN 972-674-265-X;

Castillo, N. A.; James, W.R.; Santos, R.O.; Rezek, R.; Cerveny, D.; Boucek, R.E.; Adams, A.J.; Goldberg, T.; Campbell, L.; Perez, A.U.; Schmitter-Soto, J.J.; Lewis, J.P.; Fick, J; Brodin, T. e Rehage, J. S. (2024) Understanding pharmaceutical exposure and the potential for effects in marine biota: A survey of bonefish (*Albula vulpes*) across the Caribbean Basin. *Chemosphere*, 349, 140949.

Chia, M. A., Cordeiro-Araújo, M. K., Lorenzi, A. S., & Bittencourt-Oliveira, M. do C. (2017). Cylindrospermopsin induced changes in growth, toxin production and antioxidant response of *Acutodesmus acuminatus* and *Microcystis aeruginosa* under differing light and nitrogen conditions. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 142, 189–199.

Chorus, I. e Welker, M. (2021) Toxic Cyanobacteria in Water: A Guide to Their Public Health Consequences, Monitoring and Management. 2^a Edição. On behalf of the World Health Organization, Geneva, CH.

Chorus, Faster e Welker,(2021) - Cyanobacteria and Cyanotoxins in a Changing Environment: Concepts, Controversies, Challenges. *Water*, 13(18), 2463.

Colombo, G., Reggiani, F., Cucchiari, D., Astori, E., Garavaglia, M. L., Portinaro, N. M., ... Dalle-Donne, I. (2018). Plasma Protein Carbonylation in Haemodialysed Patients: Focus on Diabetes and Gender. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2018, 1–12.

CONAMA - Conselho Nacional do Meio Ambiente, 2000. Resolução nº 357, 17 de março de 2005. Ministério do Meio Ambiente.

CONAMA - Conselho Nacional do Meio Ambiente, 2000. Decreto nº 430, 13 de maio de 2011. Ministério do Meio Ambiente.

Crone, B. C., Speth, T. F., Wahman, D. G., Smith, S. J., Abulikemu, G., Kleiner, E. J., & Pressman, J. G. (2019). Occurrence of per- and polyfluoroalkyl substances (PFAS) in source water and their treatment in drinking water. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 1–38.

Cybis, L. F.; Bendati, M. M.; Maizonave, C. R. M.; Werner, V. R. e Domingues, C. D. (2006) Manual para estudo de cianobactérias planctônicas em mananciais de abastecimento público: caso da represa Lomba do Sabão e lago Guaíba, Porto Alegre, Rio Grande do Sul. Rio de Janeiro: ABES, 65p.

Dalu, T., & Wasserman, R. J. (2018). Cyanobacteria dynamics in a small tropical reservoir: Understanding spatio-temporal variability and influence of environmental variables. *Science of The Total Environment*, 643, 835–841.

De la Cruz, A. A., Hiskia, A., Kaloudis, T., Chernoff, N., Hill, D., Antoniou, M. G., ... Dionysiou, D. D. (2013). A review on cylindrospermopsin: the global occurrence, detection, toxicity and degradation of a potent cyanotoxin. *Environmental Science: Processes & Impacts*, 15(11), 1979.

Devi, A.; Verma, M.; Saratale, G. D.; Saratale, R. G.; Ferreira, L. F.; Mulla, S. I.; Bharagava, R. N. (2023) Microalgae: A green eco-friendly agents for bioremediation of tannery wastewater with simultaneous production of value-added products. *Chemosphere*, 336, 139192.

Dittmann, E. e Wiegand, C. (2006). Cyanobacterial toxins occurrence, biosynthesis and impact on human affairs. *Mol. Nut. Food. Res.* 50(1), 7-17.

Dörr, F. (2015) Efeito do herbicida glifosato sobre o crescimento e produção de metabólitos secundários em *Microcystis aeruginosa* e *Cylindrospermopsis raciborskii*. Tese de Doutorado. São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, 198p.

Downing, J. A., Watson, S. B., & McCauley, E. (2001). Predicting Cyanobacteria dominance in lakes. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 58(10), 1905–1908.

Eriksson, J.E., Meriluoto, J.A.O., Lindholm, T., (1989). Accumulation of a peptide toxin from the cyanobacterium *Oscillatoria agardhii* in the freshwater mussel *Anodonta cygnea*. *Hydrobiologia*, 183, 211-216.

