

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

ANA CLAUDIA OLIVEIRA DE ALMEIDA

CALIBRAÇÃO DE UM MÉTODO INDIRETO DE QUANTIFICAÇÃO CELULAR
DE MICROALGAS VERDES, E SUA APLICAÇÃO NA AVALIAÇÃO DA
TOXICIDADE DO SEDIMENTO DA BAÍA DE PARANAGUÁ.

PONTAL DO PARANÁ

2022

ANA CLAUDIA OLIVEIRA DE ALMEIDA

CALIBRAÇÃO DE UM MÉTODO INDIRETO DE QUANTIFICAÇÃO CELULAR
DE MICROALGAS VERDES, E SUA APLICAÇÃO NA AVALIAÇÃO DA
TOXICIDADE DO SEDIMENTO DA BAÍA DE PARANAGUÁ.

Dissertação apresentada ao curso de
Pós-Graduação em Sistemas Costeiros
e Oceânicos, Setor de Ciências da
Terra, Universidade Federal do Paraná,
como requisito parcial à obtenção do
título de Mestre em Sistemas Costeiros
e Oceânicos.

Orientadora: Profa. Dra. Silvia Pedroso
Melegari

PONTAL DO PARANÁ

2022

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SISTEMA DE BIBLIOTECAS – BIBLIOTECA DO CENTRO DE ESTUDOS DO MAR

Almeida, Ana Claudia Oliveira de

Calibração de um método indireto de quantificação celular de microalgas verdes, e sua aplicação na avaliação da toxicidade do sedimento da Baía de Paranaguá / Ana Claudia Oliveira de Almeida.
– Pontal do Paraná, 2022.

1 recurso on-line : PDF.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Paraná,
Campus Pontal do Paraná, Centro de Estudos do Mar, Programa de
Pós-Graduação em Sistemas Costeiros e Oceânicos.

Orientadora: Profa. Dra. Silvia Pedroso Melegari.

1. Microalga. 2. Toxicidade. 3. Calibração. I. Melegari, Silvia
Pedroso. II. Universidade Federal do Paraná. Programa de Pós-
Graduação em Sistemas Costeiros e Oceânicos. III. Título.

Bibliotecária: Fernanda Pigozzi CRB-9/1151

ATA Nº014

ATA DE SESSÃO PÚBLICA DE DEFESA DE MESTRADO PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRA EM SISTEMAS COSTEIROS E OCEÂNICOS

No dia vinte e tres de fevereiro de dois mil e vinte e dois às 09:00 horas, na sala Virtual, Zoom, foram instaladas as atividades pertinentes ao rito de defesa de dissertação da mestrand **ANA CLAUDIA OLIVEIRA DE ALMEIDA**, intitulada: **Avaliação da toxicidade do sedimento da Baía de Paranaguá sobre microalga verde e correlação com os níveis de contaminação e as atividades antrópicas locais usando um método indireto de quantificação celular**, sob orientação da Profa. Dra. SILVIA PEDROSO MELEGARI. A Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação SISTEMAS COSTEIROS E OCEÂNICOS da Universidade Federal do Paraná, foi constituída pelos seguintes Membros: SILVIA PEDROSO MELEGARI (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ), FABIO KUMMROW (UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO), ANA CAROLINE CABRAL (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ), WILLIAM GERSON MATIAS (UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA). A presidência iniciou os ritos definidos pelo Colegiado do Programa e, após exarados os pareceres dos membros do comitê examinador e da respectiva contra argumentação, ocorreu a leitura do parecer final da banca examinadora, que decidiu pela APROVAÇÃO. Este resultado deverá ser homologado pelo Colegiado do programa, mediante o atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca dentro dos prazos regimentais definidos pelo programa. A outorga de título de mestra está condicionada ao atendimento de todos os requisitos e prazos determinados no regimento do Programa de Pós-Graduação. Nada mais havendo a tratar a presidência deu por encerrada a sessão, da qual eu, SILVIA PEDROSO MELEGARI, lavrei a presente ata, que vai assinada por mim e pelos demais membros da Comissão Examinadora.

Pontal do Paraná, 23 de Fevereiro de 2022.

Assinatura Eletrônica

03/03/2022 12:15:54.0

SILVIA PEDROSO MELEGARI

Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica

09/03/2022 11:18:27.0

FABIO KUMMROW

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO)

Assinatura Eletrônica

03/03/2022 12:22:51.0

ANA CAROLINE CABRAL

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica

04/03/2022 18:26:30.0

WILLIAM GERSON MATIAS

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA)

Nota de Esclarecimento: Destaco que banca avaliadora foi unanime na sugestão de alteração do título da dissertação para: "Calibração de um método indireto de quantificação celular de microalgas verdes, e sua aplicação na avaliação da toxicidade do sedimento da Baía de Paranaguá". A candidata acatou a sugestão, mas os documentos oficiais da defesa (ata e termo de aprovação) foram emitidos com o título antigo. Na posição de presidente da banca e orientadora da candidata, abaixo assino, ratificando tal alteração.



Assinado de forma digital por Silvia Pedrosa Melegari
DN: cn=Silvia Pedrosa Melegari, o=Federal University of
Paraná, ou=Center for Marine Studies,
email=silvia.melegari@ufpr.br, c=BR
Dados: 2022.07.27 15:57:12 -03'00'

Av. Beira-Mar, s/n - Pontal do Paraná - Paraná - Brasil

CEP 83255-976 - Tel: (41) 3511-8642 - E-mail: pgsisco@ufpr.br

Documento assinado eletronicamente de acordo com o disposto na legislação federal Decreto 8539 de 08 de outubro de 2015.

Gerado e autenticado pelo SIGA-UFPR, com a seguinte identificação única: 157651

Para autenticar este documento/assinatura, acesse <https://www.prppg.ufpr.br/siga/visitante/autenticacaoassinaturas.jsp> e insira o código 157651

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação SISTEMAS COSTEIROS E OCEÂNICOS da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da dissertação de Mestrado de **ANA CLAUDIA OLIVEIRA DE ALMEIDA** intitulada: **Avaliação da toxicidade do sedimento da Baía de Paranaguá sobre microalga verde e correlação com os níveis de contaminação e as atividades antrópicas locais usando um método indireto de quantificação celular**, sob orientação da Profa. Dra. SILVIA PEDROSO MELEGARI, que após terem inquirido a aluna e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de mestra está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

Pontal do Paraná, 23 de Fevereiro de 2022.

Assinatura Eletrônica
03/03/2022 12:15:54.0
SILVIA PEDROSO MELEGARI
Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica
09/03/2022 11:18:27.0
FABIO KUMMROW
Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO)

Assinatura Eletrônica
03/03/2022 12:22:51.0
ANA CAROLINE CABRAL
Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica
04/03/2022 18:26:30.0
WILLIAM GERSON MATIAS
Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA)

**A TODAS AS MÃES PESQUISADORAS, MULHERES INCRÍVEIS E
PERSISTENTES**

Agradecimentos

Primeiramente agradeço ao meu filho José Kauê, que nasceu no meio de uma pandemia e me deu muita força para continuar este trabalho. Agradeço também ao Marcelo que foi e é um parceiro incrível e de fundamental importância para a conclusão deste trabalho, me dando apoio técnico e emocional. Um muito obrigada aos meus pais por serem meu porto seguro e me apoiarem e amarem incondicionalmente durante todas as etapas da minha vida. Agradeço também a Líbia, ao Fabio e a Taise por terem me dado apoio durante todo esse processo. Aos meus tios, Tias, primos e primas e meu vizinho, muito obrigada por ser a melhor família do mundo. Aos meus amigos da PGSISCO, muito obrigada por compartilhar esse período comigo em especial a Dai, ao Gabriel e a Taw que dividiram tanto momentos comigo tornando os dias em pontal muito mais leves. Aos amigos da vida obrigada por mesmo longe estarem sempre por perto, em especial a Gi, Jú kina, Jú Isabel, Duda, Nick, Ana Carol, Gabi, Bere e Dine. Aos amigos de que pontal me deu Rafa, Dafne, Isa, Do, Evelyn, Katia e Nay, muito obrigada. Um agradecimento especial para o meu grupo de mães que foram lindas, parceiras e companheiras pra tudo, em especial a Tay, Dri, Karol e Vanessa. Não poderia deixar de agradecer a minha família americana que mesmo longe sempre me apoiaram muito, Lynn, Tara, Josh, Rich, Jayce, Kieran e Arion, além disso que agradecer também as minhas amigas Frida, Morgan e Macyn por estarem sempre presente na minha vida. Um agradecimento especial a Dra. Silvia Pedroso Melegari pela oportunidade de integrar o Laboratório de Ecotoxicologia do CEM, obrigada pela paciente e fundamental orientação, por compartilhar sua experiência neste valioso período e por compartilhar o crescimento e peripécias dos nossos amados pets. Agradeço a Laís por dividir horas de laboratório, por ser uma IC tão dedicada e uma amiga muito especial. Agradeço também a Ana Carol, Marines, Marininha e Amanda por todo suporte e apoio. Agradeço aos professores e ao programa da PGSISCO por estarem sempre à disposição, em especial aos professores César Martins, Maikon Di Domênico e Renata Nagai. Aos meus amados pets, Preto, Tchuka, Kin e Bituca. A CAPES pela concessão da bolsa de estudos. E agradeço a vida por

sempre me mostrar o caminho e mostrar que no fim tudo vai dar certo, e minha
vozinha que está sempre presente no meu coração.

Muito Obrigada !

**“TENHO A IMPRESSÃO DE TER SIDO UMA CRIANÇA BRINCANDO À
BEIRA-MAR, DIVERTINDO-ME EM DESCOBRIR UMA PEDRINHA MAIS
LISA OU UMA CONCHA MAIS BONITA QUE AS OUTRAS, ENQUANTO O
IMENSO OCEANO DA VERDADE CONTINUA MISTERIOSO DIANTE DE
MEUS OLHOS”. (ISAAC NEWTON,1687)**

RESUMO

O sedimento é uma importante matriz nos estudos ambientais para avaliar mudanças na qualidade e na saúde dos ecossistemas aquáticos, assim como as microalgas são bons indicadores ambientais devido a sua posição estratégica na cadeia trófica. Nesse contexto, esta pesquisa teve como principais objetivos calibrar um modelo de regressão linear para estimar a densidade celular das microalgas verdes *Desmodesmus subspicatus* e *Tetraselmis* sp., espécies representativas de ecossistemas de águas doce e marinha, respectivamente; e avaliar a toxicidade de amostras de sedimento do Complexo Estuarino de Paranaguá (CEP) sobre a microalga marinha *Tetraselmis* sp, relacionando esses resultados com interferências antrópicas conhecidas no ecossistema local. As espécies de microalgas foram cultivadas em laboratório conforme normas nacional e internacional. Ambas as microalgas *D. subspicatus* e *Tetraselmis* sp demonstraram relação significativa entre a densidade celular e a absorbância em comprimentos de onda de 680 nm e 425 nm, respectivamente. Os modelos lineares apresentaram um bom ajuste ao conjunto de dados e à variância observada. Esses resultados atestaram a confiabilidade do método, além de ser rápido e de fácil reprodução para aplicação no controle de cultivos e em testes ecotoxicológicos com essas microalgas. Este método foi utilizado na avaliação da toxicidade das amostras de sedimento do CEP. Foram coletadas 5 amostras de sedimentos superficiais (0–3 cm) ao longo do eixo leste - oeste (Baías de Paranaguá e Antonina) e do eixo norte - sul (Baía de Laranjeiras). Os ensaios toxicológicos destas amostras foram realizados empregando a microalga marinha *Tetraselmis* sp. Adicionalmente, nos sedimentos foram determinados parâmetros como granulometria, elementos traços e contaminantes orgânicos. A análise de componentes principais (PCA) indicou a formação de três agrupamentos espaciais: (1) composto pelo ponto P1 e associado as maiores concentrações de *p,p'*-DDT e LABs totais; (2) composto pelos pontos P2, P3 e P4 e associado as maiores concentrações de elementos-traço, HPAs, PCBs totais e lama, (3) composto pelo ponto P5 e associado as maiores porcentagens de areia e menores concentração de contaminantes. Os níveis dos estressores químicos (elementos-traço e compostos orgânicos) atenderam os requisitos das

diretrizes de qualidade de sedimentos (SQGs) estabelecido por órgãos como CONAMA e NOAA. Todavia, os resultados dos ensaios de toxicidade mostraram que o sedimento de dois pontos amostrados (P1 e P3) apresentaram efeito tóxico à microalga *Tetraselmis* sp. (96 h de exposição). Apesar dos valores indicados pelo SQGs indicarem ausência de contaminação, o presente estudo traz um alerta sobre o potencial efeito sinérgico dos contaminantes, o qual ainda, devido à complexidade e especificidades, não está presente nas diretrizes vigentes norteadoras da qualidade do sedimento. O uso de ensaios toxicológicos combinados aos parâmetros químicos de monitoramento, pode fornecer uma importante ferramenta para o controle da qualidade de ambientes, em locais que podem possivelmente sofrer pressões antrópicas de múltiplas fontes, como o local de estudo.

Palavras-chave: microalgas verdes, estressores químicos, testes ecotoxicológicos, misturas complexas.

ABSTRACT

Sediments are important matrix in environmental studies to assess changes in the quality and health of aquatic ecosystems, as well as microalgae are good environmental indicators due to their strategic position in the food chain. In this context, the main objectives of this research were the calibration of a linear regression model to estimate the cellular density of the green microalgae *Desmodesmus subspicatus* and *Tetraselmis* sp., representative species of freshwater and marine ecosystems respectively; and to evaluate the toxicity of sediment samples from the Estuarine Complex of Paranaguá (PEC) using the marine microalgae *Tetraselmis* sp., correlating the results with anthropic interferences that occur in this ecosystem. The microalgae species were cultured in the laboratory according to national and international standards. Both *D. subspicatus* and *Tetraselmis* sp demonstrated a significant relationship between cell density and absorbance at wavelengths of 680 nm and 425 nm, respectively. The linear models showed a good fit to the data set and to the observed variance.. These results demonstrated that the tested method is reliable, in addition to being fast and easy to reproduce for application in the control of algae culture and in ecotoxicological tests with green microalgae. This method was applied in the toxicity assessment of PEC sediment samples. Five samples of surface sediments (0–3 cm) were collected along the east - western axis (Paranaguá and Antonina Bays) and the south - north axis (Laranjeiras Bay). The toxicological tests of these samples were performed using the marine microalgae *Tetraselmis* sp. Additionally, granulometry and quantification of some chemical stressors (trace elements and persistent organic contaminants) were determined. Principal component analysis (PCA) indicated the formation of three spatial clusters: (1) composed of site P1, associated with the highest concentrations of *p,p*DDT and total LABs; (2) composed of sites P2, P3 and P4, associated with higher concentrations of trace elements, PAHs, total PCBs and mud, (3) composed of site P5, associated with higher percentages of sand and lower concentrations of contaminants. The results of the quantitative parameters of chemical stressors (trace elements and organic compounds) met the requirements of the sediment quality guidelines (SQGs) established by national and international guidelines such as CONAMA and NOAA. However,

the results of the toxicity tests showed that the sediment from two sampled sites (P1 and P3) had toxic effect to the microalgae *Tetraselmis* sp. (96 h exposure). Although the values from the SQGs indicate absence of contamination, the present study brings an alert about the potential synergistic effect of the contaminants, which, due to the complexity and specificities, is still not included in the current guidelines for sediment quality. The use of toxicological tests combined with chemical monitoring parameters can provide an important tool for quality control in environments that suffer mixed anthropic pressures such as the study site.

Keywords: green microalgae, chemical stressors, ecotoxicological tests, complex mixtures.

RESUMO EM LINGUAGEM ACESSIVEL

Os ambientes aquáticos tendem a apresentar diversos contaminantes que são provenientes de atividades humanas que ocorrem ao seu redor. Os efeitos da mistura desses contaminantes são muitas vezes desconhecidos e podem ser tóxicos para diversos ecossistemas aquáticos. a maioria destes contaminantes tende a ser transportado para o fundo, e se concentrar no sedimento. Com isso, os sedimentos podem ser utilizados em estudos ambientais para avaliar mudanças na qualidade dos ecossistemas aquáticos. dentro do amplo espectro de organismos aquáticos, as microalgas podem ser utilizadas como bons bioindicadores ambientais, fornecendo importantes informações sobre impactos ambientais relacionados à poluição aquática. por isso, esses microrganismos são recomendados para uso em testes de toxicidade por normas nacionais e internacionais. nesse sentido, esta pesquisa teve dois grandes objetivos: (1) calibrar um método de quantificação da densidade celular das microalgas verdes marinhas e de água doce, e (2) aplicar esse método na avaliação da toxicidade de amostras de sedimento coletados na baía de Paranaguá, e discutir os resultados com as principais interferências humana sobre o ecossistema local. Os resultados mostraram que o método desenvolvido para a quantificação das microalgas é confiável, além de ser rápido e de fácil reprodução para aplicação em controle de cultivos e em testes ecotoxicológicos. para a avaliação das amostras de sedimento coletados na baía de Paranaguá, foram realizadas análises químicas de metais e poluentes orgânicos como os HPAs e DDTs e, em paralelo, foram feitos os ensaios de toxicidade destes sedimentos utilizando a microalga marinha cultivada em laboratório. Os resultados demonstraram que, apesar de todos os pontos analisados apresentarem parâmetros dentro dos limites estabelecidos pelos órgãos regulamentadores (conama e noaa), sedimentos de dois pontos apresentaram efeito tóxico sobre as microalgas marinhas expostas. os dois pontos com toxicidade são pontos próximos as cidades de paranaguá e antonina, e seus respectivos portos, que impactam a regiões devido a maior urbanização e concentração humana e atividades como, transporte marítimo e agricultura. Os resultados desse estudo servem como um alerta para a necessidade de que o monitoramento das amostras de sedimento não

empreguem apenas parâmetros químicos, mas principalmente o efeito tóxico causado aos organismos aquáticos, em especial os decorrentes de efeitos sinérgicos. essa abordagem pode reduzir riscos a médio e longo prazo à saúde da população e ao ecossistema regional. A resposta da exposição de um organismo à uma matriz contaminada considera a concentração dos químicos e também a mistura destes. Desta forma, permite identificar a potencialização do efeito tóxico pela combinação de concentrações em baixas doses, quando comparado aos contaminantes isolados.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

Fig. 1. Scanning visible spectra of both microalgae cultures (range of 700 to 300 nm) used to identify and to choose the maximum wavelength work of 425 nm for *Tetraselmis* sp., and 680 nm for *D. subspicatus*.**Erro! Indicador não definido.**4

Fig. 2. Relationship between cell density and absorbance as determined by linear regression model for distinct cultures of *Tetraselmis* sp. (a) and *D. subspicatus*(b).....**Erro! Indicador não definido.**5

CAPÍTULO 2

Figura 1. Localização dos pontos de coleta das amostras de sedimento no Complexo Estuarino de Paranaguá (CEP)- Paraná – Brasil. P1: -25 30.156S, -48 32.748W; P2: -25 27.489S, -48 32.467W; P3: -25 27.739S, -48 40.361W; P4: 25 26.325S, -48 40.130W; e P5: -25 31.090S, -48 27.487W..... 743

Figura 2. Análise de Componentes Principais (PCA) mostrando a diferenciação dos sites em relação a granulometria e as concentrações de elementos-traço e os POPs nas amostras de sedimento do CEP. 821

Figura 3. Ensaios de toxicidade crônica dos elutriatos das amostras P1 (a) e P3 (b) empregando a microalga *Tetraselmis* sp. nos tempos de exposição de 24, 48, 72 e 96h. *P<0,05 indica crescimento significativamente menor em comparação ao controle. 84

ANEXO – MATERIAL SUPLEMENTAR

Figura S1. Avaliação das variáveis que mais contribuíram na formação dos dois primeiros componentes da PCA. A linha de referência (tracejada vermelha) corresponde ao valor esperado se a contribuição for uniforme. 95

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

Table 1. Linear regression model parameters for isolated and grouped cultures of *Tetraselmis sp* and *D. subspicatus*. Significant codes: $p < 0.0001$ '***', $p < 0.001$ '**', $p < 0.01$ '*'.
.....**Erro! Indicador não definido.**

CAPÍTULO 2

Tabela 1. Concentrações dos elementos-traço (mg/kg), $\Sigma p,p'$ -DDTs, Σ HPAs, LABs e PCBs (ng/g) nos pontos amostrados do CEP, comparados com as diretrizes estabelecidas internacionalmente pela NOAA. Valores em negrito excedem os limites estabelecidos nas SQGs..... 79

Tabela 2. Análise de variância por permutação entre os tratamentos e tempo de exposição da microalga *Tetraselmis sp.* aos elutriatos dos locais P1 e P3. Valores significativos: $P < 0.05$ (*), $P < 0.001$ (**), $P < 0.0001$ (***).
.....**Erro! Indicador não definido.**5