Esterbauer, H.; Cheeseman, K.H. (1990) Determination of aldehydic lipid peroxidation products malonaldehyde and 4-hydroxyneonal. *Methods in Enzymology*, vol 186: 407-421.

Fadel, A., Atoui, A., Lemaire, B., Vinçon-Leite, B., & Slim, K. (2014). Dynamics of the Toxin Cylindrospermopsin and the Cyanobacterium *Chrysosporum (Aphanizomenon) ovalisporum* in a Mediterranean Eutrophic Reservoir. *Toxins*, 6(11), 3041–3057.

Falconer, I. R. (2008). Health effects associated with controlled exposures to cyanobacterial toxins. *Cyanobacterial Harmful Algal Blooms: State of the Science and Research Needs*, 607–612.

Falconer, I. R.; Hardy, S. J.; Humpage, A. R.; Froscio, S. M.; Tozer, G.J.; Hawkins, P. R. (1999) Hepatic and renal toxicity of the blue-green alga (cyanobacterium) *Cylindrospermopsis raciborskii* in male Swiss albino mice. *Environmental Toxicology*, 14 (1), 143-150.

Fernicola, N.; Bohrer-Morel, M. B. e Bainy, A. (2003) As Bases Toxicológicas da Ecotoxicologia, 1^a edição. Ecotoxicologia, 220-243.

Ford, L.; Lin, H.; Tsai, H.; Zhou, Y.; Wright, F.; Sedykh, A.; Shah; Chiu, W. e Rusyn, I. (2024) Hazard and risk characterization of 56 structurally diverse PFAS using a targeted battery of broad coverage assays using six human cell types. *Toxicology*, 503, 153763.

Gibson, C.E.; Smith, R.V. (1982). “*Freshwater Plankton*”. The Biology of Cyanobacteria, Blackwell Scientific Publications, London, 463-490.

Galloway, J. E., Moreno, A. V. P., Lindstrom, A. B., Strynar, M. J., Newton, S., May, A. A., & Weavers, L. K. (2020). Evidence of Air Dispersion: HFPO-DA and PFOA in Ohio and West Virginia Surface Water and Soil near a Fluoropolymer Production Facility. *Environmental Science & Technology*.

Goodrow, S. M.; Ruppel, B.; Lippincott, R. L.; Post, G. B. e Procopio, N. A (2020) Investigation of levels of perfluoroalkyl substances in surface water, sediment and fish tissue in New Jersey, USA. *Science of the Total Environment*, 729, 138839.

Greaver, T. L., Clark, C. M., Compton, J. E., Vallano, D., Talhelm, A. F., Weaver, C. P., ... Haeuber, R. A. (2016). Key ecological responses to nitrogen are altered by climate change. *Nature Climate Change*, 6(9), 836–843.

Guillard, R. R. L. (1973). “Division rates. In: Stein, J. R., ed. Handbook of Phycological Methods: Culture Methods and Growth Measurements.” *Cambridge University Press*, Cambridge, pp. 289–311.

Guo, W.; Ren, H.; Jin, Y.; Chai, Z. e Liu, B. (2024) The bioremediation of the typical persistent organic pollutants (POPs) by microalgae-bacteria consortia: A systematic review. *Chemosphere*, 355, 141852.

Haimbaugh, A.; Wu, C.C.; Akemann, C.; Meyer, D.N.; Connell, M.; Abdi, M.; Khalaf, A.; Johnson, D.; Baker, T.R. (2022) Multi- and Transgenerational Effects of Developmental Exposure to Environmental Levels of PFAS and PFAS Mixture in Zebrafish (*Danio rerio*). *Toxics*, 10 (6):334.

Hercog, C.; Štern, A.; Maisanaba, S.; Filipič, M.; Bojana, Ž. (2020) Plastics in cyanobacterial blooms—genotoxic effects of binary mixtures of cylindrospermopsin and bisphenols in *HepG2* cells. *Toxins*, 12, 219.

Hinojosa, M.G.; Prieto, A.I.; Gutiérrez-Praena, D.; Moreno, F.J.; Caméan, A.M.; Jos, A. (2020) In vitro assessment of the combination of cylindrospermopsin and the organophosphate chlorpyrifos on the human neuroblastoma *SH-SY5Y* cell line. *Ecotoxicol. Environ. Saf*, 191, 110222

Hong, S., Khim, J. S., Wang, T., Naile, J. E., Park, J., Kwon, B.-O., ... Giesy, J. P. (2015). Bioaccumulation characteristics of perfluoroalkyl acids (PFAAs) in coastal organisms from the west coast of South Korea. *Chemosphere*, 129, 157–163.

Hu, C., Luo, Q., & Huang, Q. (2014). Ecotoxicological effects of perfluorooctanoic acid on freshwater microalgae *Chlamydomonas reinhardtii* and *Scenedesmus obliquus*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 33(5), 1129–1134.

Hu, Y., Meng, F.-L., Hu, Y.-Y., Habibul, N., & Sheng, G.-P. (2020). Concentration- and Nutrient-Dependent Cellular Responses of Microalgae *Chlorella pyrenoidosa* to Perfluorooctanoic Acid. *Water Research*, 116248.

Huang, I.-S., & Zimba, P. V. (2019). Cyanobacterial bioactive metabolites—A review of their chemistry and biology. *Harmful Algae*, 83, 42–94.

Huisman, J.; Codd, G. A.; Paerl, H. W.; Ibelings, B. W.; Verspagen, J. M. H.; Visser, P. M. (2018) Cyanobacterial blooms. *Nature Reviews. Microbiology*, 16, 471-483

Humpage e Fastner, (2021) Cylindrospermopsins. Toxic Cyanobacteria in Water, 2a edição, 53-71. CRC Press, Boca Raton (FL), on behalf of the World Health Organization, Geneva, CH.

Ibelings, B. W.; Kurmayer, R.; Azevedo, S. M. F. O.; Wood, S. A.; Chorus, I e Welker, M. (2021) Understanding the occurrence of cyanobacteria and cyanotoxins. Toxic Cyanobacteria in Water, 2a edição, 213-294. CRC Press, Boca Raton (FL), on behalf of the World Health Organization, Geneva, CH.

Jochimsen, E. M, Carmichael WW, An J, Cardo DM, Cookson ST, Holmes CEM *et al.* (1998). Liver failure and death after exposure to microcystins at a hemodialysis center in Brazil. *New England J. Med.* 338:873-878.

Kosten, S.; Jeppesen, E.; Huszar, V. L. M.; Mazzeo, N.; Van Nes, E. H., Peeters, E., e Scheffer, M. (2011). Ambiguous climate impacts on competition between submerged macrophytes and phytoplankton in shallow lakes. *Freshwater Biology*, 56(8), 1540–1553.

Kumar S and Trivedi PK (2018)Glutathione S-Transferases: Role in Combating Abiotic Stresses Including Arsenic Detoxification in Plants. *Front. Plant Sci.* 9:751.

Lee, E.; Jalalizadeh, M. e Zhang, Q. (2015). Growth kinetic models for microalgae cultivation: A review. *Algal Research*, 12, 497–512.

Lehman, P. W., Boyer, G., Hall, C., Waller, S., & Gehrt, K. (2005). Distribution and toxicity of a new colonial *Microcystis aeruginosa* bloom in the San Francisco Bay Estuary, California. *Hydrobiologia*, 541(1), 87–99.

Liu H, Chen Y, Hu W, Luo Y, Zhu P, You S, Li Y, Jiang Z, Wu X, Li X. (2023) Impacts of PFOAC8, GenXC6, and their mixtures on zebrafish developmental toxicity and gene expression provide insight about tumor-related disease. *Sci Total Environ*, 1,858(2):160085.

Lopes, K. C. (2016) Efeito subletal das cianobactérias *Cylindrospermopsis raciborskii* (Woloszynska, 1912) na atividade locomotora de *Poecilia vivipara* Bloch e Schneider, 1801 (Poeciliidae) e na motilidade de *Pygidiopsis macrostomum* Travassos, 1928 (Heterophyidae). Dissertação de Mestrado. Instituto Oswaldo Cruz, Biodiversidade e Saúde, Rio de Janeiro, 72p.