ANEXO - MATERIAL SUPLEMENTAR

Tabela S1. Valores mensuradas para as variáveis granulométricas, poluentes orgânicos, metais e arsênio no sedimento dos sites amostrais no Complexo Estuarino de Paranaguá..... 96

Tabela S2. Resultados das análises pareadas por permutação (pseudo-*t* teste) entre as diferentes concentrações e tempos de exposição da microalga *Tetraselmis sp.* ao elutriato dos sedimentos dos sites P1 e P3. Valores significativos: $P(MC) < 0.05$ (*), $P(MC) < 0.001$ (**), $P(MC) < 0.0001$ (***).
..... 97

LISTA DE ABREVIATURAS OU SIGLAS

ABNT – Associação Brasileira de Normas Técnicas

Abs – Absorbância

AFNOR – Association Française de Normalisation

Al₂O₃ – Óxido de alumínio (Alumina)

As – Metalóide arsênio

ASTM – American Society for Testing and Materials

AWWA – American Water Works Association

CEO – Concentração de efeito observado

CEP – Complexo estuarino de Paranaguá

CENO – Concentração de efeito não observado

Cr – Cromo

Cu – Cobre

DDT – Dicloro-Difenil-Tricloroetano

DO – Densidade ótica

FCM – Citometria de fluxo

HPA – Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos

HCH – Hexaclorociclohexanos

HCL – Ácido clorídrico

H₂O₂ – Peróxido de hidrogênio

mL – Mililitros

MO – Matéria orgânica

Ni – Níquel

nm – Nanômetro

Na₂SO₄ – Sulfato de sódio

ICP-OES – Espectrometria de emissão ótica de plasma indutivamente acoplado

ISO – International Organization for Standardization

OC – Compostos organoclorados

OECD – Organisation for Economic Co-operation and Development

OD – Optical density

Pb – Chumbo

PCA – Principal component analysis

PCB – Polychlorinated biphenyl

PEC – Paranaguá Estuarine Complex

PNUMA - Programa das Nações Unidas para o Meio Ambiente

POP – Poluentes Orgânicos Persistentes

R² – Coeficiente de correlação

SiO₂ – Óxido de Silício (Sílica)

SPM – Suspended particulate matter

SQGs – Sediment quality guideline

USEPA – United States Environmental Protection Agency

UV-vis – Ultraviolet-visible

μL – Microlitros

Zn – Zinco

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL	21
2.1. Ambientes Estuarinos	23
2.2. Poluentes	24
2.2.1. Contaminantes orgânicos persistentes	24
2.2.2. Elementos-traço	27
1.3 Toxicologia Ambiental	29
1.3.1. Misturas complexas.....	30
1.3.1. Testes de toxicidade clássicos	31
1.4 Algas	32
1.4.1. Microalgas como organismos teste.....	33
1.4.2. Uso de microalgas em ensaios toxicológicos e métodos de contagem celular ..	34
1.5 Aspectos legais e institucionais	36
2. HIPÓTESES	39
3. OBJETIVOS	39
3.1. Objetivo geral	39
3.2. Objetivos específicos	39
4. REFERÊNCIAS	40
5. CAPÍTULO 1	51
<i>TÍTULO: Cell density of green microalgae estimated by spectrophotometry: a useful tool for the control of aquacultures and toxicological tests.....</i>	51
ABSTRACT	52
ACKNOWLEDGMENTS	58
REFERENCES	59
6. CAPÍTULO 2	66
<i>TÍTULO: Avaliação da toxicidade em sedimento de um estuário subtropical usando microalgas verdes e correlação com estressores químicos: uma abordagem integrada</i>	66
RESUMO	67
ABSTRACT	69
1. INTRODUÇÃO	70
2. MATERIAIS E MÉTODOS	73

2.1 Área de Estudo e amostragem dos sedimentos	73
2.2. Granulometria.....	74
2.3. Quantificação dos elementos-traço.....	75
2.4. Contaminantes orgânicos	75
2.5. Teste de toxicidade com microalgas.....	77
2.7. Análise estatística	78
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	80
3.1. Composição química dos sedimentos: abordagem tradicional da granulometria, elementos-traço e Contaminantes orgânicos POPs	80
3.2. <i>Ensaio toxicológico das amostras de sedimentos do CEP: uma abordagem diferenciada de poluição</i>	84
4. CONCLUSÃO.....	89
REFERÊNCIAS – CAPÍTULO 2.....	90
7. ANEXO CAPÍTULO 2 – MATERIAL SUPLEMENTAR.....	96
8. SUMÁRIO DE RESULTADOS E CONCLUSÃO GERAL	99
8.1 Recomendações	100
9. REFERÊNCIAS DA DISSERTAÇÃO	102

1. INTRODUÇÃO GERAL

As zonas costeiras comportam os ecossistemas mais produtivos do globo. Nestas regiões, o aporte de nutrientes de origem continental incrementa a produção primária (BOOIJ et al., 2015; NICHOLS; SEMINOFF; ETNOYER, 2010). Devido à alta produtividade biológica, riqueza de espécies e fácil acesso, esses ecossistemas desempenham um papel importante no desenvolvimento econômico e social em diferentes regiões ao redor do mundo (KATSANEVAKIS et al., 2011; PRIMAVERA, 2006). Dentre os ecossistemas mais importantes nas zonas costeiras, estão os estuários, que são ambientes de transição entre água doce e marinha, com uma variedade complexa de habitats (ADAMS, 2014). A água doce é misturada com a água do mar pelo fluxo de marés, onde gradientes de salinidade são estabelecidos ao longo de uma zona de mistura (LESSA et al., 2018).

Os sedimentos estuarinos passam por considerável reciclagem interna por meio da deposição e ressuspensão sedimentar. Essas transformações e dinâmicas deposicionais são impulsionadas por uma complexa interação entre processos geológicos, físicos, químicos e biológicos, que são modulados por uma ampla gama de fatores, como vento, luz solar, calor, ondas, correntes de marés e descargas de água doce (REGNIER et al., 2013).

Os estuários atuam como receptores de diversos tipos de descargas de resíduos contendo altos níveis de contaminantes, que tendem a se concentrar nos sedimentos de fundo, de forma que a ocupação e as atividades antrópicas nas regiões costeiras podem ameaçar este ecossistema (MERHABY et al., 2015).

Entre esses contaminantes pode-se citar os POPs, cuja a distribuição nos compartimentos ambientais está fortemente relacionada as suas propriedades físico-químicas (WANIA; MACKAY, 1996). Estes compostos são hidrofóbicos, ou seja, possuem pouca afinidade com a água e também lipofílicos, ou seja, possuem afinidade com gordura (ASHRAF, 2017; JONES; VOOGT, 1999). Adquirindo um grande potencial de bioacumulação, baixas taxas de degradação e alta adsorção em sedimentos (ASHRAF, 2017; MENG et al., 2017). A adsorção dos POPs aos sedimentos é um mecanismo importante que afeta o destino dos poluentes nos ambientes aquáticos. Esses

poluentes em ambientes aquáticos associam-se na coluna d'água preferencialmente ao material particulado em suspensão, e são transportados e armazenados no compartimento sedimentar.

Também, é relevante chamar atenção aos elementos-traço, que são elementos que também ocorrem naturalmente e são liberados no ambiente através de fontes naturais como, o intemperismo de minerais, erosão e atividade vulcânica (ALI; KHAN; SAJAD, 2013). Através de rios e córregos, os elementos-traço são transportados como espécies dissolvidas na água ou como parte integrante de sedimentos em suspensão, sendo o primeiro com maior potencial de causar os efeitos deletérios (DURUIBE; OGWUEGBU; EGWURUGWU, 2007).

No meio ambiente, os organismos vivos são expostos a uma mistura de contaminantes, que chegam aos compartimentos por diferentes vias, como resultado da variabilidade ambiental e do descarte de resíduos em compartimentos ambientais (WU et al., 2016). A toxicidade de uma substância reflete a capacidade de produzir efeitos adversos. Os efeitos tóxicos dos poluentes industriais podem se expressar através da baixa produção de biomassa, baixa diversidade e alterações na fotossíntese das algas (RICART et al., 2009). As algas são os principais produtores primários nos ecossistemas aquáticos costeiros, contribuindo com aproximadamente metade da rede global de produtividade primária (FIELD et al., 1998). Esses organismos podem ser classificados em microalgas e macroalgas (KRÖGER; MÜLLER-LANGER, 2012). E estão sendo cada vez mais utilizadas como organismos testes em estudos toxicológicos (ALMEIDA et al., 2021; MELEGARI et al., 2013).

Para testes de toxicidade, a confiabilidade é um pré-requisito para obter resultados robustos e uma correta interpretação dos dados (IMRE; VLASE; MUNEAN, 2008). Assim, a quantificação da biomassa de algas por contagem de células geralmente é feita por métodos mais lentos e trabalhosos, pois requer uma contagem direta de células usando um microscópio ou medidas de massa ou volume celular (BOROS; OSTAFE, 2020; RODRIGUES et al., 2011). Métodos indiretos que correlacionam densidade de algas com absorvância de luz de fluorescência em comprimentos de onda específicos, além de serem mais confiáveis, também são fáceis de desenvolver (BOROS; OSTAFE, 2020).

Dentro desse contexto, a pesquisa visa contribuir para o avanço do conhecimento da temática toxicológica, essencial para a conservação do meio ambiente e da saúde pública. A validação de um método de contagem de microalgas que facilita experimentos toxicológicos é uma maneira de trazer mais precisão e eficiência nos trabalhos laboratoriais de toxicologia ambiental. Além disso esse trabalho também irá contribuir para o maior entendimento da toxicidade de amostras de sedimento do Complexo Estuarino de Paranaguá (CEP), avaliando a ocorrência e toxicidade de POP e metais, correlacionando seus resultados com as mudanças de origem antrópica no ecossistema local.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. *Ambientes Estuarinos*

A regiões costeiras comportam os ambientes mais ricos e produtivos. Dentre esses ambientes, destaca-se os estuários, ambientes com uma interface entre continente – oceano, o que os tornam locais de preferência para a ocupação humana. Consequentemente, os estuários são altamente vulneráveis à influência e pressões das atividades antrópicas, como agricultura, dragagem, pesca, atividades portuárias, lançamento de águas residuais (NICOLAS et al., 2010). Além de serem influenciados por processos que controlam a mistura e o transporte de materiais, eles afetam as propriedades físico-químicas dos sedimentos e da coluna de água (GIMÉNEZ et al., 2014). Consequentemente, os estuários podem ser classificados quanto a sua estrutura de salinidade (bem misturada a estratificada), faixa de marés e geomorfologia (ROBINS et al., 2016).

Os ambientes estuarinos são altamente dinâmicos e atuam no transporte, modificação, aprisionamento e filtro de materiais (REGNIER et al., 2013). Os processos deposicionais nestes ambientes são predominantes, ocasionando o aprisionamento de poluentes químicos e nutrientes derivados tanto da erosão natural como de produtos antropogênicos (ADAMS, 2014; BOTTÉ; FREIJE; MARCOVECCHIO, 2010; REGNIER et al., 2013; TURNER; TAYLOR, 2018). Esses poluentes são encontrados associados principalmente ao sedimento mais fino (BOTTÉ; FREIJE; MARCOVECCHIO, 2010).

A maioria dos contaminantes disponíveis na coluna de água é adsorvida no material particulado em suspensão (MPS), o qual é depositado em sedimentos por processos como floculação e sedimentação (FERNANDES et al., 2011). Um dos compartimentos mais importantes da zona costeira é a matriz sedimentar, por ser considerada um reservatório para vários tipos de poluentes químicos (OMAR et al., 2018). Essa matriz tem sido amplamente utilizada como indicador de qualidade ambiental (BERBEL; FAVARO; BRAGA, 2015).

Os níveis de poluentes tóxicos como elementos-traço e contaminantes orgânicos persistentes nos sedimentos são considerados indicadores eficazes da qualidade ambiental em ecossistemas aquáticos (MWANAMOKI et al., 2014). Esses elementos são mobilizados, principalmente, por processos antropogênicos, e suas características tóxicas, mutagênicas e cancerígenas colocam em risco a biota aquática (DOONG et al., 2008).

2.2. Poluentes

Os ecossistemas aquáticos são frequentemente impactados pela poluição química, originária de esgotos domésticos, efluentes (fontes pontuais), deposição atmosférica, escoamento de águas urbanas e áreas agrícolas (fontes difusas) entre outros (EQANI; MALIK; MOHAMMAD, 2011; LEE et al., 2015; MANOLI; SAMARA, 1999; QADIR; MALIK; HUSAIN, 2008).

Um poluente é qualquer substância que no meio ambiente, seja capaz de causar efeitos prejudiciais ao bem-estar do ambiente, reduzindo a qualidade de vida e, eventualmente, causando a morte de organismos. São substâncias que podem estar presentes no ambiente além de um limite pré estabelecido por regulamentações ou por valores de tolerância, que pode ser um limite desejável ou aceitável (DURUIBE; OGWUEGBU; EGWURUGWU, 2007).

2.2.1. Contaminantes orgânicos persistentes

Poluentes orgânicos persistentes (POP) são compostos orgânicos de origem natural ou antropogênica que resistem à degradação fotolítica, química e biológica (WENNING; MARTELLO, 2014). Além de serem compostos que possuem toxicidade, potencial de bioacumulação, persistência no ambiente e

suscetibilidade ao transporte de longo alcance (BEYER et al., 2000). Os POPs são todos os contaminantes listados na A Convenção de Estocolmo, que é um tratado global sob o Programa das Nações Unidas para o Meio Ambiente (PNUMA) que entrou em vigor em 2004 com a participação de 171 países. O objetivo dessa convenção é proteger os seres humanos e o meio ambiente de produtos químicos perigosos e persistentes, reduzindo ou eliminando sua produção e introdução no meio ambiente. No início havia 12 produtos químicos chamados de “dúzia suja”. Porém em 2009, novos produtos químicos foram adicionados e em 2011 a lista fechou com 22 POPs. (XU; WANG; CAI, 2013).

Esses contaminantes são produzidos e introduzidos intencionalmente no ambiente. A elevada estabilidade e alcançar longas distancias, eles agora são onipresentes em todo o mundo. Também, sua alta solubilidade em gordura, faz com que esses químicos tendem a se bioacumular em animais (XU; WANG; CAI, 2013). Esse produtos podem ser utilizados para diversas finalidades, como: inseticidas, herbicidas fungicidas ou para fins industriais como os PCBs. (EQANI et al., 2013; TSAI, 2010). A entrada desses contaminantes no ambiente marinho acontece principalmente via precipitação atmosférica, efluentes industriais e urbanos, descargas de rios e escoamento continental (EQANI; MALIK; MOHAMMAD, 2011; MANOLI; SAMARA, 1999; QADIR; MALIK; HUSAIN, 2008). Os POPs apresentam características tóxicas, são persistentes, bioacumulam e podem biomagnificar nas teias tróficas aquáticas marinhas. Isso ocorre por que os POPs não são facilmente degradados no meio ambiente, impondo efeitos não somente no local de emissão, mas também na biota marinha adjacente ou distante de sua origem (ASHRAF, 2017; BREIVIK et al., 2006; EQANI et al., 2013; HARMENS et al., 2013; JONES; VOOGT, 1999; XU; WANG; CAI, 2013).

Dentre os POPs, os diclorodifeniltricloroetanos (DDT) e os hexaclorociclohexanos (HCH), são os praguicidas e fungicidas mais conhecidos, sendo amplamente utilizados em todo o mundo entre as décadas de 1950 e 1980 como praguicidas agrícolas e domésticos (TIEYU et al., 2005). O DDT foi sintetizado pela primeira vez em 1874, mas suas propriedades inseticidas permaneceram desconhecidas até serem relatadas em 1939 pelo químico suíço Paul Hermann Muller (TIEYU et al., 2005). As propriedades

físico-químicas, combinadas com a ampla utilização desses compostos no passado, representaram ameaças significativas e crescentes à saúde humana e ao meio ambiente, o que provocou o surgimento de tratados e leis que foram elaboradas para eliminar ou restringir a produção e o uso dos POPs.

Quando estes poluentes são introduzidos no compartimento aquático, eles tendem a se acumular em partículas e sedimento de fundo. Organismos base de cadeia incorporam esses compostos, principalmente por filtração, iniciando o processo de bioacumulação e biomagnificação ao longo da teia trófica, atingindo os predadores de topo (ROCHE et al., 2009). Consequentemente, os predadores de topo vão apresentar maiores concentrações de POPs. A entrada significativa desses poluentes nos ambientes aquáticos, faz com que os organismos sejam inevitavelmente expostos a uma infinidade de praguicidas toxicologicamente e estruturalmente diferentes, e avaliar seus efeitos tóxicos nesses organismos é um grande desafio do ponto de vista científico (BACCHETTA et al., 2014; MACLEOD et al., 2004).

Os praguicidas, que são usados para eliminar pragas, são ao mesmo tempo altamente tóxicos para uma variedade de plantas e animais, incluindo seres humanos. Diversos estudos apresentam a concentração de POPs em organismos como peixes, bivalves e mamíferos marinhos (ex. AMIN; COMOGLIO; SERICANO, 2011; DA SILVA et al., 2016; DURANTE et al., 2016; LIEBEZEIT et al., 2011; TOMBESI et al., 2018), apontando uma variabilidade nas concentrações de acordo com o tipo de tecido analisado. Diversos estudos também apontam para os riscos ecotoxicológicos analisados em alguns organismos como os bivalves e microalgas (ex. IVORRA et al., 2019; LIEBEZEIT et al., 2011; MEGHARAJ; BOUL; THIELE, 1999; SHOAIB et al., 2011). Os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HPAs) são um grupo de compostos com 2 a 7 anéis aromáticos fundidos (AREY; ATKINSON, 2003; DI TORO; MCGRATH; HANSEN, 2000). As propriedades físico-químicas dos HPAs permite que eles se distribuam pelo ar, solo e corpos d'água onde sua presença é onipresente. Isso é preocupante uma vez que são altamente persistentes meio ambiente e podem se acumular nos tecidos biológico dos organismos, podendo ser transferidos de um nível trófico para outro (BAUMARD et al., 1998; DE ALMEIDA et al., 2018). Visto que esses

compostos possuem efeitos tóxicos, mutagênicos e carcinogênicos em organismos vivos (BOSTRÖM et al., 2002). Além disso os HPAs são os compostos mais relacionados ao impacto ocasionado por atividades portuárias e navegação.

2.2.2. Elementos-traço

O desenvolvimento econômico e a rápida industrialização ao longo das regiões costeiras se tornaram um gatilho para a introdução elevada de elementos-traço em sedimentos marinhos (KASILINGAM et al., 2016). Elementos-traço são um conjunto de elementos inorgânicos metálicos ou não-metálicos, presentes em concentrações muito baixas. A era industrial proporcionou o crescente uso desses elementos em atividades antrópicas devido a suas propriedades como resistência mecânica, condutividade elétrica ou térmica, o que levou à liberação e consequente contaminação dos compartimentos ambientais por metais (CHOUVELON et al., 2017). A maior parte dos elementos-traço que chega ao ambiente aquático está diretamente relacionada a descarga de resíduos urbanos e águas residuárias urbanas e industriais, mas também muitos são transportados pela atmosfera (KASILINGAM et al., 2016). Dessa forma, as áreas costeiras como estuários estão expostas ao enriquecimento de e à poluição por elementos-traço, principalmente por causa de escoamentos industriais ou agrícolas e trocas gasosas na interface água-atmosfera (SUBIDA et al., 2013).

Como os elementos-traço são elementos essencialmente conservativos, a acumulação nos solos e na biota representa um risco para a qualidade ambiental e saúde humana (ALI; KHAN; SAJAD, 2013). No ambiente aquático, os elementos-traço são geralmente mais resilientes do que os contaminantes orgânicos (ex., praguicidas ou derivados de petróleo) devido as suas propriedades físico-químicas específicas (HASHIM et al., 2011).

Uma vez que os elementos-traço ingressam nos ecossistemas aquáticos, eles interagem com um amplo espectro de componentes abióticos e diversidade de espécies, e por meio de processos dinâmicos, pode resultar em uma variedade de novos compostos (VIOLANTE et al., 2010; WARREN; HAACK, 2001). No compartimento aquático, o comportamento dos elementos-

traço irá depender de sua especiação (DOMINGOS et al., 2015). Tais espécies incluem íons livres, complexos inorgânicos, complexos orgânicos e metais absorvidos, adsorvidos ou incorporados dentro de coloides ou partículas (VALENCIA-AVELLAN et al., 2017). A formação de complexos metálicos depende da concentração de todos os componentes dissolvidos, pH, força iônica, potencial redox e presença de outros cátions e ânions que possam formar complexos e precipitar com o íon metálico de interesse (NAMIEŚNIK; RABAJCZYK, 2010; STRANDESEN et al., 2007).