Liu, X.; Zheng, X.; Zhang, L.; Li, J.; Li, Y.; Huang, H. e Fan, Z. (2022) Joint toxicity mechanisms of binary emerging PFAS mixture on algae (*Chlorella pyrenoidosa*) at environmental concentration, *Journal of Hazardous Materials*, 437, 129355.

Lopes-Ferreira, M.; Falcão, M. A. P.; Disner, G. R.; Lima, C. (2021) O Modelo zebrafish e sua contribuição ao meio ambiente. Cap VII, 188-2019. Instituto Butantan

Lopez, C.B.; Jewett, E.B.; Dortch, Q.; Walton, B.T. e Hudnell, H.K. (2008) Scientific Assessment of Freshwater Harmful Algal Blooms, Interagency Working Group on Harmful Algal Blooms, Hypoxia, and Human Health of the Joint Subcommittee on Ocean Science and Technology, 65p.

Lu, T., Zhang, Q., Zhang, Z., Hu, B., Chen, J., Chen, J., & Qian, H. (2021). Pollutant toxicology with respect to microalgae and cyanobacteria. *Journal of Environmental Sciences*, 99, 175–186.

Lurling, M.; Eshetu, F.; Faassen, E. J.; Kosten, S. e Huszar, V. M. (2013). Comparison of cyanobacterial and green algal growth rates at different temperatures. *Freshwater Biology*, 58, 552-559.

Lürling, M., e Roessink, I. (2006). On the way to cyanobacterial blooms: Impact of the herbicide metribuzin on the competition between a green alga (*Scenedesmus*) and a cyanobacterium (*Microcystis*). *Chemosphere*, 65(4), 618–626.

Ma, T.; Ye, C.; Wang, T.; Li, X.; Luo, Y. (2022) Toxicity of Per- and Polyfluoroalkyl Substances to Aquatic Invertebrates, Planktons, and Microorganisms. *Int. J. Environ. Res. Public Health*, 19, 16729.

Madian, A. G., & Regnier, F. E. (2010). Proteomic Identification of Carbonylated Proteins and Their Oxidation Sites. *Journal of Proteome Research*, 9(8), 3766–3780.

Magalhães, D. P. e Ferrão, A. S. (2008) A ecotoxicologia como ferramenta no biomonitoramento de ecossistemas aquáticos. Laboratório de Avaliação e Promoção da Saúde Ambiental, Pavilhão Lauro Travassos, *Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz* (Fiocruz). *Oecol. Bras.*, 12 (3): 355-381, Rio de Janeiro, RJ.

Mao, W.; Li, M.; Xue, X.; Cao, W.; Wang, X.; Xu, F. e Jiang, W. (2023) Bioaccumulation and toxicity of perfluorooctanoic acid and perfluorooctane sulfonate in marine algae *Chlorella sp.* *Science of the Total Environment*, 870, 161882

Mazari, A.M.A.; Zhang, L.; Ye, Z.-W.; Zhang, J.; Tew, K.D.; Townsend, D.M. (2023) The Multifaceted Role of Glutathione S-Transferases in Health and Disease. *Biomolecules*, 13, 688.

McFarlan, E. L e Lemke, L. D. (2024) Per- and polyfluoroalkyl substances (PFAS) fate and transport across a groundwater-surface water interface. *Science of the Total Environment*, 951, 175672.

Melo-Santos, G. L.; Ferreira, K. S.; Campos, M. B.; Fernandes, K. A.; Rani-Borges, B.; Moschini-Carlos, V.; Pompêo, M. (2021) Aspectos da ecotoxicidade de cianobactérias. *Research Gate*. Cap 11, 164-189.

Mesquita, C. S.; Oliveira, R.; Bento, F.; Geraldo, D.; Rodrigues, J.V.; Marcos, J.C. (2014) Simplified 2,4-dinitrophenylhydrazine spectrophotometric assay for quantification of carbonyls in oxidized proteins. *Anal Biochem*. 458: 69-71.

Metcalf, J. S. e Codd, G. A. (2020) Co-Occurrence of Cyanobacteria and Cyanotoxins with Other Environmental Health Hazards: Impacts and Implications. *Toxins*, 12 (629).