A toxicidade dos elementos-traço em soluções aquosas depende da forma de ocorrência da espécie e também das características físico-químicas (NAMIEŚNIK; RABAJCZYK, 2010). Muitos metais e metalóides são tóxicos, mesmo em baixas concentrações, podendo causar efeitos indesejáveis e problemas graves, incluindo disfunções imunológicas, desenvolvimento intrauterino anormal, deficiências associadas a desnutrição além de altas taxas de câncer gastrointestinal (ARORA et al., 2008; KARA, 2005; KHAN et al., 2008; MEMON; SCHRÖDER, 2009). Portanto, os elementos-traço têm sido amplamente estudados por seus efeitos tóxicos, e estudos utilizando os ensaios toxicológicos mostram, por exemplo, a concentração e efeitos de metais como o zinco (Zn), cromo (Cr), cobre (Cu), chumbo (Pb), níquel (Ni) e o metaloide arsênio (As) em peixes, onde é possível observar uma mortalidade desses organismos depois de expostos por períodos de dias e também efeitos que alteram precocemente o funcionamento metabólico desses organismos (AUTHMAN, 2015; EROGLU et al., 2015; SFAKIANAKIS et al., 2015).

Espécies de gastrópodes e bivalves também apresentaram respostas aos efeitos dos elementos-traço, isso porque esses organismos tendem a acumular altos níveis de metais e metalóides por serem organismos filtradores e sésseis, o que os tornam bons indicadores de qualidade ambiental, assim como as algas (CAMPANELLA et al., 2001; CHU et al., 2019).

2.3 Sedimento

Os sedimentos superficiais estão sujeitos a vários processos, incluindo mobilização, transporte, bioturbação, entre outros. Dessa forma, esses processos fazem com que o sedimento e, conseqüentemente, os compostos nele aderidos, sejam suspensos e disponibilizados no ecossistema, facilitando

o transporte dos contaminantes por longas distâncias (WIBERG; HARRIS, 2002).

Contaminantes e matéria orgânica (MO) têm afinidade pela fração mais fina de sedimentos devido ao aumento exponencial na área superficial com diminuição da granulometria e aumento da carga superficial (NAYAR et al., 2007; SAKAI; KOJIMA; SAITO, 1986). Em geral, quanto maior a quantidade de sedimentos finos (silte e argila), maior será a capacidade de adsorver e acumular compostos orgânicos (HASSINK, 1997). O tamanho do grão e o conteúdo de MO são as principais características dos sedimentos e os principais fatores que controlam a sorção de contaminantes orgânicos hidrofóbicos (ZHAO et al., 2010). A distribuição de carga superficial de partículas é um problema fundamental para estudos de adsorção e dessorção de partículas de sedimento (HUANG; FANG; CHEN, 2012). Uma superfície é carregada por interação química, ou por forte adsorção, com constituintes da água do mar, principalmente por aqueles presentes em concentração elevadas. A carga superficial não depende unicamente da concentração de uma classe de íons, mas sim de vários íons, que influenciam e são importantes para esse processo (PRAVDIĆ, 1970).

1.3 Toxicologia Ambiental

O lançamento do livro Primavera Silenciosa (*Silent Spring*), de Rachel Carson, no início da década de 1960 (CARSON, 1962), aumentou a conscientização sobre a ameaça que os praguicidas representavam aos seres humanos e ao meio ambiente. Com este livro, veio o conceito de “toxicologia ambiental” e as pesquisas nesta área tem crescido rapidamente nos últimos anos (YE et al., 2015).

A toxicologia pode ser definida como o ramo da ciência que lida com substâncias que podem causar efeitos nocivos quando administrados em doses inadequadas a um organismo vivo. O estudo da toxicologia serve à sociedade de muitas maneiras, não apenas para proteger os humanos e o meio ambiente dos efeitos deletérios das substâncias tóxicas, mas também para facilitar o desenvolvimento de agentes tóxicos mais seletivos, como anticâncer e outros fármacos e praguicidas (HODGSON, 2004). A toxicidade

pode ser aguda ou crônica, e pode variar de um órgão para outro, bem como com a idade, genética, sexo, dieta, condição fisiológica ou estado de saúde do organismo (HODGSON, 2004)

Experimentos, testes de toxicidade e bioensaios são usados em toxicologia ambiental como uma forma de fornecer informações para a avaliação de riscos e do potencial tóxico de novos produtos. Enquanto as análises físico-químicas identificam e quantificam as concentrações das substâncias tóxicas, os testes de toxicidade avaliam o efeito dessas substâncias sobre sistemas biológicos (COSTA et al., 2008). Neste sentido, a integração de ensaios toxicológicos com as análises de diferentes poluentes no compartimento abiótico e biótico, permite distinguir as substâncias que afetam a biota daquelas inertes no ambiente, o que torna possível uma avaliação mais acurada do potencial danoso dos contaminantes.

1.3.1. Misturas complexas

A definição de uma mistura química é qualquer conjunto de várias substâncias químicas, independentemente da fonte, que possa ou não ser identificada e que possa contribuir para a toxicidade conjunta em uma população (ATSDR, 2001).

Ao se estudar uma mistura, deve-se levar em consideração alguns fatores como: a composição da mistura, o nível da dose, taxa da dose, a sequência de exposição e as vias de exposição (KÖNEMANN; PIETERS, 1996). O comportamento de produtos químicos em uma mistura pode não corresponder ao previsto a partir de dados sobre os compostos puros, e a interação dos componentes em uma mistura pode causar mudanças substanciais nas propriedades aparentes de seus constituintes, induzindo ao aumento (sinérgico) ou diminuição (antagonista) de efeitos em comparação com o comportamento ideal (aditivo) (ALTENBURGER; NENDZA; SCHÜRMANN, 2003).

Por isso, a avaliação do efeito deve levar em conta a ocorrência de diversos contaminantes com diferentes potenciais tóxicos (ALTENBURGER; WALTER; GROTE, 2004). Ao observar que quando despejados ao ambiente os contaminantes formam uma mistura, alguns pesquisadores propuseram

modelos teóricos para estudar os comportamentos dessas misturas e prever os seus efeitos (BLISS, 1939; LOEWE; MUISCHNEK, 1926).

1.3.1 Testes de toxicidade clássicos

A partir de 1975 foram desenvolvidos e adaptados vários métodos de ensaios de toxicidade para grupos e espécies de organismos que fossem representativos do ecossistema estudado. Cada organismo em um estudo de toxicidade deve ser bem avaliado considerando conhecimentos da biologia da espécie, tais como nível da cadeia trófica, reprodução, hábitos alimentares, morfologia, fisiologia e comportamento (OLIVEIRA; KLEINE; VAZ, 2019; ZAGATTO; BERTOLETTI, 2008). Dentre os organismos mais utilizados, destacam-se as microalgas, microcrustáceos e peixes (MAGALHÃES; FERRÃO-FILHO, 2008).

Estes testes são realizados principalmente *in vivo*, na forma de bioensaios. Neste caso, os organismos testes são expostos a um poluente ou um meio contaminado, permitindo que sejam avaliados os efeitos deletérios que determinado poluente ou meio pode causar aos organismos (TINCANI et al., 2017). Os testes de toxicidade podem medir os efeitos agudos, subagudos ou crônicos causados por determinada substância ou meio contaminado aos organismos (PASCHOALINO; MARCONE; JARDIM, 2010). Tais efeitos são avaliados com métodos específicos. As respostas desses ensaios podem ser avaliadas por meios diversos, que incluem a quantificação das taxas de sobrevivência, crescimento e fecundidade, alterações morfológicas, fisiológicas bioquímica, moleculares e comportamentais dos organismos testes.

A maioria dos ensaios de toxicidade estão bem estabelecidos, sendo alguns padronizados nacional e internacionalmente por associações ou organizações de normalização, como a Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT), *Association Française de Normalisation* (AFNOR), *Organisation for Economic Co-operation and Development* (OECD), *American Society for Testing and Materials* (ASTM), *American Water Works Association* (AWWA), *International Organization for Standardization* (ISO) e *United States Environmental Protection Agency* (USEPA).

Os estudos de toxicidade aguda visam avaliar a ocorrência de efeito adverso e severo nos organismos num curto período de tempo. Nestes ensaios é avaliada a mortalidade e imobilidade dos organismos teste, obtendo respostas imediatas destes em relação a um composto ou amostra ao qual foi exposto (SILVA; POMPÊO; PAIVA, 2015). Os resultados dos testes de toxicidade aguda em um determinado meio são expressos em concentração letal média (CL50) ou a concentração efetiva média (CE50), ou seja, concentração do agente tóxico que causa mortalidade ou imobilidade, respectivamente, a 50% dos organismos expostos depois de um determinado tempo de exposição (MAGALHÃES; FERRÃO-FILHO, 2008).

Segundo a norma da (ABNT, 2018) os testes de toxicidade crônica são aqueles que avaliam os efeitos deletérios causados pelas amostras sobre os organismos-teste, que pode abranger a totalidade do seu ciclo de vida ou parte dele, no período de exposição do ensaio. Os resultados dos testes crônicos são expressos em termos de concentração de efeito não observado (CENO), que é a maior concentração do composto testado que não causa efeito significativo, e concentração de efeito observado (CEO), que é a menor concentração do composto testado que causa efeito significativo. A CENO e a CEO são comparados a um controle negativo, tratamento no qual os organismos não são expostos ao contaminante (ABNT 16181, 2013).

1.4 Algas

As algas englobam diferentes grupos filogenéticos, com aproximadamente trinta mil espécies descritas (ARIEDE et al., 2017). São organismos que podem ser encontradas na maioria dos locais onde há água e a luz solar, incluindo solos, gelo, lagos, rios, fontes termais e a zona fótica dos oceanos (PARKER; MOCK; ARMBRUST, 2008).

As microalgas são organismos microscópicos unicelulares que possuem uma ampla gama de tamanhos (JANKOWSKA; SAHU; OLESKOWICZ-POPIEL, 2017). Esses organismos microscópicos, procariontes ou eucariontes, sintetizam moléculas orgânicas usando luz solar, água e dióxido de carbono através da fotossíntese (CHISTI, 2008; KRÖGER; MÜLLER-LANGER, 2012; MATHIMANI et al., 2019; SAHARAN et al., 2013). A escolha das microalgas

verdes como organismo-teste para esse estudo foi motivada devido a posição na cadeia trófica, facilidade de cultivo, disponibilidade das cepas e devido às recomendações das normas da ABNT e OECD como organismo-teste em ensaios de toxicidade crônica.

1.4.1. *Microalgas como organismos teste*

Nesse estudo foram utilizadas duas microalgas que pertencem ao filo Chlorophyta. As microalgas verdes são extremamente abundantes nos ambientes aquáticos. Dentre as classificações de microalgas, as microalgas verdes, conhecidas como Clorófitas, são um dos maiores grupos de microalgas em termos de número de espécies. Apesar de suas muitas características unificadoras, as microalgas verdes exibem uma variação notável na morfologia e ecologia, refletindo sua diversificação evolutiva (LELIAERT et al., 2012).

Desmodesmus subspicatus é uma microalga verde planctônica, representante dos produtores primários nos ecossistemas de água doce. A microalga *D. subspicatus*, pertence ao filo Chlorophyta, à classe Chlorophyceae, ordem Sphaeropleales e família Scenedesmoidea (GUIRY AND GUIRY 2020). O gênero de microalgas verdes de água doce *Desmodesmus* está entre os gêneros mais comuns de algas de água doce (LÜRLING, 2003). Sua ocorrência cosmopolita ilustra a ampla gama de condições ambientais que esses organismos podem tolerar (LÜRLING, 2003), o que as tornam bons indicadores de qualidade ambiental e portanto são bastante usadas em testes toxicológicos (EBERT et al., 2011; MALEV et al., 2012; SIERATOWICZ et al., 2011), além de também serem recomendadas pelas normas da ABNT e OECD.

A microalga verde marinha *Tetraselmis* sp. é um gênero de microalgas verdes unicelulares da família Chlorodendraceae, pertencente à classe Prasinophyceae, à ordem Chlorodendrales (LELIAERT et al., 2012; TOMASELLI, 2004). Esse gênero é encontrado na ampla maioria dos ecossistemas aquáticos marinhos (LU et al., 2017a). Essas microalgas têm sido utilizadas como alimento animal e humano, devido ao seu rico conteúdo de nutrientes.

Espécies do gênero *Tetraselmis* são conhecidas por sua alta mobilidade e abundância em vários ecossistemas marinhos, onde suas populações são

um importante componente do fitoplâncton. Por tolerar variações extremas de pH, salinidade e temperatura, a *Tetraselmis sp* é especialmente adequada para cultivos massivos externos (ÚBEDA-MÍNGUEZ et al., 2015). Além disso, esta espécie foi selecionada para este estudo principalmente porque é uma espécie comum em estuários e outras áreas costeiras, além de estar sendo muito usada como uma espécie representativa de espécies marinhas e produtores primários em estudos toxicológicos (DAVARPANA; GUILHERMINO, 2015, 2019; FERREIRA et al., 2007; PRATA et al., 2018).

1.4.2. Uso de microalgas em ensaios toxicológicos e métodos de contagem celular

As microalgas exibem características importantes para bioensaios, como crescimento acelerado, baixo custo de manutenção, ciclo de vida curto e sensibilidade à contaminantes (GOH et al., 2019; HUND-RINKE et al., 2018; LEAL et al., 2016; SUMAN; RADHIKA RAJASREE; KIRUBAGARAN, 2015). Esses aspectos possibilitam a observação de efeitos tóxicos em várias gerações (COSTA et al., 2008), o que as tornam bons organismos para testes toxicológicos (DEBELIUS et al., 2009; SUPARMANIAM et al., 2019). Para a realização de bioensaios com microalgas é preciso uma contagem celular acurada. Portanto, um método preciso para a quantificação da biomassa celular é essencial para que espécies e condições de crescimento ideais de algas sejam selecionados (LAURENS; WOLFRUM, 2011).

A biotecnologia das microalgas é um campo de crescente interesse, e, portanto o controle da cultura de microalgas é importante devido a possibilidade da aplicação comercial em distintas áreas como produção de biomassa, alimentos, rações, combustíveis, produção de produtos químicos de alto valor, compostos bioativos, fertilizantes, alimentos para aquicultura, antioxidantes e corantes (PULZ; GROSS, 2004). O desenvolvimento de sistemas simples e eficientes para monitorar o crescimento celular é de extrema importância para alcançar a viabilidade comercial, esses sistemas devem possuir características como facilidade, velocidade, estabilidade, seletividade, além de calibrações pouco frequentes (HAVLIK et al., 2013).

Essas características são importantes para que seja possível a tomada de decisões rápidas e eficientes sobre as condições do processo.

O monitoramento da biomassa de microalgas também é de interesse na determinação da produtividade primária nos ambientes naturais como os oceanos, para fazer avaliações quanto à proliferação de algas tóxicas, por exemplo, sendo também uma medição muito importante nos estudos de fisiologia, toxicologia e biotecnologia de algas (GRIFFITHS et al., 2011). Mesmo sabendo da importância de novas tecnologias que buscam aperfeiçoar o monitoramento e o controle do crescimento celular, buscando deixar mais robusto o uso desses organismos na ciência e para uma otimização em termos econômicos, a investigação detalhada dessas tecnologias acaba sendo subestimada (HAVLIK et al., 2013).

Dentro dos parâmetros usados para analisar o crescimento celular, a medição de biomassa é uma ferramenta básica (LI et al., 2014). Medições diretas tradicionais são realizadas por determinações de peso seco ou por contagem de células usando um microscópio de luz (RIBEIRO RODRIGUES et al., 2011). A densidade ótica (DO) é um método indireto amplamente utilizado para medição não invasiva da biomassa de microalgas, por ser diretamente correlacionado com o número de células do meio que é facilmente adaptável a sistemas de medição automatizados, representando uma ferramenta de monitoramento e controle do crescimento da biomassa de microalgas (RIBEIRO RODRIGUES et al., 2011). Para que a avaliação do crescimento de microalgas seja feita, o método de DO realiza uma leitura da absorbância da luz pelas células em um comprimento de onda específico que seja absorvido por um constituinte intracelular da microalga, de modo que quanto mais células estiverem presentes na amostra, maior será a absorção num determinado comprimento de onda (absorbância). Para isso, utiliza-se um espectrofotômetro para realizar as medições. Dentre os constituintes intracelulares da microalga que podem ser correlacionados com a sua viabilidade celular, temos os pigmentos clorofilianos que absorvem em comprimentos de onda bem definidos e conhecidos, sendo a clorofila-a, que absorve as luzes vermelha e violeta em aproximadamente 662 e 430 nm, respectivamente, e a clorofila-b que absorve fortemente as luzes laranja e azul em 642 e 453 nm, respectivamente (BHUVANA et al., 2019).

A quantidade de luz absorvida por uma suspensão de células pode estar diretamente relacionada à massa ou número de células, sendo que a correlação é uma função complexa do tamanho da partícula, forma e índice de refração (GRIFFITHS et al., 2011; RICE; BAIRD; EATON, 2017). Por ser um método simples, preciso, rápido, versátil e com uma relação custo-benefício atraente, têm ganhado popularidade nos últimos anos. (DANKOWSKA; DOMAGAŁA; KOWALEWSKI, 2017; PARMAR; SHARMA, 2016). Porém, apesar de amplamente conhecido, é um método pouco explorado quando se trata da avaliação da densidade celular de microalgas.

A necessidade de medições químicas de qualidade é demonstrada, por meio de sua comparabilidade, rastreabilidade e confiabilidade, sendo esses fatores cada vez mais reconhecidos e exigidos dentro da toxicologia (MIRAGLIA et al., 2004; OLIVARES; LOPES, 2012; TAVERNIERS; DE LOOSE; VAN BOCKSTAELE, 2004), para garantir que métodos analíticos gerem informações confiáveis e interpretáveis sobre as amostras após protocolos de validação (RIBANI et al., 2004).

1.5 Aspectos legais e institucionais

A preocupação humana com a poluição aquática acolheu uma perspectiva diferente a partir da década de 1970. Neste período, incidentes marítimos envolvendo grandes navegações, impactaram regiões costeiras da Europa e Estados Unidos (ASLAN; PINTO; DE OLIVEIRA, 2017). Um dos marcos da legislação ambiental marítima ocorreu em 1972, com a Convenção de Londres (*London Convention on the Prevention of Marine Pollution by Dumping of Waste and other Matters*) que tinha como objetivo propor medidas de proteção do ambiente marinho frente a poluição causada pelo despejo de resíduos e outros assuntos para o oceano (EDWARDS; BEŁDOWSKI, 2016).

A regulamentação ambiental e sua aplicação variam muito entre países e mesmo dentro de regiões do mesmo país (SHEN; WEI; YANG, 2017). A preocupação regulatória e pública sobre o risco da exposição a combinações de produtos químicos tem aumentado dada à variedade de combinações possíveis (ALTENBURGER; WALTER; GROTE, 2004).

A indústria química é um setor importante quando se refere ao atendimento à legislação ambiental, visto que as substâncias químicas liberadas no meio ambiente podem impactar tanto a saúde humana como os ecossistemas (BORGES MENEZES; DE SOUZA ANTUNES, 2005). Nas últimas décadas, regulamentações, convenções e ações de gerenciamento relacionadas ao uso de produtos químicos, aumentaram como uma resposta ao crescimento do consumo de produtos químicos e à preocupação com a saúde ambiental e humana (HUNG et al., 2013; LAU et al., 2012; WILSON; SCHWARZMAN, 2009).

A preocupação com a preservação e conservação do meio ambiente é relativamente recente no Brasil. A primeira Legislação Brasileira que abordou a questão da poluição marinha foi a Lei nº 5.357, de 17 de novembro de 1967, a qual estabelecia penalidades para embarcações e terminais marítimos ou fluviais que lançassem detritos ou óleos em águas brasileiras. Esta Lei foi revogada pela Lei nº 9.966 de 28 de abril de 2000 que *“dispõe sobre a prevenção, o controle e a fiscalização da poluição causada por lançamento de óleo e outras substâncias nocivas ou perigosas em águas sobre jurisdição nacional”* (ASLAN; PINTO; DE OLIVEIRA, 2017). Em 31 de agosto de 1981, a Política Nacional do Meio Ambiente estabeleceu a Lei nº 6.938, com o objetivo de preservação, melhoria e recuperação da qualidade ambiental, certificando condições de desenvolvimento socioeconômico. Ainda em 1981, foram criados o Sistema Nacional do Meio Ambiente (SISNAMA) e o Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA).

O SISNAMA representa o conjunto articulado de órgãos, entidades, com regras e práticas da União, dos Estados, do Distrito Federal, dos Territórios, dos Municípios e das fundações instituídas pelo Poder Público, sendo estes responsáveis pela proteção e melhoria da qualidade ambiental, sob a direção do CONAMA. O CONAMA é um colegiado responsável por oferecer consultoria de natureza consultiva e deliberativa, permitindo que o governo avalie e adote ações que visam a preservação do meio ambiente.

O CONAMA, por meio de suas resoluções determina normas a serem seguidas na elaboração, observação e monitoramento de atividades modificadoras do meio ambiente. Algumas destas resoluções referem-se à

importância da preservação ambiental em portos, aterros sanitários entre outros.

Quanto a qualidade ambiental dos corpos hídricos, destaca-se a Resolução CONAMA 357/2005 que foi alterada pela Resolução 410/2009 e pela 430/2011 que abordam a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências.

No que tange aos sedimentos, destaca-se a Resolução CONAMA 454/2012 que estabelece as diretrizes gerais e os procedimentos referenciais para o gerenciamento do material a ser dragado em águas sob jurisdição nacional, e que aborda toda a questão da caracterização ambiental necessária e dos níveis de maiores ou menores efeitos a biota, trazendo a ecotoxicologia como necessária na avaliação de sedimentos a serem despejados em águas jurisdicionais brasileiras.

No Brasil também existe a Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT) que é uma organização sem fins lucrativos envolvida na preparação de normas nacionais no Brasil. A ABNT é o parceiro nacional da Organização Internacional de Normalização (ISO), isso quer dizer que métodos padronizados pela ISO podem ser transferidos para o Brasil pela ABNT de forma facilitada (NIVA et al., 2016). Os protocolos estabelecidos por essas duas organizações são largamente usados e consultados para a execução de testes toxicológicos.

Entretanto, a grande maioria das resoluções nacionais e internacionais de guia de qualidade do sedimento, estabelecem concentrações limites para os compostos individuais, sem levar em consideração que em um sistema natural, os compostos estão todos misturados e interagindo entre si e com o meio, em um único compartimento. Nessa abordagem, é necessário considerar que ocorrerão interações entre esses compostos, que podem ser sinérgicas, antagônicas ou aditivas e o efeito tóxico causado ao ecossistema aquático é dependente desse processo (HOLMSTRUP et al., 2010). Esses efeitos vão além da identificação simplista da poluição pela quantificação química do poluente em uma amostra de água ou sedimento.

2. HIPÓTESES

H1. Considerando que as microalgas verdes *Tetraselmis* sp e *D. subispicatus* possuem pigmentos clorofilianos que absorvem nos comprimentos de onda de 425nm e 680nm, então é esperado uma correlação linear entre suas densidades celulares e essas absorbâncias.

H2. Se a matriz sedimentar do Complexo Estuarino de Paranaguá (CEP) possui compostos tóxicos, então é esperado um crescimento diferenciado da microalga *Tetraselmis* sp. quando exposta ao elutriado.

H3. Amostras de sedimento de regiões de maior influência antrópica possuirão maior acúmulo de contaminantes e, conseqüentemente, apresentarão maior toxicidade à microalga *Tetraselmis* sp. exposta.

3. OBJETIVOS

3.1. *Objetivo geral*

O objetivo geral deste trabalho é investigar a toxicidade de amostras de sedimento do CEP, utilizando a microalga verde *Tetraselmis* sp. aplicando um modelo de regressão linear que avalia a relação de densidade celular e absorbância.

3.2. *Objetivos específicos*

- Validar um modelo de regressão linear para estimar a densidade celular das microalgas *Tetraselmis* sp e *D. subispicatus*, em amostras cultivadas em laboratório;
- Investigar a toxicidade crônica de amostras de sedimento do CEP sobre a microalga verde marinha *Tetraselmis* sp.
- Relacionar os níveis de toxicidade das amostras de sedimento com as respectivas concentrações de estressores químicos investigados.

4. REFERÊNCIAS

ABNT. **ABNT NBR 12648:2018 - Aquatic ecotoxicology - Chronic toxicity - Test with algae (Chlorophyceae).** [s.l.: s.n.]. Disponível em: <<https://www.abntcatalogo.com.br/norma.aspx?ID=391089>>.

ABNT 16181. **ABNT NBR 16181:2013 - Aquatic ecotoxicology — Chronic toxicity — Test with marine microalgae.** [s.l.: s.n.]. Disponível em: <Subst?ncia qu?mica>.

ADAMS, J. B. Examen des méthodes et des cadres utilisés pour déterminer les besoins environnementaux en eau des estuaires. **Hydrological Sciences Journal**, v. 59, n. 3–4, p. 451–465, 2014.

ALI, H.; KHAN, E.; SAJAD, M. A. Phytoremediation of heavy metals-Concepts and applications. **Chemosphere**, v. 91, n. 7, p. 869–881, 2013.

ALMEIDA, A. C. O. DE et al. Evaluation of toxicity of zinc oxide nanorods on green microalgae of freshwater and marine ecosystems. **Environmental Chemistry and Ecotoxicology**, v. 3, p. 85–90, 2021.

ALTENBURGER, R.; NENDZA, M.; SCHÜÜRMAN, G. Mixture toxicity and its modeling by quantitative structure-activity relationships. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 22, n. 8, p. 1900–1915, 2003.

ALTENBURGER, R.; WALTER, H.; GROTE, M. What contributes to the combined effect of a complex mixture? **Environmental Science and Technology**, v. 38, n. 23, p. 6353–6362, 2004.

AMIN, O. A.; COMOGLIO, L. I.; SERICANO, J. L. Polynuclear aromatic and chlorinated hydrocarbons in mussels from the coastal zone of Ushuaia, Tierra del Fuego, Argentina. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 30, n. 3, p. 521–529, 2011.

AREY, J.; ATKINSON, R. Photochemical Reactions of PAHs in the Atmosphere. **PAHs: An Ecotoxicological Perspective**, p. 47–63, 2003.

ARIEDE, M. B. et al. Cosmetic attributes of algae - A review. **Algal Research**, v. 25, n. July, p. 483–487, 2017.

ARORA, M. et al. Heavy metal accumulation in vegetables irrigated with water from different sources. **Food Chemistry**, v. 111, n. 4, p. 811–815, 2008.

ASHRAF, M. A. Persistent organic pollutants (POPs): a global issue, a global challenge. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 24, n. 5, p. 4223–4227, 2017.

ASLAN, J. F.; PINTO, A. E. M.; DE OLIVEIRA, M. M. Poluição Do Meio Ambiente Marinho: Um Breve Panorama Dos Princípios, Instrumentos Jurídicos E Legislação Brasileira. **Planeta Amazônia: Revista Internacional de Direito Ambiental e Políticas Públicas**, n. 9, p. 175–186, 2017.

ATSDR. Guidance for the Preparation of an Interaction Profile. **U.S.**

Department of Health and Human Services, n. February, 2001.

AUTHMAN, M. M. Use of Fish as Bio-indicator of the Effects of Heavy Metals Pollution. **Journal of Aquaculture Research & Development**, v. 06, n. 04, 2015.

BACCHETTA, C. et al. Combined toxicological effects of pesticides: A fish multi-biomarker approach. **Ecological Indicators**, v. 36, p. 532–538, 2014.

BAUMARD, P. et al. Concentrations of PAHs (polycyclic aromatic hydrocarbons) in various marine organisms in relation to those in sediments and to trophic level. **Marine Pollution Bulletin**, v. 36, n. 12, p. 951–960, 1998.

BERBEL, G. B. B.; FAVARO, D. I. T.; BRAGA, E. S. Impact of harbour, industry and sewage on the phosphorus geochemistry of a subtropical estuary in Brazil. **Marine Pollution Bulletin**, v. 93, n. 1–2, p. 44–52, 2015.

BEYER, A. et al. Assessing long-range transport potential of persistent organic pollutants. **Environmental Science and Technology**, v. 34, n. 4, p. 699–703, 2000.

BHUVANA, P. et al. Spectral characterization of bioactive compounds from microalgae: *N. Oculata* and *C. Vulgaris*. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 19, n. April, p. 101094, 2019.

BLISS, C. I. the Toxicity of Poisons Applied Jointly. **Annals of Applied Biology**, v. 26, n. 3, p. 585–615, 1939.

BOOIJ, P. et al. Toxic pressure of herbicides on microalgae in Dutch estuarine and coastal waters. **Journal of Sea Research**, v. 102, p. 48–56, 2015.

BORGES MENEZES, R. P.; DE SOUZA ANTUNES, A. M. Using the WTO/TBT enquiry point to monitor tendencies in the regulation of environment, health, and safety issues affecting the chemical industry. **Environment International**, v. 31, n. 3, p. 407–416, 2005.

BOSTRÖM, C. E. et al. Cancer risk assessment, indicators, and guidelines for polycyclic aromatic hydrocarbons in the ambient air. **Environmental Health Perspectives**, v. 110, n. SUPPL. 3, p. 451–488, 2002.

BOTTÉ, S. E.; FREIJE, R. H.; MARCOVECCHIO, J. E. Distribution of several heavy metals in tidal flats sediments within bahía blanca estuary (Argentina). **Water, Air, and Soil Pollution**, v. 210, n. 1–4, p. 371–388, 2010.

BREIVIK, K. et al. Atmospheric emissions of some POPs in Europe: a discussion of existing inventories and data needs. **Environmental Science and Policy**, v. 9, n. 7–8, p. 663–674, 2006.

CAMPANELLA, L. et al. Trace metals in seagrass, algae and molluscs from an uncontaminated area in the Mediterranean. **Environmental Pollution**, v. 111, n. 1, p. 117–126, 2001.

CARSON, R. **Silent Spring**. [s.l: s.n.]. v. 43

CHISTI, Y. Biodiesel from microalgae beats bioethanol. **Trends in Biotechnology**, v. 26, n. 3, p. 126–131, 2008.

CHOUVELON, T. et al. Chemical contaminants (trace metals, persistent organic pollutants) in albacore tuna from western Indian and south-eastern Atlantic Oceans: Trophic influence and potential as tracers of populations. **Science of the Total Environment**, v. 596–597, p. 481–495, 2017.

CHU, W. L. et al. Heavy metal pollution in Antarctica and its potential impacts on algae. **Polar Science**, v. 20, p. 75–83, 2019.

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

DA SILVA, A. M. F. et al. Organochlorines and polychlorinated biphenyl environmental pollution in south coast of Rio De Janeiro state. **Marine Pollution Bulletin**, v. 108, n. 1–2, p. 325–331, 2016.

DANKOWSKA, A.; DOMAGAŁA, A.; KOWALEWSKI, W. Quantification of *Coffea arabica* and *Coffea canephora* var. *robusta* concentration in blends by means of synchronous fluorescence and UV-Vis spectroscopies. **Talanta**, v. 172, n. January, p. 215–220, 2017.

DAVARPANA, E.; GUILHERMINO, L. Single and combined effects of microplastics and copper on the population growth of the marine microalgae *Tetraselmis chuii*. **Estuarine, Coastal and Shelf Science**, v. 167, p. 269–275, 2015.

DAVARPANA, E.; GUILHERMINO, L. Are gold nanoparticles and microplastics mixtures more toxic to the marine microalgae *Tetraselmis chuii* than the substances individually? **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 181, n. January, p. 60–68, 2019.

DE ALMEIDA, M. et al. Distribution and sources of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in surface sediments of a Tropical Bay influenced by anthropogenic activities (Todos os Santos Bay, BA, Brazil). **Marine Pollution Bulletin**, v. 137, n. March, p. 399–407, 2018.

DEBELIUS, B. et al. Toxicity and bioaccumulation of copper and lead in five marine microalgae. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 72, n. 5, p. 1503–1513, 2009.

DI TORO, D. M.; MCGRATH, J. A.; HANSEN, D. J. Technical basis for narcotic chemicals and polycyclic aromatic hydrocarbon criteria. I. Water and tissue. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 19, n. 8, p. 1951–1970, 2000.

DOMINGOS, R. F. et al. Metals in the Aquatic Environment—Interactions and Implications for the Speciation and Bioavailability: A Critical Overview. **Aquatic Geochemistry**, v. 21, n. 2–4, p. 231–257, 2015.

DOONG, R. AN et al. Characterization and composition of heavy metals and persistent organic pollutants in water and estuarine sediments from Gao-ping River, Taiwan. **Marine Pollution Bulletin**, v. 57, n. 6–12, p. 846–857, 2008.

DURANTE, C. A. et al. POPs in the South Latin America: Bioaccumulation of DDT, PCB, HCB, HCH and Mirex in blubber of common dolphin (*Delphinus delphis*) and Fraser's dolphin (*Lagenodelphis hosei*) from Argentina. **Science of the Total Environment**, v. 572, p. 352–360, 2016.

DURUIBE, J. O.; OGWUEGBU, M. O. C.; EGWURUGWU, J. N. Heavy metal pollution and human biotoxic effects. **International Journal of Physical Sciences**, v. 2, n. 5, p. 112–118, 2007.

EBERT, I. et al. Toxicity of the fluoroquinolone antibiotics enrofloxacin and ciprofloxacin to photoautotrophic aquatic organisms. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 30, n. 12, p. 2786–2792, 2011.

EDWARDS, M.; BEŁDOWSKI, J. Chemical munitions dumped at sea. **Deep-Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography**, v. 128, p. 1–3, 2016.

EQANI, S. A. M. A. S. et al. Uptake of organochlorine pesticides (OCPs) and polychlorinated biphenyls (PCBs) by river water fish: The case of River Chenab. **Science of the Total Environment**, v. 450–451, p. 83–91, 2013.

EQANI, S. A. M. A. S.; MALIK, R. N.; MOHAMMAD, A. The level and distribution of selected organochlorine pesticides in sediments from River Chenab, Pakistan. **Environmental Geochemistry and Health**, v. 33, n. 1, p. 33–47, 2011.

EROGLU, A. et al. Effects of heavy metals (Cd, Cu, Cr, Pb, Zn) on fish glutathione metabolism. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 22, n. 5, p. 3229–3237, 2015.

FERNANDES, L. et al. Accumulation of sediment, organic matter and trace metals with space and time, in a creek along Mumbai coast, India. **Estuarine, Coastal and Shelf Science**, v. 91, n. 3, p. 388–399, 2011.

FERREIRA, C. S. G. et al. Acute toxicity of oxytetracycline and florfenicol to the microalgae *Tetraselmis chuii* and to the crustacean *Artemia parthenogenetica*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 67, n. 3, p. 452–458, 2007.

FIELD, C. B. et al. Primary production of the biosphere: Integrating terrestrial and oceanic components. **Science**, v. 281, n. 5374, p. 237–240, 1998.

GIMÉNEZ, L. et al. Macrofaunal patterns and animal-sediment relationships in Uruguayan estuaries and coastal lagoons (Atlantic coast of South America). **Journal of Sea Research**, v. 87, p. 46–55, 2014.

GOH, B. H. H. et al. Sustainability of direct biodiesel synthesis from microalgae biomass: A critical review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 107, n. February, p. 59–74, 2019.

GRIFFITHS, M. J. et al. Interference by pigment in the estimation of microalgal biomass concentration by optical density. **Journal of Microbiological Methods**, v. 85, n. 2, p. 119–123, 2011.

HARMENS, H. et al. Terrestrial mosses as biomonitors of atmospheric POPs

pollution: A review. **Environmental Pollution**, v. 173, p. 245–254, 2013.

HASHIM, M. A. et al. Remediation technologies for heavy metal contaminated groundwater. **Journal of Environmental Management**, v. 92, n. 10, p. 2355–2388, 2011.

HASSINK, J. A Model of the Physical Protection of Organic Matter in Soils The capacity of soils to preserve organic C and N by their association with clay and silt particles. **Plant and Soil**, v. 191, p. 77–87, 1997.

HAVLIK, I. et al. On-line monitoring of large cultivations of microalgae and cyanobacteria. **Trends in Biotechnology**, v. 31, n. 7, p. 406–414, 2013.

HODGSON, E. **A Textbook of Modern Toxicology**. Third edit ed. [s.l.] John Wiley & Sons, 2004.

HOLMSTRUP, M. et al. Interactions between effects of environmental chemicals and natural stressors: A review. **Science of the Total Environment**, v. 408, n. 18, p. 3746–3762, 2010.

HUANG, L.; FANG, H. W.; CHEN, M. H. Experiment on surface charge distribution of fine sediment. **Science China Technological Sciences**, v. 55, n. 4, p. 1146–1152, 2012.

HUND-RINKE, K. et al. Grouping concept for metal and metal oxide nanomaterials with regard to their ecotoxicological effects on algae, daphnids and fish embryos. **NanoImpact**, v. 9, n. October 2017, p. 52–60, 2018.

HUNG, H. et al. Toward the next generation of air quality monitoring: Persistent organic pollutants. **Atmospheric Environment**, v. 80, p. 591–598, 2013.

IVORRA, L. et al. Environmental characterization of 4,4'-dichlorobenzophenone in surface waters from Macao and Hong Kong coastal areas (Pearl River Delta) and its toxicity on two biological models: *Artemia salina* and *Daphnia magna*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 171, n. December 2018, p. 1–11, 2019.

JANKOWSKA, E.; SAHU, A. K.; OLESKOWICZ-POPIEL, P. Biogas from microalgae: Review on microalgae's cultivation, harvesting and pretreatment for anaerobic digestion. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 75, n. October 2015, p. 692–709, 2017.

JONES, K. .; VOOGT, P. DE. Persistent organic pollutants (POPs) : state of the science. **Environmental Pollution**, v. 100, p. 209–221, 1999.

KARA, Y. Bioaccumulation of Cu, Zn and Ni from the wastewater by treated *Nasturtium officinale*. **International Journal of Environmental Science and Technology**, v. 2, n. 1, p. 63–67, 2005.

KASILINGAM, K. et al. Trace element concentration in surface sediments of Palk Strait, southeast coast of Tamil Nadu, India. **Marine Pollution Bulletin**, v. 111, n. 1–2, p. 500–508, 2016.

KATSANEVAKIS, S. et al. Ecosystem-based marine spatial management:

Review of concepts, policies, tools, and critical issues. **Ocean and Coastal Management**, v. 54, n. 11, p. 807–820, 2011.

KHAN, S. et al. Health risks of heavy metals in contaminated soils and food crops irrigated with wastewater in Beijing, China. **Environmental Pollution**, v. 152, n. 3, p. 686–692, 2008.

KÖNEMANN, W. H.; PIETERS, M. N. Confusion of concepts in mixture toxicology. **Food and Chemical Toxicology**, v. 34, n. 11–12, p. 1025–1031, 1996.

KRÖGER, M.; MÜLLER-LANGER, F. Review on possible algal-biofuel production processes. **Biofuels**, v. 3, n. 3, p. 333–349, 2012.

LAU, M. H. Y. et al. Environmental policy, legislation and management of persistent organic pollutants (POPs) in China. **Environmental Pollution**, v. 165, p. 182–192, 2012.

LAURENS, L. M. L.; WOLFRUM, E. J. Feasibility of spectroscopic characterization of algal lipids: Chemometric correlation of NIR and FTIR Spectra with exogenous lipids in algal biomass. **Bioenergy Research**, v. 4, n. 1, p. 22–35, 2011.

LEAL, P. P. et al. Copper ecotoxicology of marine algae: a methodological appraisal. **Chemistry and Ecology**, v. 32, n. 8, p. 786–800, 2016.

LEE, J. W. et al. Significance of adverse outcome pathways in biomarker-based environmental risk assessment in aquatic organisms. **Journal of Environmental Sciences (China)**, v. 35, p. 115–127, 2015.

LELIAERT, F. et al. Phylogeny and Molecular Evolution of the Green Algae. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 31, n. 1, p. 1–46, 2012.

LESSA, G. C. et al. Brazilian Estuaries. In: [s.l.: s.n.].

LI, Y. et al. A comparative study: The impact of different lipid extraction methods on current microalgal lipid research. **Microbial Cell Factories**, v. 13, n. 1, 2014.

LIEBEZEIT, G. et al. DDT in biota of Paranaguá Bay, Southern Brazil: Recent input and rapid degradation. **Water, Air, and Soil Pollution**, v. 220, n. 1–4, p. 181–188, 2011.

LOEWE, S.; MUISCHNEK, H. uber Kombinationswirkungen. In: [s.l.: s.n.].

LU, L. et al. Biomass and nutrient productivities of *Tetraselmis chuii* under mixotrophic culture conditions with various C:N ratios. **Chinese Journal of Oceanology and Limnology**, v. 35, n. 2, p. 303–312, 2017.

LÜRLING, M. Phenotypic plasticity in the green algae *Desmodesmus* and *Scenedesmus* with special reference to the induction of defensive morphology. **Annales de Limnologie**, v. 39, n. 2, p. 85–101, 2003.

MACLEOD, M. et al. Applications of contaminant fate and bioaccumulation models in assessing ecological risks of chemicals: A case study for gasoline

hydrocarbons. **Environmental Science and Technology**, v. 38, n. 23, p. 6225–6233, 2004.

MAGALHÃES, D. DE P.; FERRÃO-FILHO, A. DA S. a Ecotoxicologia Como Ferramenta No Biomonitoramento De Ecossistemas Aquáticos. **Oecologia Australis**, v. 12, n. 03, p. 355–381, 2008.

MALEV, O. et al. Comparative toxicity of imidacloprid and its transformation product 6-chloronicotinic acid to non-target aquatic organisms: Microalgae *Desmodesmus subspicatus* and amphipod *Gammarus fossarum*. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 104, n. 3, p. 178–186, 2012.