Miranda, D. A., Benskin, J. P., Awad, R., Lepoint, G., Leonel, J., & Hatje, V. (2021). Bioaccumulation of Per- and polyfluoroalkyl substances (PFASs) in a tropical estuarine food web. *Science of The Total Environment*, 142146.

Mirnenko, E. (2024) Ecological monitoring of water bodies: bioindication, microalgae biodiversity indices. *E3S Web of Conferences*, 555, 02008.

Moisander, P. H., McClinton, E., & Paerl, H. W. (2002). Salinity Effects on Growth, Photosynthetic Parameters, and Nitrogenase Activity in Estuarine Planktonic Cyanobacteria. *Microbial Ecology*, 43(4), 432–442.

Mojiri A, Nazari Vishkaei M, Ansari HK, Vakili M, Farraji H, Kasmuri N. (2023) Toxicity Effects of Perfluorooctanoic Acid (PFOA) and Perfluorooctane Sulfonate (PFOS) on Two Green Microalgae Species. *Int J Mol Sci.*, 24(3):2446.

Montagner, C.C; Vidala, C. e Acayabab, R. D. (2017) Contaminantes emergentes em matrizes aquáticas do Brasil: cenário atual e aspectos analíticos e regulatórios. *Quim. Nova*, 40 (9), 1094-1110.

Moraes, A. C. N., Fallah, H. P., Magalhães, V. F., & Habibi, H. R. (2021). Cylindrospermopsin directly disrupts spermatogenesis in isolated male zebrafish testis. *General and Comparative Endocrinology*, 313, 113891.

Moraes, A. C. N.; Shah, S.; Magalhães, V. F.; Habibi, H. R. (2022) Cylindrospermopsin impairs zebrafish (*Danio rerio*) embryo development. *Marine Environmental Research*, 175, 105567.

Nguyen, M.; Rakib, R. J.; Lin, C.; Hung, N. T. Q.; Le, V.; Nguyen, H.; Malafaia, G. e Idris, A. (2023) A comprehensive review on ecological effects of microplastic pollution: An interaction with pollutants in the ecosystems and future perspectives. *Trends in Analytical Chemistry*, 168, 117294.

Niu, Z., Na, J., Xu, W., Wu, N., & Zhang, Y. (2019). The effect of environmentally relevant emerging per- and polyfluoroalkyl substances on the growth and antioxidant response in marine Chlorella sp., *Environmental Pollution*, 252, 103–109.

Olsen, G. W., Burris, J. M., Ehresman, D. J., Froehlich, J. W., Seacat, A. M., Butenhoff, J. L., & Zobel, L. R. (2007). Half-Life of Serum Elimination of Perfluorooctanesulfonate, Perfluorohexanesulfonate, and Perfluorooctanoate in Retired Fluorochemical Production Workers. *Environmental Health Perspectives*, 115(9), 1298–1305.

Olszowy-Tomczyk, M (2020) Synergistic, antagonistic and additive antioxidant effects in the binary mixtures. *Phytochem Rev*, 19, 63-103.

Paerl, H. W.; Bland, P. T.; Bowles, N. D. e Haibach, M. E. (1985). Adaptation to high-intensity, low wavelength light among surface blooms of the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. *Environmental Microbiology*, 49, 1046-1052.

Paerl, H. W., Hall, N. S., e Calandrino, E. S. (2011). Controlling harmful cyanobacterial blooms in a world experiencing anthropogenic and climatic-induced change. *Science of The Total Environment*, 409(10), 1739–1745.

Paerl, H. W.; Huisman, J. (2009). Climate change: a catalyst for global expansion of harmful cyanobacterial blooms. *Environmental Microbiology Reports*, 1(1), 27–37.

Paerl, H. W., Scott, J. T., McCarthy, M. J., Newell, S. E., Gardner, W. S., Havens, K. E., Wurtsbaugh, W. A. (2016). It Takes Two to Tango: When and Where Dual Nutrient (N & P) Reductions Are Needed to Protect Lakes and Downstream Ecosystems. *Environmental Science & Technology*, 50(20), 10805–10813.

Paerl, H. W.; Xu, H.; McCarthy, M. J.; Zhu, G.; Qin, B.; Li, Y.; Gardner, W. S. (2011) Controlling harmful cyanobacterial blooms in a hyper-eutrophic lake (Lake Taihu, China): The need for a dual nutrient (N and P) management strategy. *Water Res.*, 45, 1973-1983.

Pandey S. (2006) Water pollution and health. Kathmandu University Medical Journal (KUMJ), 4(1), 128-134.

Perígolo, R. A. (2017) Avaliação do emprego de lagoas de estabilização em escala piloto para pesquisa de tratamento de esgoto doméstico. *Dissertação de Mestrado*. Tecnologia Ambiental e Recursos Hídricos, Departamento de Engenharia Civil e Ambiental, Universidade de Brasília, Brasília, DF, 113p.

Pietsch, C., Wiegand, C., Amé, M. V., Nicklisch, A., Wunderlin, D., & Pflugmacher, S. (2001). The effects of a cyanobacterial crude extract on different aquatic organisms: Evidence for cyanobacterial toxin modulating factors. *Environmental Toxicology*, 16(6), 535–542.

Pikula, K.S.; Zakharenko, A.M.; Aruoja, V.; Golokhvast, K.S.; Tsatsakis, A.M. (2019) Oxidative stress and its biomarkers in microalgal ecotoxicology. *Current Opinion in Toxicology*, 13, 8-15.

Pinheiro, C., Azevedo, J., Campos, A. *et al.* (2016) The interactive effects of microcystin-LR and cylindrospermopsin on the growth rate of the freshwater algae *Chlorella vulgaris*. *Ecotoxicology*, 25, 745–758.

Prata, J. C.; Costa, J. P.; Lopes, I.; Duarte, A. C. Santos, T. (2019) Effects of microplastics on microalgae populations: A critical review. *Science of the Total Environment*, 665, 400–405.

Reyes-Marquez, A.; Sedeno-Díaz, J. E.; Aguíniga-García, S; Austria-Ortíz, G. M. e Lopez, E. (2024) Health risk assessment by consumption of commercial biota contaminated with heavy metals in Tampamachoco coastal lagoon, Gulf of Mexico. *Marine Pollution Bulletin*, 206, 116757.

Rezayian, M., Niknam, V., & Ebrahimzadeh, H. (2019). Oxidative damage and antioxidative system in algae. *Toxicology Reports*, 6, 1309-1313.

Ribeiro, P. C. (2007) Análise de fatores que influenciam a proliferação de cianobactérias e algas em lagoas de estabilização. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Campina Grande, Centro de Tecnologia e Recursos Naturais, Campina Grande, PB, 106p.

Runnegar, M. T.; Berndt, N. e Kaplowitz, N. (1995). Microcystin uptake and inhibition of protein phosphatases: effects of chemoprotectants and self-inhibition in relation to known hepatic transporters. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 134, 264-272.

Saker, M. L. e Eaglesham, G. K. (1999) The accumulation of cylindrospermopsin from the cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* in tissues of the Redclaw crayfish *Cherax quadricarinatus*, *Toxicon*, 37(7), 1065-1077.

Santos, I. K. L. e Soares, R. M. (2023) Ecotoxicidade de ácido perfluorooctanoico: impactos em organismos aquáticos e suas consequências. *25º Simpósio Brasileiro de Recursos Hídricos*, Aracaju, Sergipe, 2318-0358.

Santos, C., Azevedo, J., Campos, A., Vasconcelos, V., e Pereira, A. L. (2015). Biochemical and growth performance of the aquatic macrophyte *Azolla filiculoides* to sub-chronic exposure to cylindrospermopsin. *Ecotoxicology*, 24(9), 1848–1857

Shi, W.; Zhang, Z.; Li, M.; Dong, H. e Li, J. (2024) Reproductive toxicity of PFOA, PFOS and their substitutes: A review based on epidemiological and toxicological evidence. *Environmental Research*, 250, 118485.

Silva, J. R. (2009) Dinâmica de cianobactérias e cianotoxinas em um braço do reservatório da usina hidroelétrica Luiz Eduardo Magalhães e suas implicações para o abastecimento público de Palmas - TO. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, *Dissertação de Mestrado*, 125p.

Silveira, T. R.; Schneider, A. C.; Hammes, T. O. (2012) Zebrafish: O modelo consagrado para estudos de doenças humanas. *Ciência e Cultura*, 64(2), 4-5.