MANOLI, E.; SAMARA, C. Polycyclic aromatic hydrocarbons in natural waters: Sources, occurrence and analysis. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 18, n. 6, p. 417–428, 1999.

MATHIMANI, T. et al. Review on cultivation and thermochemical conversion of microalgae to fuels and chemicals: Process evaluation and knowledge gaps. **Journal of Cleaner Production**, v. 208, p. 1053–1064, 2019.

MEGHARAJ, M.; BOUL, H. L.; THIELE, J. H. Effects of DDT and its metabolites on soil algae and enzymatic activity. **Biology and Fertility of Soils**, v. 29, n. 2, p. 130–134, 1999.

MELEGARI, S. P. et al. Evaluation of toxicity and oxidative stress induced by copper oxide nanoparticles in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. **Aquatic Toxicology**, v. 142–143, p. 431–440, 2013.

MEMON, A. R.; SCHRÖDER, P. Implications of metal accumulation mechanisms to phytoremediation. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 16, n. 2, p. 162–175, 2009.

MENG, J. et al. Traditional and new POPs in environments along the Bohai and Yellow Seas: An overview of China and South Korea. **Chemosphere**, v. 169, p. 503–515, 2017.

MERHABY, D. et al. Organic pollution in surficial sediments of Tripoli harbour, Lebanon. **Marine Pollution Bulletin**, v. 93, n. 1–2, p. 284–293, 2015.

MIRAGLIA, M. et al. Detection and traceability of genetically modified organisms in the food production chain. **Food and Chemical Toxicology**, v. 42, n. 7, p. 1157–1180, 2004.

MWANAMOKI, P. M. et al. Trace metals and persistent organic pollutants in sediments from river-reservoir systems in Democratic Republic of Congo (DRC): Spatial distribution and potential ecotoxicological effects. **Chemosphere**, v. 111, p. 485–492, 2014.

NAMIEŚNIK, J.; RABAJCZYK, A. The speciation and physico-chemical forms of metals in surface waters and sediments. **Chemical Speciation and Bioavailability**, v. 22, n. 1, p. 1–24, 2010.

NAYAR, S. et al. Environmental effects of dredging on sediment nutrients, carbon and granulometry in a tropical estuary. **Environmental Monitoring and**

Assessment, v. 127, n. 1–3, p. 1–13, 2007.

NICHOLS, W. J.; SEMINOFF, J. A.; ETNOYER, P. **Handbook of Marine Fisheries Conservation and Management**. [s.l.] Oxford University Press, 2010.

NICOLAS, D. et al. Fish under influence: A macroecological analysis of relations between fish species richness and environmental gradients among European tidal estuaries. **Estuarine, Coastal and Shelf Science**, v. 86, n. 1, p. 137–147, 2010.

NIVA, C. C. et al. Soil ecotoxicology in Brazil is taking its course. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 23, n. 11, p. 11363–11378, 2016.

OLIVARES, I. R. B.; LOPES, F. A. Essential steps to providing reliable results using the Analytical Quality Assurance Cycle. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 35, n. October 1993, p. 109–121, 2012.

OLIVEIRA, T. M. N. DE; KLEINE, T.; VAZ, C. **Toxicologia aquática com microcrustáceos**. 1 ed ed. Curitiba, PR: [s.n.].

OMAR, T. F. T. et al. Occurrence, distribution, and sources of emerging organic contaminants in tropical coastal sediments of anthropogenically impacted Klang River estuary, Malaysia. **Marine Pollution Bulletin**, v. 131, n. August 2017, p. 284–293, 2018.

PARKER, M. S.; MOCK, T.; ARMBRUST, E. V. Genomic Insights into Marine Microalgae. **Annual Review of Genetics**, v. 42, n. 1, p. 619–645, 2008.

PARMAR, A.; SHARMA, S. Derivative UV-vis absorption spectra as an invigorated spectrophotometric method for spectral resolution and quantitative analysis: Theoretical aspects and analytical applications: A review. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 77, p. 44–53, 2016.

PASCHOALINO, M. P.; MARCONE, G. P. S.; JARDIM, W. F. Os Nanomateriais e a Questão Ambiental. **Química Nova**, v. 33, n. 2, p. 421–430, 2010.

PRATA, J. C. et al. Influence of microplastics on the toxicity of the pharmaceuticals procainamide and doxycycline on the marine microalgae *Tetraselmis chuii*. **Aquatic Toxicology**, v. 197, n. February, p. 143–152, 2018.

PRAVDIĆ, V. Surface Charge Characterization of Sea Sediments. **Limnology and Oceanography**, v. 15, n. 2, p. 230–233, 1970.

PRIMAVERA, J. H. Overcoming the impacts of aquaculture on the coastal zone. **Ocean and Coastal Management**, v. 49, n. 9–10, p. 531–545, 2006.

PULZ, O.; GROSS, W. Valuable products from biotechnology of microalgae. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 65, n. 6, p. 635–648, 2004.

QADIR, A.; MALIK, R. N.; HUSAIN, S. Z. Spatio-temporal variations in water quality of Nullah Aik-tributary of the river Chenab, Pakistan. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 140, n. 1–3, p. 43–59, 2008.

REGNIER, P. et al. Modelling Estuarine Biogeochemical Dynamics: From the Local to the Global Scale. **Aquatic Geochemistry**, v. 19, n. 5–6, p. 591–626, 2013.

RIBANI, M. et al. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Quim. Nova**, v. 27, n. 5, p. 771–780, 2004.

RIBEIRO RODRIGUES, L. H. et al. Algal density assessed by spectrophotometry: A calibration curve for the unicellular algae *Pseudokirchneriella subcapitata*. **Journal of Environmental Chemistry and Ecotoxicology**, v. 3(8), n. August, p. 225–228, 2011.

RICART, M. et al. Effects of low concentrations of the phenylurea herbicide diuron on biofilm algae and bacteria. **Chemosphere**, v. 76, n. 10, p. 1392–1401, 2009.

RICE, E. W.; BAIRD, R. B.; EATON, A. D. **Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater**, 23rd Edition. Third ed. [s.l.] American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environment Federation, 2017. v. 53

ROBINS, P. E. et al. Impact of climate change on UK estuaries: A review of past trends and potential projections. **Estuarine, Coastal and Shelf Science**, v. 169, p. 119–135, 2016.

ROCHE, H. et al. Organochlorines in the Vaccarès Lagoon trophic web (Biosphere Reserve of Camargue, France). **Environmental Pollution**, v. 157, n. 8–9, p. 2493–2506, 2009.

SAHARAN, B. S. et al. Towards Algal Biofuel Production : A Concept of Green Bio Energy Development. **Innovative Romanian Food Biotechnology**, v. 12, n. 3, p. 1–21, 2013.

SAKAI, H.; KOJIMA, Y.; SAITO, K. Distribution of heavy metals in water and sieved sediments in the Toyohira river. **Water Research**, v. 20, n. 5, p. 559–567, 1986.

SFAKIANAKIS, D. G. et al. Effect of heavy metals on fish larvae deformities: A review. **Environmental Research**, v. 137, p. 246–255, 2015.

SHEN, J.; WEI, Y. D.; YANG, Z. The impact of environmental regulations on the location of pollution-intensive industries in China. **Journal of Cleaner Production**, v. 148, p. 785–794, 2017.

SHOAIB, N. et al. Toxicity of pesticides on photosynthesis of diatoms. **Pakistan Journal of Botany**, v. 43, n. 4, p. 2067–2069, 2011.

SIERATOWICZ, A. et al. Acute and chronic toxicity of four frequently used UV filter substances for *Desmodesmus subspicatus* and *Daphnia magna*. **Journal of Environmental Science and Health - Part A Toxic/Hazardous Substances and Environmental Engineering**, v. 46, n. 12, p. 1311–1319, 2011.

SILVA, D. C. V. R. DA; POMPEO, M.; PAIVA, T. C. B. DE. A ecotoxicologia no

Contexto atual no Brasil. In: **Ecologia de reservatórios e interfaces**. [s.l: s.n.]. p. 340–353.

STRANDESEN, M. et al. Fate and distribution modelling of metals in life cycle impact assessment. **Ecological Modelling**, v. 203, n. 3–4, p. 327–338, 2007.

SUBIDA, M. D. et al. Multivariate methods and artificial neural networks in the assessment of the response of infaunal assemblages to sediment metal contamination and organic enrichment. **Science of the Total Environment**, v. 450–451, p. 289–300, 2013.

SUMAN, T. Y.; RADHIKA RAJASREE, S. R.; KIRUBAGARAN, R. Evaluation of zinc oxide nanoparticles toxicity on marine algae *chlorella vulgaris* through flow cytometric, cytotoxicity and oxidative stress analysis. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 113, p. 23–30, 2015.

SUPARMANIAM, U. et al. Insights into the microalgae cultivation technology and harvesting process for biofuel production: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 115, n. August, p. 109361, 2019.

TAVERNIERS, I.; DE LOOSE, M.; VAN BOCKSTAELE, E. Trends in quality in the analytical laboratory. I. Traceability and measurement uncertainty of analytical results. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 23, n. 7, p. 480–490, 2004.

TIEYU, W. et al. Contamination of persistent organic pollutants (POPs) and relevant management in China. **Environment International**, v. 31, n. 6, p. 813–821, 2005.

TINCANI, F. H. et al. Pseudoreplication and the usage of biomarkers in ecotoxicological bioassays. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 36, n. 10, p. 2868–2874, 2017.

TOMASELLI, L. **Handbook of Microalgal Culre**. Oxford, UK: Blackwell, 2004.

TOMBESI, N. et al. Records of organochlorine pesticides in soils and sediments on the southwest of Buenos Aires Province, Argentina. **Environmental Earth Sciences**, v. 77, n. 11, p. 1–11, 2018.

TSAI, W. T. Current status and regulatory aspects of pesticides considered to be persistent organic pollutants (POPs) in Taiwan. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 7, n. 10, p. 3615–3627, 2010.

TURNER, A.; TAYLOR, A. On site determination of trace metals in estuarine sediments by field-portable-XRF. **Talanta**, v. 190, n. August, p. 498–506, 2018.

ÚBEDA-MÍNGUEZ, P. et al. Tools for microalgal biotechnology: development of an optimized transformation method for an industrially promising microalga—*Tetraselmis chuii*. **Journal of Applied Phycology**, v. 27, n. 1, p. 223–232, 2015.

VALENCIA-AVELLAN, M. et al. Evaluating water quality and ecotoxicology assessment techniques using data from a lead and zinc effected upland limestone catchment. **Water Research**, v. 128, p. 49–60, 2017.

VIOLANTE, A. et al. Mobility and bioavailability of heavy metals and metalloids in soil environments. **Journal of Soil Science and Plant Nutrition**, v. 10, n. 3, p. 268–292, 2010.

WANIA, F.; MACKAY, D. Tracking the distribution of persistent organic pollutants. **Environmental Science and Technology**, v. 30, n. 9, 1996.

WARREN, L. A.; HAACK, E. A. Biogeochemical controls on metal behaviour in freshwater environments. **Earth-Science Reviews**, v. 54, n. 4, p. 261–320, 2001.

WENNING, R. J.; MARTELLO, L. POPs in Marine and Freshwater Environments. In: **Environmental Forensics for Persistent Organic Pollutants**. [s.l.] Elsevier B.V., 2014. p. 357–390.

WIBERG, P. L.; HARRIS, C. K. Desorption of p,p'-DDE from sediment during resuspension events on the Palos Verdes shelf, California: A modeling approach. **Continental Shelf Research**, v. 22, n. 6–7, p. 1005–1023, 2002.

WILSON, M. P.; SCHWARZMAN, M. R. Toward a new U.S. chemicals policy: Rebuilding the foundation to advance new science, green chemistry, and environmental health. **Environmental Health Perspectives**, v. 117, n. 8, p. 1202–1209, 2009.

WU, X. et al. A review of toxicity and mechanisms of individual and mixtures of heavy metals in the environment. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 23, n. 9, p. 8244–8259, 2016.

XU, W.; WANG, X.; CAI, Z. Analytical chemistry of the persistent organic pollutants identified in the Stockholm Convention: A review. **Analytica Chimica Acta**, v. 790, p. 1–13, 2013.

YE, J. et al. Enantioselective environmental toxicology of chiral pesticides. **Chemical Research in Toxicology**, v. 28, n. 3, p. 325–338, 2015.

ZAGATTO, P. A.; BERTOLETTI, E. **Ecotoxicologia Aquática - Princípios e Aplicações**. 2 Ed ed. São Crlos, SP: [s.n.].

ZHAO, X. et al. Grain size effect on PBDE and PCB concentrations in sediments from the intertidal zone of Bohai Bay, China. **Chemosphere**, v. 81, n. 8, p. 1022–1026, 2010.

5. CAPÍTULO 1

Os resultados do presente capítulo incluem a calibração do método de quantificação da densidade celular de microalgas em função da absorbância da suspensão algal. Ele foi estruturado em formato de artigo científico, já submetido ao periódico *Limnology and Oceanography: Methods* (Electronic ISSN: 1541-5856), fator de impacto: 2.634 (2020), classificação Qualis: B1. Atualmente sob revisão.

TÍTULO: Cell density of green microalgae estimated by spectrophotometry: a useful tool for the control of aquacultures and toxicological tests

Ana Claudia O. de Almeida¹, Lais F. dos Santos¹, Therezinha M. N. de Oliveira², Cesar C. Martins¹, William G. Matias³, Marcelo Soeth^{1,4} and Silvia P. Melegari^{1*}

1 Centro de Estudos Do Mar, Universidade Federal do Paraná (UFPR), Campus Pontal do Paraná, 83255-000, Pontal do Paraná, PR, Brasil.

2 Universidade da Região de Joinville (UNIVILLE), Zona Industrial Norte - Joinville, SC - 89219-710, Brasil.

3 Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental, Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) - Campus Trindade - Florianópolis, SC - 88040-970, Brasil.

4 Universidade Federal do Espírito Santo, Centro Universitário Norte do Espírito Santo, Departamento de Ciências Agrárias e Biológicas, Laboratório de Ecologia de Peixes Marinhos, BR 101, Km 60, São Mateus, ES - 29932-540, Brasil.

* Corresponding author: silvia.melegari@ufpr.br

ABSTRACT

Microalgae are good indicators for toxicity tests because they are sensitive to contamination and changes in the aquatic environment. These organisms are easily affected by biotic and abiotic changes in the environment, providing fast and relevant information on environmental impacts related to water pollution. Therefore, the quantification of phytoplankton, in terms of cells per mL (cells/mL) and/or biomass is an important parameter to assess and monitor water and environmental quality. For this reason, the development of simple, reliable, and efficient techniques to monitor cell growth is of the utmost importance. Thus, this study aimed to calibrate a linear regression model to estimate the cell density of green microalgae *Desmodesmus subspicatus* and *Tetraselmis sp.*, which are species representative of freshwater and marine ecosystems, respectively. The species were grown in laboratory using national and international standards for culture media. The cell density of the microalgae was quantified by the classic method of counting in a Neubauer chamber under an optical microscope. In parallel, absorbance spectrophotometry techniques were used with the reading of cell density by absorbance at wavelengths of 680 and 425 nm, for the suspension of microalgae *D. subspicatus* and *Tetraselmis sp.*, respectively. Both the green microalgae demonstrated a significant relationship between cell density and absorbance at wavelengths of 680 nm and 425 nm, respectively. The linear models showed a good fit for the data set and the observed variance. The results demonstrated that the tested technique is reliable; in addition, it is fast and easy to reproduce.

KEYWORDS: *DESMODESMUS SUBSPICATUS*, *TETRASELMIS SP.*, CELL DENSITY, SPECTROPHOTOMETRY, TOXICITY TESTS

The microalgae biotechnology is a field of relevant matter because the control of microalgae culture is of great economic interest due to the possibility of commercial application in different areas such as the production of biomass, food, feed, fuels, production of high-value chemical products, bioactive compounds, fertilizers, aquaculture foods, antioxidants, and dyes (Pulz and Gross, 2004). Microalgae are organisms of interest in several areas due to characteristics such as accelerated growth, with little need for water, high biomass productivity (Goh et al., 2019), low maintenance cost, and a short life cycle, which it allows the observation of toxic effects in several generations (Costa et al., 2008).

Microalgae are highly sensitive to contamination, being easily affected by biotic and abiotic environment changes. These organisms also provide important information for predicting environmental impacts related to water pollution, which makes them a good indicator to be used in toxicity tests (Debelius et al., 2009; Suparmaniam et al., 2019). Therefore, the quantification of phytoplankton, in terms of cells/mL and/or biomass and its taxonomic composition are important parameters for the assessing and the monitoring of water and environment quality (Müller et al., 2010). Regardless of the purpose of the microalgae, a fast and efficient method to determine the microalgae's biomass and growth rate is necessary to several environmental purposes (Nielsen and Hansen, 2019).

An example of the application of microalgae to measure the environmental quality of the aquatic ecosystem is the toxicity tests. Such tests evaluate acute, subacute, or chronic effects caused to microalgae by a given substance. These effects are evaluated with specific methodologies, with acute and chronic tests being the most used and their responses can complement each other (Paschoalino et al., 2010). Toxicity tests are routinely employed as part of a batch of toxicity tests used to assess the environmental impacts of contaminants on aquatic ecosystems (Silva et al., 2009; Stone et al., 2019; Boros and Ostafe, 2020). Standard microalgae tests measure the decrease in growth rate or cell density after exposure of the microalgae to a period that can vary between 6 and 96 h (Franklin et al., 2002).

Thus, cell counting is an extremely important step for an efficient result of a range of bioassays. Within the parameters used to analyze cell growth, biomass measurement is a basic tool, used as an indirect measure for product formation, consumption of substrate and process disorders (Li et al., 2014). However, traditional direct measurements are performed by dry weight determinations or by counting cells using a microscope (Silva et al., 2009; Ribeiro Rodrigues et al., 2011; Miashiro et al., 2012). The most used technique to estimate microalgae biomass is probably the viable counting technique; however, there are several factors that tend to change the effectiveness of this method is the estimation of algal biomass, mainly the lack of reproducibility associated with the technique, suitability, usefulness and time (Prieto et al., 2004). Despite the meaningful importance of this cell

counting method, when dealing with toxicological tests we talk about many replicates and hours of analysis, which can limit the number of replicates and hours in a test, given the time spent performing the score. Therefore, a faster and more practical method is of paramount importance, especially in toxicology.

There are some ways to count the microalgae cell density, such as: a microscope with the aid of a hemocytometer, an automated cell counter, for example, a Coulter counter (Prado et al., 2015; Sarrafzadeh et al., 2015), or flow cytometry (Stauber et al., 2002; Hyka et al., 2013). However, due to the high aggregate cost, automated methods are not accessible to all audiences (Sarrafzadeh et al., 2015). In addition, although the microalgae cell density can be measured directly under the optical microscope, there is no doubt that this method requires trained professionals in addition to being an exhaustive task and may result in a semi-quantitative result (Valer and Glock, 1999; Liu et al., 2020).

Optical density (OD) is a quantitative analysis method using ultraviolet-visible (UV-vis) spectrophotometry that has been widely used in worldwide laboratories (Zhou et al., 2019). This is due to its simplicity, precision, speed, versatility, and cost-effectiveness, which has made this method quite popular (Parmar and Sharma, 2016; Dankowska et al., 2017; Nielsen and Hansen, 2019), providing effective reproducibility. In addition, the methods can be developed simply and quickly, and the technique is non-destructive, inexpensive, and has an experimental speed and wide application (Ghasemi and Hashemi, 2011; Sohrabi et al., 2018). This technique requires a protocol for the use of the equipment, regardless of the type of critical determination, which may be pharmaceutical, industrial, academic, or environmental research analyzes (Upstone, 2012).

For toxicity tests, reliability is a prerequisite to obtain robust results and a correct interpretation of the data (Imre et al., 2008). Thus, the quantification of algal biomass by cell counting is generally done by slower methods and is laborious, as it requires a direct cell count using a microscope or measurements of cell mass or volume (Ribeiro Rodrigues et al., 2011; Boros and Ostafe, 2020). Indirect methods that correlate algae density to light absorbance of fluorescence at specific wavelengths, besides being more reliable, are also easy to develop (Boros and Ostafe, 2020). The methods used in this work were used by Almeida et al. (2021) to make an assessment of the toxicity of zinc oxide nanorods in the same green microalgae that were used for the validation of this method.

In this study, we tested two species of green microalgae belonging to the phylum *Chlorophyta*, which are extremely abundant in aquatic environments (Metting, 1996): *Desmodesmus subspicatus* and *Tetraselmis* sp., that are representative of freshwater and marine ecosystems, respectively. In this context, the objective of this work was to standardize a regression model to estimate the cell density of green microalgae *Desmodesmus subspicatus* and

Tetraselmis sp., (Chlorophyta) grown in the laboratory, by measuring the spectrophotometric absorbance of algae suspensions. These species are extremely abundant in aquatic environments, representative of freshwater and marine ecosystems, respectively

The microalgae strains of *D. subspicatus* (UTEX B 2594) were kindly provide by University of the Region of Joinville (UNIVILLE). The microalgae strains of *Tetraselmis* sp. (CCMP908 from Bigelow Laboratory for Ocean Sciences) were kindly provided by the Engineering and Malacoculture Laboratory (LEMAQUI) of the Federal University of Paraná (UFPR) – PR, Brazil. *Desmodesmus subspicatus* were cultivated using established protocols (OECD, 2011, ABNT 12648, 2018), with the LC-Oligo medium prepared with ultrapure water. *Tetraselmis* sp. were cultivated by the methods described by ABNT (ABNT 16181, 2013), with F/2 medium (Guillard, 1975), prepared with filtered seawater, and salinity adjusted to 30 ‰. Both *D. subspicatus* and *Tetraselmis* sp. cultures were kept under controlled temperature (20 ± 2 °C) into an incubator (LT 320 TP, LimaTec, Brazil). This was equipped with continuous illumination (6500 lx), aeration, and stirring (150 rpm; Color Squid White Magnetic Stirrer, IKA, Germany). The cultures were renewed (80 %) weekly by a new sterile culture medium.

The indirect spectrophotometric method with a UV-visible spectrophotometer (EEQ9011I.UV-B, Edutec, Brazil) was used for the quantification of cell density of microalgae *D. subspicatus* and *Tetraselmis* sp. The maximum absorbance was inspected by scanning a sample of the cultures between 300 and 700 nm for both microalgae (Figure 1). The absorbance peak in this range was then used to calibrate the density curve for the microalgae. For the development of the spectrophotometric quantification method, an equivalence pattern was established using the traditional method of visual counting under an optical microscope, and, in parallel, the measure of the absorbance of these algae suspensions at maximum absorbance wavelengths was performed.

Thus, from a microalgae sample of the culture, counts were performed by the traditional method under an optical microscope, with the aid of the Neubauer chamber, according to the technique described by Guillard, (1975). For *D. subspicatus*, dilutions were prepared in LC-Oligo medium from a stock solution (21.3×10^6 cells/mL, obtained by traditional counting) in concentrations of 0.6×10^6 , 1.3×10^6 , 2.6×10^6 , 5.3×10^6 and 10.6×10^6 cells/mL, and the absorbance readings of these dilutions were taken at a wavelength of 680 nm (Abs_{680nm}). For *Tetraselmis* sp. dilutions in F/2 medium were prepared from the mother suspension, in concentrations of 0.5×10^5 , 1.2×10^5 , 2.1×10^5 , 4.9×10^5 , 12.6×10^5 cells/mL, and the absorbance readings of these dilutions were taken at a wavelength of 425 nm (Abs_{425nm}). From the values of cell density and absorbance, the calibration curves were constructed that will serve as a model for the indirect quantification of cell densities.

The cell number determinations were performed using a Neubauer chamber. Only samples without overlapping cells in the grid were counted. To prepare the hemocytometer, 100 μ L of cell suspension was used for counting under an optical microscope (Eclipse 80i, Nikon, Japan) using a 20x objective lens. Only for the microalgae *Tetraselmis* sp. it was necessary to pre-fix the cells with a 5 % Lugol solution.

The relationship between the cell density of *D. subspicatus* and Abs_{680nm}, and *Tetraselmis* sp. and Abs_{425nm} was determined by classic linear regression model *presented* in Equation 1:

$$\text{Cell density (cells/mL)} = a + b \cdot \text{Abs}_{xxx} \quad (\text{Eq. 1})$$

where *a* is the y-intercept and *b* the slope of linear regression.

The parameters of the model were individually estimated for three different *Tetraselmis* sp. cultures and for two different cultures of *D. subspicatus*. The significance of each model was evaluated by general statistics as F-test and *p*-value while the adjustments of the models were evaluated by analyzing the dispersion of the residues and values of R². The models were compared by means of covariance analyses (ANCOVA), where absorbance was the response variable, culture as the main factor, and cell density the covariate. All analyses were performed in the R environment (R Core Team 2020).

Absorption spectra (as shown in Figure 1) are mainly influenced by the composition of pigments and their concentrations in microalgae cells (Bricaud et al., 1988; Roesler et al., 1989). It is known that several forms of chlorophyll have maximum absorption at different wavelengths and that as the pigment concentration increases the absorption coefficients also increase with similar spectral forms in the wave range (Bricaud et al., 1988; Roesler et al., 1989). According to Bhuvana et al., (2019), all organisms capable of performing photosynthesis have chlorophyll-*a*, which absorbs red and violet lights at approximately 662 and 430 nm, respectively. Chlorophyll-*b* strongly absorbs orange and blue lights at 642 and 453 nm, respectively, and both types of chlorophylls are present in green algae. Thus, green algae have strong absorption peaks close to 675 and 440 nm due to the presence of these types of chlorophylls (Wu et al., 2013; Bhuvana et al., 2019). This behavior of green algae may explain why the microalgae of this study presented these patterns of light absorption, where *D. subspicatus* at 680 nm and *Tetraselmis* sp. at 425 nm.

Absorbance values were correlated with cell density count values of microalgae *D. subspicatus* and *Tetraselmis* sp. The relationship between Abs and cell density for both microalgae was significant (*p* < 0.001), as determined by the linear model (Table 1). The high values of the coefficients of determination and the reduced dispersion of the residues indicated that the cell count per mL (Table 1) represented a high and positive correlation with Abs (Table 1; Figure 2). In addition, for the microalgae *D. subspicatus* the

differences between the slope (b) were not significant (ANCOVA, $F = 4.751$; $p = 0.065$). Thus, the relationship between density of cells per mL and Abs_{680nm} can be expressed with the data from the two grouped cultures, in Equation 2:

$$Abs_{680nm} = 3.415 \times 10^{-02} + 4.825 \times 10^{-08} \times \text{Cell Density (cells/mL)} \quad (\text{Eq. 2})$$

For the microalgae *Tetraselmis* sp, A significant interaction between cell density and cultivation was recorded in the covariance analysis (ANCOVA, $F = 31.83$, $p < 0.001$), which indicates significant differences between the slope of the linear regressions. The slope of the linear regression model adjusted for C2 was significantly lower than the coefficients of the models adjusted for C1 and C3 (Table 1; Figure 2). Ribeiro Rodrigues et al. (2011) observed that the equation proposed by them to correlate absorbance and cell density of microalgae is not recommended when the measured absorbance value exceeds 0.5; this relationship was also observed in this study, but for the microalgae *Tetraselmis* sp. Therefore, the importance of performing dilutions before reading in the spectrophotometer is stated, so that the readings occur in absorbances smaller than 0.5. However, the relationship between *Tetraselmis* sp. density and absorbance (425 nm) with the data of the three clustered cultures, can be expressed by Equation 3:

$$Abs_{425nm} = 2.384 \times 10^{-02} + 2.900 \times 10^{-07} \times \text{Cell Density (cells/mL)} \quad (\text{Eq. 3})$$

Other studies also showed a positive linear relationship between absorbance and cell density, for wavelengths of 680, 682, 687 and 750 nm (Valer and Glock, 1999; Ribeiro Rodrigues et al., 2011; Santos-Ballardo et al., 2015).

The significant difference observed between the slopes of the regressions can be attributed to changes in the optical properties of the microalgae, since the optical density is not only determined by cell density and biomass. It can also be influenced by specific cellular characteristics, specially the color, presence and concentration of chlorophyll pigments and others variables that affect the optical of microalgae, such as culture age and environmental (Nicholls and Dillon, 1978; Griffiths et al., 2011). However, even under uncontrolled conditions, strong correlations were found between the cell count per mL and some characteristics of microalgae, such as chlorophyll content, organic carbon and total lipids that can influence on optic density method (Rossi and Fiorillo, 2010; Santos-Ballardo et al., 2015).

Some studies have verified the relationships of optical and cell density similar to the present study, presenting high values of R^2 , regardless of microalgae species and wavelength, indicating that the contribution of changes in cellular properties to optical density can be neglected (Valer and

Glock, 1999; Ribeiro Rodrigues et al., 2011; Nielsen and Hansen, 2019). In addition, it was observed that initial cell density is a very important parameter in toxicity tests developed with microalgae (Moreno-Garrido et al., 2000) or to establish the relationships between different biomass estimates (Lu et al., 2017), thus increasing the accuracy of the results with the integration of two methods for the quantification of cell density.

The spectrophotometric method proved a reliable and rapid alternative for the cell density quantification of green microalgae. While the proposed predictive model has proven effective, greater reliability occurs at densities below 1.0×10^6 cells/mL. Future studies need to be conducted to try to expand the concentration range. With this, the previous dilution of cultures is a fundamental step before measurement. However, this method presented excellent relationships between optical and cell density, with high values of R^2 , which makes the results easily comparable and replicable in other studies when using wavelengths of 425 and 680nm.

Knowing that the two-wavelength peaks proposed are associated with chlorophyll pigments, it is important to consider some factors that can affect the chlorophyll content per cell, like the phase of the life cycle of microalgae (ideal in exponential phase for toxicity tests), the light availability for the cells that change with the growing. With this, future studies should focus on how these factors would be enough to significantly affect the correlation between cell count and absorbance observed in this study. Also, validating the correlation between cell count and absorbance for microalgae cultures at different phases of the life cycle can be helpful to evaluate if this method is useful for monitoring culture growth. Another question to be further explored in future work is understanding how robust the proposed correlation is in the presence of toxic contaminants that inhibit pigment synthesis, or that induce chlorosis. These answers will help to establish patterns to better validate this method is as useful for toxicity assays and algal cultures.

ACKNOWLEDGMENTS

We gratefully acknowledge the Environmental Laboratory of Joinville Regional University (UNIVILLE, Joinville, Santa Catarina, Brazil) and Engineering and Malacoculture Laboratory (LEMAQUI – UFPR, Pontal do Paraná, Paraná, Brazil) to kindly provided the microalgae strains. This work was sponsored in part by the CNPq [grant number 552112/2011-9] and CAPES/PNPD [grant number 2982/10]. This work contributes to the EQCEP project (Historical input and future perspectives related to the chemical stressors occurrence in the Paranaguá Estuarine System) sponsored by CNPq and Brazilian Ministry of Science, Technology, Innovation [grant number 441265/2017-0] and coordinated by Professor M. M. Mahiques.

AUTHOR CONTRIBUTION

A. C. O. de Almeida: Investigation, Writing – Original Draft & Review, Formal analysis; **L. F. dos Santos:** Formal analysis; **T. M. N. de Oliveira:** Writing - Review, Funding acquisition; **W. G. Matias:** Writing - Review, Funding acquisition; **C. C. Martins:** Writing - Review, Funding acquisition, Co-supervision; **M. Soeth:** Writing - Review, Formal analysis; **S. P. Melegari:** Funding acquisition, Conceptualization, Writing Original Draft and Review & Editing, Supervision.

REFERENCES

- ALMEIDA, A. C. O. DE, SANTOS, L. F. DOS, VICENTINI, D. S., MATIAS, W. G. & MELEGARI, S. P. 2021. Evaluation of toxicity of zinc oxide nanorods on green microalgae of freshwater and marine ecosystems. *Environmental Chemistry and Ecotoxicology*, 3, 85–90. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.enceco.2021.01.003>
- BHUVANA, P., SANGEETHA, P., ANURADHA, V. & ALI, M. S. 2019. Spectral characterization of bioactive compounds from microalgae: *N. Oculata* and *C. Vulgaris*. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 19(April), 101094. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2019.101094>
- BOROS, B. V. & OSTAFE, V. 2020. Evaluation of ecotoxicology assessment methods of nanomaterials and their effects. *Nanomaterials*, 10(4). DOI: <https://doi.org/10.3390/nano10040610>
- BRICAUD, A., BÉDHOMME, A.-L. & MOREL, A. 1988. Optical properties of diverse phytoplanktonic species: experimental results and theoretical interpretation. *Journal of Plankton Research*, 10, 857–873.
- COSTA, C. R., OLIVI, P., BOTTA, C. M. R. & ESPINDOLA, E. L. G. 2008. A toxicidade em ambientes aquáticos: Discussão e métodos de avaliação. *Quimica Nova*, 31(7), 1820–1830. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100-40422008000700038>
- DANKOWSKA, A., DOMAGAŁA, A. & KOWALEWSKI, W. 2017. Quantification of *Coffea arabica* and *Coffea canephora* var. *robusta* concentration in blends by means of synchronous fluorescence and UV-Vis spectroscopies. *Talanta*, 172(January), 215–220. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2017.05.036>
- DEBELIUS, B., FORJA, J. M., DELVALLS, Á. & LUBIÁN, L. M. 2009. Toxicity and bioaccumulation of copper and lead in five marine microalgae. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 72(5), 1503–1513. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2009.04.006>
- FRANKLIN, N. M., STAUBER, J. L., APTE, S. C. & LIM, R. P. 2002. Effect of initial cell density on the bioavailability and toxicity of copper in microalgal

- bioassays. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 21(4), 742–751. DOI: [https://doi.org/10.1897/1551-5028\(2002\)021<0742:EOICDO>2.0.CO;2](https://doi.org/10.1897/1551-5028(2002)021<0742:EOICDO>2.0.CO;2)
- GHASEMI, J. B. & HASHEMI, B. 2011. Surfactant-mediated complex formation for determination of traces amounts of zinc, cadmium, and lead with 4-(2-thiazolylazo) resorcinol and chemometric methods. *Environmental Monitoring and Assessment*, 183(1–4), 57–63. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10661-011-1905-1>
- GOH, B. H. H., ONG, H. C., CHEAH, M. Y., CHEN, W. H., YU, K. L. & MAHLIA, T. M. I. 2019. Sustainability of direct biodiesel synthesis from microalgae biomass: A critical review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 107(February), 59–74. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.rser.2019.02.012>
- GRIFFITHS, M. J., GARCIN, C., VAN HILLE, R. P. & HARRISON, S. T. L. 2011. Interference by pigment in the estimation of microalgal biomass concentration by optical density. *Journal of Microbiological Methods*, 85(2), 119–123. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2011.02.005>
- GUILLARD, R. R. L. 1975. Culture of Marine Invertebrate Animals. In: Smith, W. L. & M.H.Chanley (eds.), *Culture of Marine Invertebrate Animals* (1st editio, pp. 29–60). London. DOI: <https://doi.org/10.1007/978-1-4615-8714-9>
- HYKA, P., LICKOVA, S., PŘIBYL, P., MELZUCH, K. & KOVAR, K. 2013. Flow cytometry for the development of biotechnological processes with microalgae. *Biotechnology Advances*, 31(1), 2–16. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2012.04.007>
- IMRE, S., VLASE, L. & MUNTEAN, D. L. 2008. Bioanalytical method validation. *Revista Romana de Medicina de Laborator*, 10(1), 13–21. DOI: <https://doi.org/10.5958/2231-5675.2015.00035.6>
- LI, Y., GHASEMI NAGHDI, F., GARG, S., ADARME-VEGA, T. C., THURECHT, K. J., GHAFOR, W. A., TANNOCK, S. & SCHENK, P. M. 2014. A comparative study: The impact of different lipid extraction methods on current microalgal lipid research. *Microbial Cell Factories*, 13(1). DOI: <https://doi.org/10.1186/1475-2859-13-14>
- LIU, J. Y., ZENG, L. H. & REN, Z. H. 2020. The application of spectroscopy technology in the monitoring of microalgae cells concentration. *Applied Spectroscopy Reviews*, 0(0), 1–22. DOI: <https://doi.org/10.1080/05704928.2020.1763380>
- LU, L., YANG, G., ZHU, B. & PAN, K. 2017. A comparative study on three quantitating methods of microalgal biomass. *Indian Journal of Geo-Marine Sciences*, 46(11), 2265–2272.
- METTING, F. B. 1996. Biodiversity and application of microalgae. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 17(5–6), 477–489.
- MIASHIRO, L., LOMBARDI, J. V. & MERCANTE, C. T. J. 2012. Ecotoxicity assessment in aquaculture system using the test organism *Pseudokirchneriella subcapitata* (Chlorophyceae). *Acta Scientiarum - Biological Sciences*, 34(4), 373–379. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0103-90162012000400009>

<https://doi.org/10.4025/actascibiolsci.v34i4.9391>

- MORENO-GARRIDO, I., LUBIÁN, L. M. & SOARES, A. M. V. M. 2000. Influence of cellular density on determination of EC50 in microalgal growth inhibition tests. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 47(2), 112–116. DOI: <https://doi.org/10.1006/eesa.2000.1953>
- MÜLLER, C. C., RAYA-RODRIGUEZ, M. T. & CYBIS, L. F. 2010. Diagnóstico da qualidade analítica na quantificação de cianobactérias. *Engenharia Sanitaria e Ambiental*, 15(3), 283–290. DOI: <https://doi.org/10.1590/s1413-41522010000300012>
- NICHOLLS, K. H. & DILLON, P. J. 1978. An Evaluation of Phosphorus-Chlorophyll-Phytoplankton Relationships for Lakes. *Internationale Revue Der Gesamten Hydrobiologie Und Hydrographie*, 63(2), 141–154. DOI: <https://doi.org/10.1002/iroh.19780630203>
- NIELSEN, S. L. & HANSEN, B. W. 2019. Evaluation of the robustness of optical density as a tool for estimation of biomass in microalgal cultivation: The effects of growth conditions and physiological state. *Aquaculture Research*, 50(9), 2698–2706. DOI: <https://doi.org/10.1111/are.14227>
- PARMAR, A. & SHARMA, S. 2016. Derivative UV-vis absorption spectra as an invigorated spectrophotometric method for spectral resolution and quantitative analysis: Theoretical aspects and analytical applications: A review. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 77, 44–53. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.trac.2015.12.004>
- PASCHOALINO, M. P., MARCONE, G. P. S. & JARDIM, W. F. 2010. Os Nanomateriais e a Questão Ambiental. *Química Nova*, 33(2), 421–430.
- PRADO, R., GARCÍA, R., RIOBOO, C., HERRERO, C. & CID, A. 2015. Suitability of cytotoxicity endpoints and test microalgal species to disclose the toxic effect of common aquatic pollutants. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 114, 117–125. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2015.01.021>
- PRIETO, B., SILVA, B. & LANTES, O. 2004. Biofilm quantification on stone surfaces: Comparison of various methods. *Science of the Total Environment*, 333(1–3), 1–7. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2004.05.003>
- PULZ, O. & GROSS, W. 2004. Valuable products from biotechnology of microalgae. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 65(6), 635–648. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00253-004-1647-x>
- RIBEIRO RODRIGUES, L. H., ARENZON, A., RAYA-RODRIGUES, M. T. & FERREIRA FONTOURA, N. 2011. Algal density assessed by spectrophotometry: A calibration curve for the unicellular algae *Pseudokirchneriella subcapitata*. *Journal of Environmental Chemistry and Ecotoxicology*, 3(8)(August), 225–228. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.appdev.2017.05.005>
- ROESLER, C. S., PERRY, M. J. & CARDER, K. L. 1989. Modeling in situ phytoplankton absorption from total absorption spectra in productive inland marine waters. *Limnology and Oceanography*, 34(8), 1510–1523. DOI: <https://doi.org/10.4319/lo.1989.34.8.1510>
- ROSSI, S. & FIORILLO, I. 2010. Biochemical features of a protoceratium

- reticulatum red tide in Chipana Bay (Northern Chile) in summer conditions. *Scientia Marina*, 74(4), 633–642. DOI: <https://doi.org/10.3989/scimar.2010.74n4633>
- SANTOS-BALLARDO, D. U., ROSSI, S., HERNÁNDEZ, V., GÓMEZ, R. V., DEL CARMEN RENDÓN-UNCETA, M., CARO-CORRALES, J. & VALDEZ-ORTIZ, A. 2015. A simple spectrophotometric method for biomass measurement of important microalgae species in aquaculture. *Aquaculture*, 448, 87–92. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2015.05.044>
- SARRAFZADEH, M. H., LA, H. J., SEO, S. H., ASGHARNEJAD, H. & OH, H. M. 2015. Evaluation of various techniques for microalgal biomass quantification. *Journal of Biotechnology*, 216, 90–97. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2015.10.010>
- SILVA, A., FIGUEIREDO, S. A., SALES, M. G. & DELERUE-MATOS, C. 2009. Ecotoxicity tests using the green algae *Chlorella vulgaris*-A useful tool in hazardous effluents management. *Journal of Hazardous Materials*, 167(1–3), 179–185. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2008.12.102>
- SOHRABI, M. R., MIRZABEYGI, V. & DAVALLO, M. 2018. Use of continuous wavelet transform approach for simultaneous quantitative determination of multicomponent mixture by UV–Vis spectrophotometry. *Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 201, 306–314. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.saa.2018.05.020>
- STAUBER, J. L., FRANKLIN, N. M. & ADAMS, M. S. 2002. Applications of flow cytometry to ecotoxicity testing using microalgae. *Trends in Biotechnology*, 20(4), 141–143. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0167-7799\(01\)01924-2](https://doi.org/10.1016/S0167-7799(01)01924-2)
- STONE, S., ADAMS, M. S., STAUBER, J. L., JOLLEY, D. F. & WARNE, M. S. J. 2019. Development and application of a multispecies toxicity test with tropical freshwater microalgae. *Environmental Pollution*, 250, 97–106. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.03.058>
- SUPARMANIAM, U., LAM, M. K., UEMURA, Y., LIM, J. W., LEE, K. T. & SHUIT, S. H. 2019. Insights into the microalgae cultivation technology and harvesting process for biofuel production: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 115(August), 109361. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.rser.2019.109361>
- UPSTONE, S. 2012. *Validating UV / Visible Spectrophotometers*. 2–10 pp.
- VALER, R. & GLOCK, L. 1999. Quantificação de algas clorofíceas de interesse ecotoxicológico através do método espectrofotométrico. *Acta Limnologica Brasiliensia*, 11(2), 149–156.
- WU, D., CHEN, M., WANG, Q. & GAO, W. 2013. Algae (*Microcystis* and *Scenedesmus*) absorption spectra and its application on Chlorophyll a retrieval. *Frontiers of Earth Science*, 7(4), 522–530. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11707-013-0373-z>
- ZHOU, F., LI, C., ZHU, H. & LI, Y. 2019. Determination of trace ions of cobalt and copper by UV–vis spectrometry in purification process of zinc hydrometallurgy. *Optik*, 184(January), 227–233. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijleo.2019.01.010>

Table 1. Linear regression model parameters for isolated and grouped cultures of *Tetraselmis sp* and *D. subspicatus*. Significant codes: $p < 0.0001$ ‘***’, $p < 0.001$ ‘**’, $p < 0.01$ ‘*’.