Singh, R. N., (1962). Seasonal variants of *Anabaenopsis raciborskii*, Wolosz. *Hydrobiologia* 20, 87-91.

Sodré, F. F. (2012) Fontes Difusas de Poluição da Água: Características e métodos de controle. *Artigos Temáticos do AQQUA*, 1, 9-16.

Stone, S., Adams, M. S., Stauber, J. L., Jolley, D. F., & Warne, M. S. (2019). Development and application of a multispecies toxicity test with tropical freshwater microalgae. *Environmental Pollution*, 250, 97-106.

Stravs, M. A., Pomati, F., & Hollender, J. (2017) Exploring micropollutant biotransformation in three freshwater phytoplankton species. *Environmental Science: Processes & Impacts*, 19(6), 822–832.

Soares, R. M. (2009) Toxicologia de Cianotoxinas: Microcistinas as estrelas do tema. *Oecol. Brasil.*, 13(2), 259-271.

Sousa, J. (2018) *Uso do filtro de pedras na redução de densidade de cianobactérias em lagoas de estabilização*. Curso de Especialização em Elaboração e Gerenciamento de Projetos para Gestão Municipal de Recursos Hídricos do Instituto Federal de Educação Ciência e Tecnologia do Ceará, Goiânia, GO, 39p.

Stone, S., Adams, M. S., Stauber, J. L., Jolley, D. F., & Warne, M. S. (2019). Development and application of a multispecies toxicity test with tropical freshwater microalgae. *Environmental Pollution*, 250, 97-106

Tonk, L., Bosch, K., Visser, P. M. e Huisman, J. (2007) Salt tolerance of the harmful cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. *Aquatic Microbial Ecology*, 46, 117-123.

Vázquez-Rodríguez, C. M. (2018) Efectos de las cianotoxinas sobre la reproducción y el desarrollo. Universidad de Sevilla, Facultad de Farmacia, Área de Toxicología, 40p.

Viana, L. F.; Crispim, B. A.; Kummrow, F.; Lima, N.; Dias, M.; Montagner, C. C.; Pereira, R. H. G.; Barros, A. e Barufatti, A. (2024) Occurrence of contaminants of emerging concern and their risks to the Pantanal Sul-Mato-Grossense aquatic biota, Brazil. *Chemosphere*, 337, 139429.

Virkutyte, J., Varma, R.S. & Jegatheesan, V. (2010). Treatment of Micropollutants in Water and Wastewater, IWA Publishing, London.

Visser, P. M., Verspagen, J. M. H., Sandrini, G., Stal, L. J., Matthijs, H. C. P., Davis, T. W., ... Huisman, J. (2016). How rising CO₂ and global warming may stimulate harmful cyanobacterial blooms. *Harmful Algae*, 54, 145–159.

Walter, J. M., Lopes, F. A. C., Lopes-Ferreira, M., Vidal, L. M., Leomil, L., Melo, F., ... Thompson, F. L. (2018). Occurrence of Harmful Cyanobacteria in Drinking Water from a Severely Drought-Impacted Semi-arid Region. *Frontiers in Microbiology*, 9.

Wang, L., Wang, Q., Xiao, G., Chen, G., Han, L., e Hu, T. (2020). Adverse effect of cylindrospermopsin on embryonic development in zebrafish (*Danio rerio*). *Chemosphere*, 241, 125060.

Wang, S.; Meckling, K. A.; Marcone, M. F.; Kakuda, Y. e Tsao, R. (2011) Synergistic, additive, and antagonistic effects of food mixtures on total antioxidant capacities. *J Agric Food Chem*, 59, 960–968.

Wang, Y.; Jiang, S.; Wang, B.; Chen, X. e Lu, G. (2023) Comparison of developmental toxicity induced by PFOA, HFPO-DA, and HFPO-TA in zebrafish embryos. *Chemosphere*. PMID: 36309054 .

Wang, Z.; Cheng, J.; Sun, Y.; You, X., Chu, F. e Yang, W. (2022) Mutation adaptation and genotoxicity of microalgae induced by Long-Term high CO₂ stress. *Chemical Engineering Journal*, 445, 136745.