Species	Culture	a	b	R ²	F
<i>Tetraselmis sp.</i>	C1	2.015×10^{-02}	3.475×10^{-07}	0.989	358.2***
	C2	4.605×10^{-02}	2.344×10^{-07}	0.999	4792**
	C3	-1.805×10^{-02}	3.349×10^{-07}	0.995	844.9*
	Pooled	2.384×10^{-02}	2.900×10^{-07}	0.949	296.2***
<i>D. subspicatus</i>	C4	1.611×10^{-02}	5.315×10^{-08}	0.999	3,803***
	C5	3.790×10^{-02}	4.685×10^{-08}	0.994	641.7***
	Pooled	3.415×10^{-02}	4.825×10^{-08}	0.992	1103***

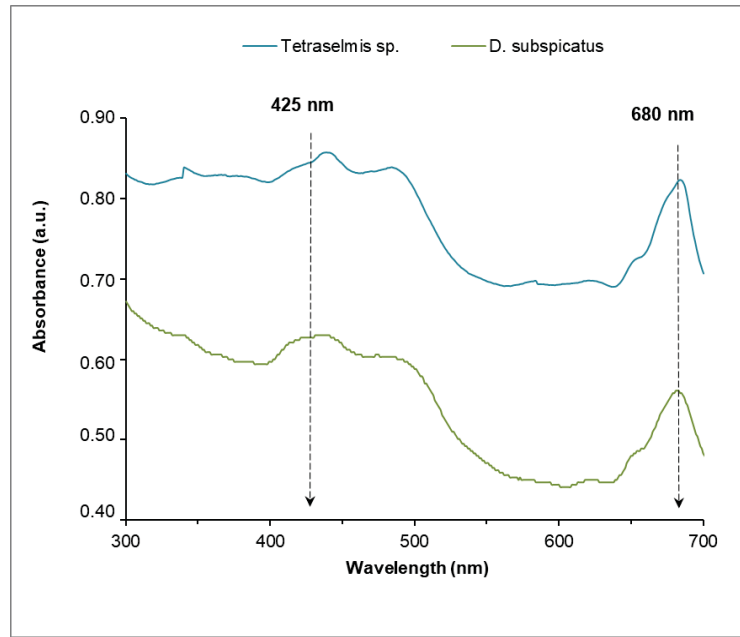


Figure 1. Scanning visible spectra of both microalgae cultures (range of 700 to 300 nm) used to identify and to choose the maximum wavelength work of 425 nm for *Tetraselmis sp.* and 680 nm for *D. subspicatus*.

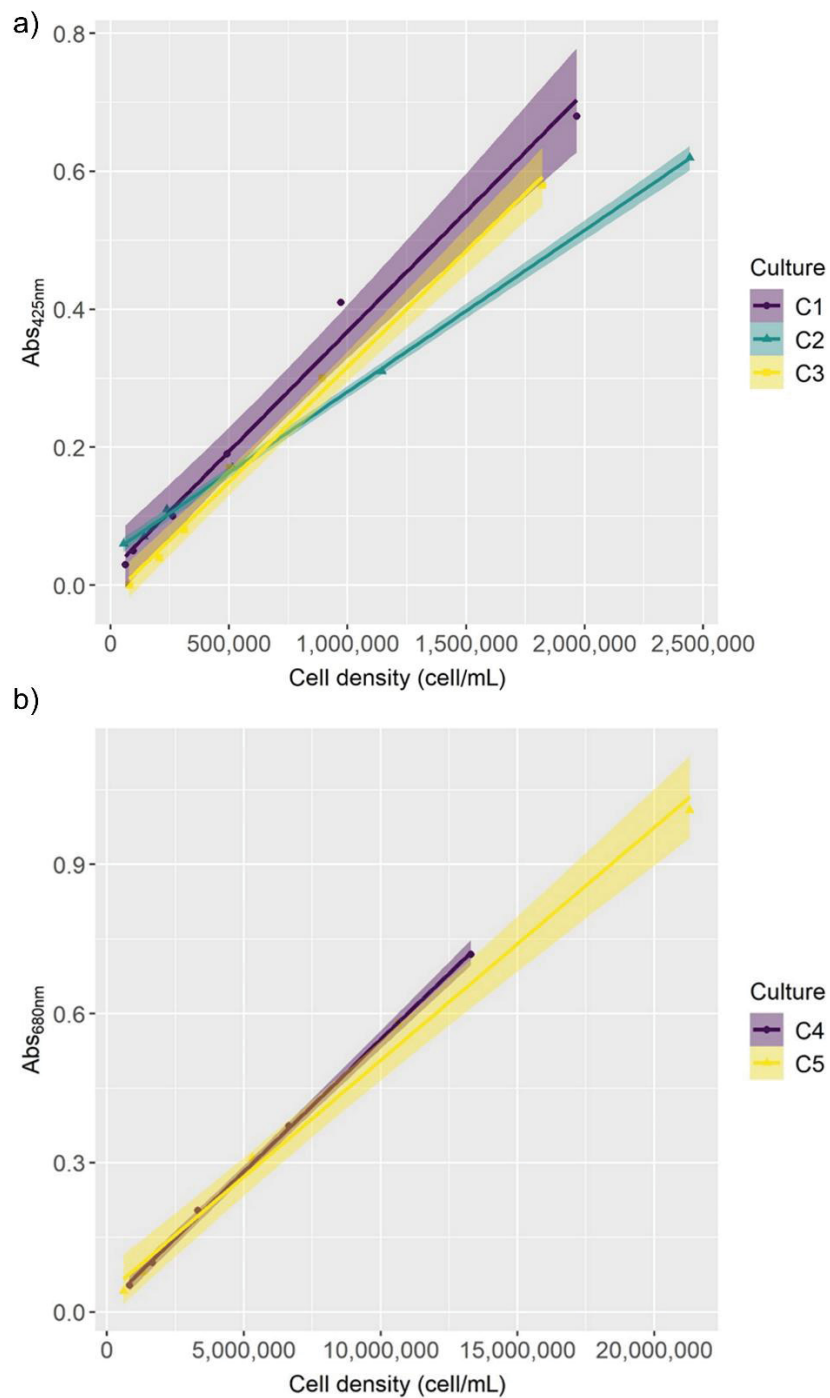


Figure 2. Relationship between cell density and absorbance as determined by linear regression model for distinct cultures of *Tetraselmis sp.* (a) and *D. subspicatus* (b).

6. CAPÍTULO 2

Os resultados apresentados neste capítulo referem-se à avaliação da toxicidade das amostras de sedimento do CEP e a discussão com os estressores químicos e as atividades antrópicas locais. Esse capítulo foi estruturado no formato de artigo científico, e após avaliação da banca, será traduzido para o inglês para submissão ao periódico-alvo: *Chemosphere* (Electronic ISSN: 0045-6535), fator de impacto: 7.086 (2020), classificação Qualis: A2.

TÍTULO: Avaliação da toxicidade em sedimento de um estuário subtropical usando microalgas verdes e correlação com estressores químicos: uma abordagem integrada

HIGHLIGHTS

- Níveis de metais e poluentes orgânicos foram avaliados no sedimento do Complexo Estuarino de Paranaguá.
- A microalga *Tetraselmis* sp. foi exposta a diferentes concentrações do elutriato dos sedimentos avaliados.
- Os resultados indicam sedimentos não contaminados.
- A microalga mostrou sensibilidade às maiores concentrações do elutriato.
- A interação entre os compostos deve ser considerada no estabelecimento de diretrizes de qualidade.

RESUMO

O uso de microalgas como organismos teste em estudos ecotoxicológicos tem sido promissor devido a sua posição na cadeia trófica e sensibilidade a contaminantes. Nesse contexto, este estudo avaliou a presença de elementos-traço, poluentes orgânicos persistentes (POPs), LABs e HPAs no sedimento do Complexo Estuarino de Paranaguá (CEP) e o seu potencial tóxico sobre a microalga *Tetraselmis* sp. Para tanto, foram coletadas cinco amostras de sedimentos superficiais (0–3 cm) no eixo leste - oeste (Baías de Paranaguá e Antonina) e no eixo norte - sul (Baía de Laranjeiras). Das amostras de sedimento, foi determinado a granulometria e quantificados estressores químicos relevantes, incluindo elementos-traço (Cr, Cu, Ni, Pb e Zn e As) contaminantes orgânicos como poluentes orgânicos persistentes (DDTs, PCBs), e hidrocarbonetos (HPAs e LABs). Por fim, foram realizadas análises toxicológicas destas amostras utilizando a microalga marinha *Tetraselmis* sp. como bioindicador). A análise de componentes principais (PCA) indicou a formação de três agrupamentos: (1) composto pelo ponto P1 e associado as maiores concentrações de p,p'- DDT e LABs totais; (2) composto pelos pontos P2, P3 e P4 e associado as maiores concentrações de elementos-traço, HPAs, PCBs totais e lama, (3) composto pelo ponto P5 e associado as maiores porcentagens de areia. Os resultados dos parâmetros quantitativos dos estressores químicos (metais e compostos orgânicos) atenderam aos requisitos das diretrizes de qualidade de sedimentos (SQGs). Todavia, os resultados dos ensaios de toxicidade mostraram que o sedimento dos pontos P1 e P3 apresentaram efeito tóxico à microalga *Tetraselmis* sp. após 96h de exposição. Apesar dos resultados mostrarem valores abaixo dos indicados pelo SQGs, o presente estudo traz um alerta sobre o potencial efeito sinérgico dos contaminantes, o qual ainda, devido à complexidade e especificidades, não está presente nas diretrizes vigentes norteadoras da qualidade do sedimento.

Palavras- chave: Complexo estuarino de Paranaguá, sedimentos superficiais, testes toxicológicos, *Tetraselmis* sp., estressores químicos, atividades antrópicas.

HIGHLIGHTS

- Levels of metals and organic contaminants was evaluated in sediment from a subtropical estuarine system.
- The microalgae *Tetraselmis* sp. was exposed to different concentrations of elutriate from the evaluated sediments.
- Results and quality guidelines indicate uncontaminated sediments.
- Microalgae showed sensitivity to higher concentrations of elutriate.
- Interaction between compounds must be considered when establishing quality guidelines.

ABSTRACT

The use of microalgae as test organisms in ecotoxic studies has been promising due to their position in the trophic chain and sensitivity to contaminants. In this context, this study evaluated the presence of polluting trace elements, persistent organics (POPs), LABs and PAHs in the sediment of the Paranaguá Estuarine Complex (PEC) and their toxic potential on the microalgae *Tetraselmis* sp. For this, the collections of five sediment samples were collected on the east axis (0–3 cm) and east - west axis of Laranjeiras north - south (Low east - west - south axis of Laranjeiras). From the sediment samples, the granulometry was determined and relevant chemical stressors were quantified, including trace elements (Cr, Cu, Ni, Pb and Zn and As), organic contaminants such as persistent organics (DDTs, PCBs), and hydrocarbons (PAHs and LABs). Finally, a toxicological analysis of these marine samples *Tetraselmis* sp. as a bioindicator). Principal component analysis (PCA) indicated the formation of three clusters: (1) composed of point P1 and associated with greater p,p'-DDT and total LABs; (2) composed of points P2, P3 and associated as major and of trace elements, total PCBs and mud, (3) composed of points P5 with higher percentages of sand. The biological results of sediment quality standards (SQGs) are determined. However, the results of the toxicity tests, that the sediment1 and the sediment of the points were modified *Tetraselmis* sp. after 96 hours of exposure. Despite showing the values indicated below by the SQGs, the present study brings an alert about the potential synergistic effect of the contaminants, which, due to the complexity and specificities, is not present in the current guidelines for sediment quality.

Keywords: Paranaguá estuary complex, surface sediments, toxicological tests, *Tetraselmis* sp., chemical stressors, anthropic activities

1. INTRODUÇÃO

Os estuários são ambientes costeiros de grandes riquezas naturais, considerados regiões-chave na dinâmica de sedimentos (CARDOSO; DAUNER; MARTINS, 2016).. Esses ambientes estão sendo cada vez mais influenciados pelas atividades antrópicas, o que tem afetado principalmente a composição, diversidade e biomassa de organismos desse ecossistemas devido a mudanças físicas, químicas e biológicas (Wetzel, 2001). São ainda ambientes caracterizados como zonas de transição e interação entre a terra e oceano (Liu et al. 2014), e possuem elevada produtividade devido ao alto aporte de nutrientes, resultando em uma maior produção primária de microalgas em comparação com locais mais distantes da costa (BOOIJ et al., 2015; NICHOLS; SEMINOFF; ETNOYER, 2010). Os estuários são também ambientes altamente dinâmicos que passam por fortes variações de fatores bióticos e abióticos, possuindo comunidades ecológicas mais adaptadas as condições adversas (MCLUSKY; ELLIOTT, 2007). Apesar da alta resiliência ecológica, esses ambientes sofrem com a descarga de diversos produtos químicos, principal ameaça aos ecossistemas costeiros e marinhos (SOUZA et al., 2016).

O crescente desenvolvimento industrial, agrícola e do tráfego marítimo, especialmente dentro e perto dos portos, criaram sérios riscos à saúde humana e ecossistêmica (LAKSHMANASENTHIL et al., 2013; SRINIVASA REDDY et al., 2005), pois tem acarretado em um aumento tanto na quantidade, quanto na diversidade dos poluentes que chegam nos sistemas aquáticos na forma de uma mistura complexa de contaminantes (KANU; ACHI, 2011; SELVAKUMAR; CHANDRASEKAR; KUMAR, 2017; SODANGO et al., 2018). Uma vez no ambiente aquático, esses contaminantes são influenciados por um conjunto de processos físicos, químicos e biológicos que podem afetar seu destino e comportamento (CHAPMAN et al., 1999), tendo como destino final a deposição nos sedimentos (MUCHA; VASCONCELOS; BORDALO, 2003). O que facilita o acúmulo e deposição dos poluentes nos estuários e consequentemente servindo como uma via de exportação para o oceano aberto (LIU et al., 2014; LUO et al., 2006; WANG et al., 2013).

Dentre esses contaminantes, destacam-se os elementos-traço, que podem ser de origem natural ou antrópica, sendo que alguns são reconhecidos como essenciais para os organismos; não são biodegradáveis e podem acumular nos solos e na biota representando um risco para a qualidade ambiental e saúde humana quando em excesso no ambiente (ALI; KHAN; SAJAD, 2013; CHOUVELON et al., 2017). Ao contrário dos elementos-traço, os poluentes orgânicos persistentes (POPs), como as bifenilas policloradas (PCBs) e o diclorodifenil-tricloroetano (DDT), são de origem antropogênica que resistem à maioria dos processos de degradação (CHOUVELON et al., 2017; HAN; CURRELL, 2017). Além de serem persistentes, os POPs são lipofílicos, o que facilita a bioacumulação em organismos aquáticos, com possibilidade de biomagnificação na teia trófica até atingir o ser humano, além de ser tóxico para toda esta cadeia (BARLETTA; LIMA; COSTA, 2019; VERREAULT et al., 2008).

Dependendo da natureza química dos contaminantes disponíveis na coluna da água, estes são adsorvidos ao material particulado em suspensão (MPS) e transportados para os sedimentos por processos de floculação e sedimentação (FERNANDES et al., 2011). Dessa forma, considera-se que o sedimento é uma importante matriz nos estudos ambientais para avaliar mudanças na qualidade e da saúde dos ecossistemas aquáticos (FERNANDES et al., 2011; SOUZA et al., 2016).

Neste contexto, a ecotoxicologia aquática é uma importante ferramenta que visa sinalizar e compreender o impacto dos contaminantes sobre os organismos aquáticos, com base em espécies-chave para o ecossistema e empregando métodos adequados de avaliação (GAUTHIER et al., 2020). O fitoplâncton tem sido muito empregado em estudos ecotoxicológicos devido sua posição de base na cadeia trófica (CHAPMAN, 2013; LEVY; STAUBER; JOLLEY, 2007); como produtores primários estabelecem vínculo que podem afetar até os níveis tróficos mais altos. A boa sensibilidade do fitoplâncton a contaminantes faz com que este organismo tenha a capacidade de refletir e responder rapidamente a alterações ambientais. Além disso, as microalgas possuem crescimento acelerado, baixo custo de manutenção, ciclo de vida curto e sensibilidade a contaminantes (GALLO et al., 2020; GOH et al., 2019;

HUND-RINKE et al., 2018; LEAL et al., 2016; SUMAN; RADHIKA RAJASREE; KIRUBAGARAN, 2015).

Os avanços nos estudos ecotoxicológicos coincidiram com a crescente conscientização de que os sedimentos atuam como um grande reservatório de poluentes, representando um problema grave, além servir como uma fonte secundária de contaminantes para a biota, podendo levar riscos ecológicos para as comunidades (BETTINETTI; GIAREI; PROVINI, 2003; BURTON; JOHNSTON, 2010). Os testes de toxicidade tem se demonstrado extremamente úteis nas avaliações de riscos ambientais e químicos, visto que podem ser feitos de forma relativamente rápida e barata, em comparação com as análises químicas (BETTINETTI; GIAREI; PROVINI, 2003).

A matriz sedimentar é complexa e a diversidade de potenciais compostos tóxicos que se aderem a essa matriz tornam o processo de identificar qual ou quais os componentes que estão gerando efeitos tóxicos para o ecossistemas mais difícil (RIBA et al., 2004). A integração de dados ambientais permite que diferentes análises e abordagens sejam realizadas para entender e explicar fenômenos e situações ambientais, além de possibilitar uma análise mais ampla, profunda e robusta sobre os dados e consequentemente do ecossistema estudado (CHOUERI et al., 2009). Investigar a toxicidade dos sedimentos é desafiador visto a gama de poluentes, a biodisponibilidade e à interação ambiental (PELUSI et al., 2020).

A abordagem química por si só, mesmo sendo de grande importância e relevância, não fornece informações sobre a biodisponibilidade real e o risco biológico associado aos poluentes quantificados (MORRONI et al., 2020). Os ensaios ecotoxicológicos têm sido aplicados progressivamente para quantificar os potenciais riscos biológicos causados pela contaminação, proporcionando uma resposta mais relevante, não restrita por uma lista pré-determinada de contaminantes (VOLPI GHIRARDINI; ARIZZI NOVELLI; TAGLIAPIETRA, 2005). Nesse contexto, este estudo teve como principal objetivo avaliar a toxicidade de amostras de sedimento do Complexo Estuarino de Paranaguá (CEP) empregando a microalga verde *Tetraselmis* sp. como bioindicador e discutir os resultados com as pressões de origem antrópica no ecossistema local, e com os níveis de estressores químicos metais pesados, e contaminantes orgânicos das amostras de sedimento do CEP.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Área de Estudo e amostragem dos sedimentos

O CEP (Fig. 1), localizado na porção central do litoral do estado do Paraná (25°30' S – 48°30' W) - Brasil, possui uma área de 612 km² e é composto por dois eixos principais: norte-sul pela Baía de Laranjeiras, com 30 km de extensão, e leste-oeste pelas Baías de Paranaguá e Antonina, com 56 km de extensão (SANTOS et al., 2009). Para o CEP ocorre a drenagem de mais de 70% da área da bacia hidrográfica litorânea do estado. Outros segmentos menores se conectam a esses dois embaixamentos principais, como as baías de Guaraqueçaba, Pinheiros, Itaquí, entre outros (LAMOUR; SOARES; CARRILHO, 2004).