Weirich, C. A., & Miller, T. R. (2014). Freshwater Harmful Algal Blooms: Toxins and Children's Health. *Current Problems in Pediatric and Adolescent Health Care*, 44(1), 2–24.

Wendee, N. (2013) PFOA and Cancer in a Highly Exposed Community: New Findings from the C8 Science Panel. *Environmental Health Perspectives*, 121, 11-12.

Weng, S.-L., Huang, K.-Y., Kaunang, F. J., Huang, C.-H., Kao, H.-J., Chang, T.-H., ... Lee, T.-Y. (2017). Investigation and identification of protein carbonylation sites based on position-specific amino acid composition and physicochemical features. *BMC Bioinformatics*, 18(S3).

Wilhelm Filho, D.; Torres, M.A.; Zaniboni-Filho, E. e Pedrosa, R.C. (2005) Effect of different oxygen tensions on weight gain, feed conversion, and antioxidant status in piapara, *Leporinus elongatus* (Valenciennes, 1847), *Aquaculture*, 244,349-357.

Wimmer, K. M.; Strangman, W. K.; Wright e J. L. C. (2014) 7-Deoxy-desulfo-cylindrospermopsin and 7-deoxy-desulfo-12-acetylcytindros- permopsin - Two new cylindrospermopsin analogs isolated from a Thai strain of *Cylindrospermopsis raciborskii*. *Harmful Algae*, 37, 203-206.

Wörmer, L.; Cirés, S.; Carrasco, D. e Quesada, A. (2008) Cylindrospermopsin Is Not Degraded by Co-Occurring Natural Bacterial Communities during a 40-Days Study. *Harmful Algae*, 7, 206-213.

Xu, D., Li, C., Chen, H., & Shao, B. (2013). Cellular response of freshwater green algae to perfluorooctanoic acid toxicity. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 88, 103–107.

Yang, W., Gao, P., Li, H., Huang, J., Zhang, Y., Ding, H., & Zhang, W. (2021). Mechanism of the inhibition and detoxification effects of the interaction between nanoplastics and microalgae *Chlorella pyrenoidosa*. *Science of The Total Environment*, 783, 146919.

Young, F. M.; Micklem, J.; Humpage, A. R. (2008) Effects of blue-green algal toxin cylindrospermopsin (CYN) on human granulosa cells in vitro. *Reprod Toxicol*, 25(3), 374–80.

Young, F. M.; Zebian, D.; Froscio, S.; Humpage, A. (2012) Cylindrospermopsin, a blue-green algal toxin, inhibited human luteinised granulosa cell protein synthesis in vitro. *Toxicol in Vitro*. 26(5), 656–62.

Zhang, Y. F., Liang, J., Zeng, G. M., Tang, W. W., Lu, Y., Luo, Y., Xing, W. L., Tang, N., Ye, S. J., Li, X., & Huang, W. (2020). How climate change and eutrophication interact with microplastic pollution and sediment resuspension in shallow lakes: A review. *Science of the Total Environment*, 705, 135979.

Zagatto, P. A. e Ferrão-Filho, A. S. (2013) Acute Effects of a *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanobacteria) Strain on Mouse, Daphnia and Fish. *Ecosystem & Ecography*, 3, 121.

Zhao, Y.; Wang, R.; Zhang, E.; Guan, B.; Xu, M. (2022). Aquatic ecosystem responds differently to press and pulse nutrient disturbances as revealed by a microcosm experiment. *Ecology and Evolution*, Wiley, 12(10), 1-11.

Zhao, Y.; Xiem L. e Yan, Y. (2015). Microcystin-LR impairs zebrafish reproduction by affecting oogenesis and endocrine system. *Chemosphere*, 120, 115–22.

Zhao, Z.; Zheng, X.; Han, Z.; Yang, S.; Zhang, H.; Lin, T. e Zhou C. (2023) Response mechanisms of *Chlorella sorokiniana* to microplastics and PFOA stress: Photosynthesis, oxidative stress, extracellular polymeric substances and antioxidant system. *Chemosphere*, 323, 138256.

Zheng, X.-M., Liu, H.-L., Shi, W., Wei, S., Giesy, J. P., & Yu, H.-X. (2012). Effects of perfluorinated compounds on development of zebrafish embryos. *Environmental Science and Pollution Research*, 19(7), 2498–2505.