O movimento das marés e a entrada fluvial são os processos dominantes que afetam as correntes e a circulação da água no estuário, e no CEP, não é diferente (LAMOUR; SOARES; CARRILHO, 2004; MAYERLE et al., 2015). A região interna do CEP possui sedimentos que variam na sua granulometria, com exceção das bocas dos rios, onde há predominância de areias. Nas regiões com forte influência marinha, os sedimentos variam de areias finas a médias bem classificadas, enquanto a porção central do estuário inclui areia fina a muito fina e lodos finos (CARDOSO; DAUNER; MARTINS, 2016; LAMOUR; ANGULO; SOARES, 2007).

A importância do CEP se dá principalmente por fatores ecológicos, sociais e econômicos, pois possui uma grande diversidade de ambientes, fauna, flora, e fornece recursos para a sobrevivência de comunidades tradicionais, que dependem de atividades pesqueiras e de recreação e turismo. O Porto de Paranaguá recebe uma grande quantidade de grãos e outros produtos tais como, como fertilizantes, minerais e derivados de petróleo (LANA et al., 2001; MARTINS et al., 2010; ROCHA et al., 2017). Aqui você pode começar uma nova frase detalhando a atividade portuária.

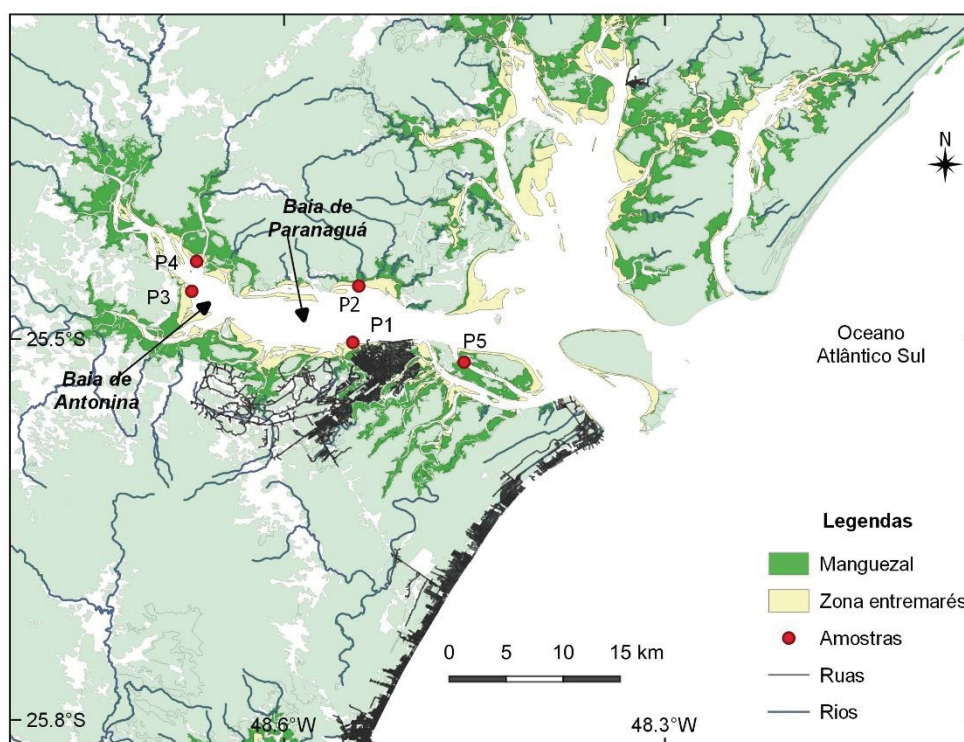


Figura 1. Localização dos pontos de coleta das amostras de sedimento no Complexo Estuarino de Paranaguá (CEP)- Paraná – Brasil. P1: -25 30.156S, -48 32.748W; P2: -25 27.489S, -48 32.467W; P3: -25 27.739S, -48 40.361W; P4: 25 26.325S, -48 40.130W; e P5: -25 31.090S, -48 27.487W.

Para a realização das análises químicas e dos ensaios toxicológicos, foram coletadas na semana dos dias 25 a 27 de abril de 2019, 5 amostras de sedimentos superficiais (0–3 cm) ao longo do eixo leste - oeste (Baías de Paranaguá e Antonina) a fim de identificar a contaminação ao longo dessa região (Fig. 1). A coleta dos sedimentos superficiais foi realizada com auxílio de draga do tipo *Petit Ponar*. Todas as amostras foram congeladas, liofilizadas, maceradas, homogeneizadas e devidamente separadas em recipientes fechados, denominadas como P1, P2, P3, P4 e P5, e foram armazenadas em frascos de vidro previamente muflados em armários a temperatura ambiente.

2.2. Granulometria

As análises granulométricas foram analisadas em alíquotas de 2g de sedimentos de cada amostra. A descarbonatação foi realizada com ácido clorídrico (HCl) 10% (v:v) e a remoção de matéria orgânica (MO) com peróxido

de hidrogênio (H_2O_2) 10% (v:v). A remoção de cada um desses componentes foi feita em etapas distintas sobre chapa aquecida. O tamanho do grão foi determinado em sedimentômetro a laser (Malvern Mastersizer 2000). Para evitar a floculação de partículas finas, antes de cada análise, as amostras foram sonicadas por 5 minutos. Os dados brutos foram processados com o Software Sysgran 3.2 (CAMARGO, 2006) obtendo para cada amostra as porcentagens de cascalho, areia, silte e argila. Neste estudo, os resultados foram apresentados como porcentagem de lama (soma das frações de silte e argila).

2.3. Quantificação dos elementos-traço

A preparação das amostras de sedimento para quantificação dos elementos-traço foi obtida pela técnica de digestão parcial de acordo com o método US EPA 3050B (USEPA, 1996). Uma alíquota de 1,0 g de sedimento seco foi colocada em um béquer de 50 mL e, em seguida, 5 mL de HNO_3 65% (v:v), 2,5 mL de H_2O_2 30% (v:v) e 5 mL de HCl 37% (v:v) foram adicionados. A digestão foi realizada a 90 °C, por 4 horas e 20 minutos. Posteriormente, todas as amostras digeridas foram filtradas e avolumadas para 50 mL com água ultrapura (Merck-Millipore, Milli-Q®). Os elementos-traço de interesse, As, Cr, Cu, Ni, Pb, e Zn, foram quantificados através da técnica de Espectrometria de Emissão Ótica de Plasma Indutivamente Acoplado (ICP-OES) (Varian MPX 710ES) de acordo com método US EPA 6010c (USEPA 2007).

2.4. Contaminantes orgânicos

O método analítico foi adaptado do (UNEP, 1992), com adaptações descritas em Wisnieski et al. (2016) e Bícigo et al. (2006). Aproximadamente 20g de sedimento liofilizado foram extraídos com 80 mL de mistura de diclorometano (DCM) e *n*-hexano (1:1, v:v) em Soxhlet por um período de 8 horas. Cobre ativado foi adicionado em cada frasco de extração para a remoção de enxofre elementar. 100 µL de mistura de padrões subrogados para a determinação de compostos organoclorados (OCs) (PCB-103 e PCB-198), hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) (naftaleno-d8, acenafteno-d10, fenantreno-d10, criseno-d12 e perileno-d12) e alquilbenzeno lineares (LABs)

(1-C12LABs) foi adicionado ao branco e em cada amostra antes da extração. O extrato obtido foi concentrado em um evaporador rotativo a vácuo até o volume aproximado de 2 mL. Este volume foi então submetido à purificação e fracionamento em coluna cromatográfica de vidro preparadas com sulfato de sódio (Na_2SO_4), 3,2 g de sílica gel (SiO_2) e 1,8 g de alumina (Al_2O_3), sendo as duas últimas 5 % desativada com água Milli-Q® (extraída 5 vezes com *n*-hexano, para assegurar a ausência de possíveis interferentes orgânicos). A eluição foi realizada na seguinte ordem: 10 mL de *n*-hexano (obtenção da fração 1, contendo OCs de menor massa molecular e LABs) e 15 mL de mistura de DCM e *n*-hexano (3:7, v:v; obtenção da fração 2, contendo OCs de maior massa molecular e HPAs). O extrato das frações 1 e 2 foram, então, concentrados em evaporador rotativo a vácuo até o volume entre 500 μL e 1 mL e transferidos para ampolas de vidro de 1 mL. Soluções de 1-C19LAB e benzo[b]fluoranteno-d12 foram adicionadas às frações 1 e 2 (respectivamente) previamente à etapa de injeção cromatográfica como padrão interno cromatográfico para LABs e HPAs. O volume final de cada amostra foi ajustado a 500 μL com auxílio de nitrogênio gasoso. Para análise instrumental dos OCs, 150 μL da fração 1 e 150 μL da fração 2 foram transferidos para uma ampola de vidro de 1 mL, onde também foram adicionados 100 μL de uma solução de tetracloro-*m*-xileno como padrão interno cromatográfico para OCs. O volume final foi ajustado com nitrogênio para 250 μL .

A análise instrumental dos compostos orgânicos foi realizada usando um cromatógrafo à gás (modelo GC-7890A, Agilent) acoplado a um espectrômetro de massa (Agilent 5973N inert MSD with Triple-Axis Detector), no modo SIM (Selected Ion Monitoring), equipado com uma coluna capilar Agilent 19091J-433, com 30 m de comprimento, 0,25 μm de espessura do filme, 250 μm de diâmetro interno e fase estacionária de 5% fenil-metil-siloxano. Hélio foi utilizado como gás de arraste. Uma alíquota de 2 μL dos extratos de LABs, HPAs e OCs foram injetados em modo splitless.

A temperatura do injetor foi mantida em 280 °C. A rampa de aquecimento para a separação de HPAs e LABs foi programada de 40 a 60 °C a uma taxa de 20 °C min⁻¹, então para 290 °C a 5 °C min⁻¹ e finalmente para 300 °C a 6 °C min⁻¹. Para OCs, a rampa de aquecimento teve início em 75 °C (permanecendo por 3 min), então subiu para 150 °C a uma taxa de 15 °C min⁻¹.

1, depois para 260 °C a uma taxa de 2 °C min⁻¹, e então até 300 °C a uma taxa de 20 °C min⁻¹, mantendo-se estável nessa temperatura por 10 min.

A quantificação dos compostos orgânicos foi realizada a partir da integração das áreas dos picos de fragmentos de íons específicos (m/z) utilizando o sistema de aquisição de dados Agilent Enhanced Chemstation (G1701 CA). HPAs, LABs e OCs foram identificados através da comparação dos tempos de retenção e m/z específicos com os resultados obtidos dos padrões subrogados de cada amostra e das misturas de padrões externos (HPAs: Z-014G-FL, AccuStandard, USA; LABs: LABs Mix Lot LPS 0025/08, Deten Química S.A.; PCBs: C-WNN e C-WCFS; POCs: AE-00010, AccuStandard, USA). As curvas de calibração usadas na quantificação foram de 0,10 a 2,00 ng µL⁻¹ para HPAs, 0,12 a 1,50 ng µL⁻¹ para LABs e 5,00 a 75,00 pg µL⁻¹ para OCs ($r^2 > 0,995$). Brancos laboratoriais não apresentaram interferência nas análises dos compostos de interesse. As recuperações médias dos padrões nas amostras foram 30 ± 6% para naftaleno-d8, 44 ± 3% para acenafteno-d10, 59 ± 3% para fenantreno-d10, 74 ± 1% para criseno-d12, 81 ± 2% para perileno-d12, 42 ± 6% para 1-C12LABs, 94 ± 8% para PCB 103 e 105 ± 12% para PCB 198.

2.5. Teste de toxicidade com microalgas

A toxicidade das amostras de sedimento foi avaliada por meio de ensaios toxicológicos com a microalga marinha *Tetraselmis* sp empregando o elutriato das amostras de sedimento. Os elutrios das amostras de sedimento consistem na transferência da fração solúvel dos contaminantes dos sedimentos para o meio de exposição/cultivo do organismos teste, através de um processo de ressuspensão (CHOUERI et al., 2009). O preparo do elutriato foi baseado na norma NBR 15469:2015 (ABNT, 2015), onde uma alíquota de 100 g de sedimento de cada amostra e 400 mL de água de diluição (meio F/2 utilizado no cultivo da microalga *Tetraselmis* sp.) foram levadas para homogeneização por 30 min a temperatura ambiente e sob agitação de 180 rpm em um agitador magnético. Após a agitação, as amostras foram deixadas em repouso por 1 h para decantação do sedimento, e o sobrenadante foi aspirado cuidadosamente com o auxílio de uma pipeta graduada de 50 mL. Os

elutriatos foram mantidos sob refrigeração de até 10°C, e foram analisados em no máximo 24 h após a sua preparação.

A microalga marinha *Tetraselmis* sp. empregada nos ensaios de toxicidade foi cultivada conforme norma NBR 16181:2013 (ABNT, 2018) com algumas adaptações. O meio de cultura empregado foi o meio F/2 *Guillard*, com uma salinidade de 29 (29‰), pH $7,1 \pm 0,3$, que foi autoclavado após preparo. Durante toda a fase experimental, a cultura da microalga foi mantida a 23 ± 5 °C, e sob iluminação, agitação e aeração constante. A manutenção do cultivo foi realizada semanalmente com troca de 2/3 do meio de cultivo por meio F/2 fresco. Para os ensaios de toxicidade, as microalgas foram mantidas na fase exponencial de crescimento, troca de metade do volume do meio F/2 por meio fresco de 1-2 dias antes do teste de toxicidade.

A densidade celular de microalgas no início do teste foi definida como 250.000 cel/mL para todas as exposições. Para os ensaios de toxicidades foram preparadas cinco diluições diferentes dos elutriatos, mais o controle (somente microalga e meio F/2). Os ensaios foram realizados em triplicata, e as diluições testadas variaram num intervalo de 10 a 80%. As exposições foram realizadas em tubos tipo Falcon de 50 mL estéreis, com volume final das diluições dos elutriatos e microalga de 20 mL.

O teste de toxicidade crônica pela exposição da microalga *Tetraselmis* sp. ao elutriato foi conduzido por um período de exposição de até 96 h, sendo realizadas leituras da densidade celular nos tempos de 24, 48, 72 e 96 h. Para a quantificação da densidade celular foi utilizado o método espectrofotométrico, utilizando um espectrofotômetro UV-VIS (EEQ9011I.UV-B Edutech) com leitura da absorbância no comprimento de onda de 425 nm e extrapolação da densidade celular em curva de calibração previamente estabelecida, conforme ALMEIDA et al., em preparação; VALER, R.M & GLOCK, 1999.

2.7. Análise estatística

A avaliação da variabilidade espacial dos resultados de granulometria, concentrações dos elementos-traço e poluentes orgânicos no sedimento entre os pontos de amostragem foi realizada através de Análise de Componentes

Principais (ACP) utilizando os pacotes *FactoMineR* e *factoextra* no ambiente R (LÊ et al., 2008; KASSAMBARA; MUNDT, 2020; R Development Core Team, 2021). As variáveis foram normalizadas e avaliadas quanto a contribuição para a formação dos dois primeiros componentes da PCA. Devido ao grande número de variáveis (21 variáveis), a avaliação das contribuições foi, primeiramente, realizada separadamente para cada grupo/tipo de variável, ou seja, (1) granulométricas, (2) compostos orgânicos e (3) elemento-traço. As variáveis que apresentaram contribuições abaixo do valor esperado em contribuições uniformes foram excluídas nessa etapa (5 variáveis). Posteriormente, as variáveis (16) foram agrupadas e a contribuição para a formação dos dois primeiros componentes foi novamente avaliada. Por fim, biplots foram utilizados para visualizar quais as variáveis mais contribuíram para a formação dos dois primeiros componentes da PCA e explicaram a variabilidade espacial entre os pontos amostrais. Neste trabalho DDTs corresponde à sigla para o somatório de p, p' -DDTs.

Para a análise estatística dos ensaios de toxicidades, a resposta da densidade celular (i.e., crescimento populacional) sob diferentes concentrações de elutriato e tempos de exposição foi testada por meio de análises permutacionais de variância (PERMANOVA) usando o software Primer v6.1.13 (Anderson et al., 2008). O design analítico incluiu três fatores: concentração do elutriato (fixo, 6 níveis), tempo de exposição (fixo, 4 níveis) e a interação entre concentração e tempo. As PERMANOVAs foram baseadas na distância euclidiana dos dados de densidade celular log-transformados. A soma dos quadrados do Tipo III (parciais) foi calculada usando 9999 permutações. Os modelos considerados estatisticamente significativos foram seguidos por comparações pareadas permutacionais (*pseudo-t* teste) entre todos os pares de níveis (ANDERSON et al., 2008). Devido ao baixo número de permutações possíveis (10) nas comparações pareadas, p -valores $P(MC)$ foram obtidos usando amostragens aleatórias de Monte Carlo a partir da distribuição de permutação assintótica (ANDERSON et al., 2008).

2.8. Comparação dos dados

Para fins de comparação, este estudo empregou as SQGs que considera como índices de referência o ERL (Effects Range-Low) e ERM (Effects Range-Median). Comparados à Resolução CONAMA nº. 454/12, ERL e ERM correspondem aos níveis 1 e 2 de contaminação, respectivamente. Valores abaixo do ERL indicam baixa probabilidade de efeitos adversos, enquanto valores acima de ERM indicam provável efeito à biota. Essas diretrizes estão sendo amplamente utilizadas em estudos que trabalham com os efeitos biológicos e o grau de contaminação do sedimento (BUCHMAN, 2008). No geral, os resultados dos parâmetros quantitativos dos estressores químicos investigados neste estudo tanto para elementos-traço quanto para os contaminantes orgânicos, demonstraram que estes contaminantes atendem os requisitos das diretrizes de qualidade de sedimentos (SQGs)

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Composição química dos sedimentos: abordagem tradicional da granulometria, elementos-traço e Contaminantes orgânicos POPs

As concentrações de Pb, Cd, Cu, Zn, Cr e Ni apresentaram valores abaixo do *ERLs*, indicando que não havia contaminação significativa por esses elementos na área de estudo (Tabela 1). O ponto P2, apresentou concentrações acima do ERL para o As, indicando baixa probabilidade de efeitos negativos à biota (Tabela 1). Os pontos P3 e P4 apresentaram valores de concentrações acima do ERM para o somatório de HPAs, porém para o P4 o ensaio toxicológico não mostrou efeito para o organismo teste usado. O P1 apresentou valores de DDT acima do nível de ERL (Tabela 1).

Neste trabalho os valores de HPAs, LABs e PCBs encontrados não foram utilizados para a discussão pois seus resultados não mostraram nenhuma correlação na PCA. Entretanto são variáveis importantes e que deveriam ser melhores avaliadas em estudos futuros.

Tabela 1. Concentrações dos elementos-traço (mg/kg), $\Sigma p,p'$ -DDTs, Σ HPAs, LABs e PCBs (ng/g) nos pontos amostrados do CEP, comparados com as diretrizes estabelecidas internacionalmente pela NOAA. Valores em negrito excedem os limites estabelecidos nas SQGs.

Contaminante	Pontos amostrados					ERL	ERM
	P1	P2	P3	P4	P5		
As	5.1	8.4	7.6	7.5	3.1	8.2	70.0
Pb	7.3	12.3	13.9	14.0	3.9	46.7	218.0
Cd	0.4	0.6	0.7	0.7	0.2	1.2	9.6
Cu	7.0	11.4	12.9	13.1	2.7	34.0	270.0
Zn	36.5	52.4	53.3	57.2	18.3	150.0	410.0
Cr	20.9	35.7	37.4	41.3	11.1	81.0	370.0
Ni	8.6	15.1	14.5	16.4	4.3	20.9	51.6
$\Sigma p,p'$ -DDTs	2.2	0.8	1.1	1.3	0.0	1.6	46.1
Σ HPAs	38.80	36.80	46.90	48.30	3.21	4.0	44.7
LABs	17.30	6.92	8.53	6.53	0.00	-	-
PCBs	0.40	0.64	0.73	0.75	0.00	22.7	189

1.SQGs: TEL: *Threshold-Effects Level*, ERL: *Effects Range-Low* e ERM: *Effects Range-Mediam* (LONG et al., 1995). 2 Resolução CONAMA nº 454/2012 (CONAMA, 2012).

Alguns elementos-traço são essenciais para o desenvolvimento e crescimento de determinados organismos. Porém, quando em quantidades elevadas, esses se tornam prejudiciais aos organismos aquáticos (FİKİRDEŞİCİ; ALTINDAĞ; ÖZDEMİR, 2012). O acúmulo e presença de elementos-traços (principalmente As, apresentados neste trabalho) nos sedimentos já foram também observados por outros autores na região de estudo (BAI et al., 2012; USESE et al., 2017; VAN et al., 2016). Bai et al., 2012 por exemplo, observou que após a regulação do fluxo de sedimentos nas marés, os resultados mostram que as concentrações dos metais pesados As e Cd nos solos são muito maiores.

A análise de componentes principais (PCA) evidenciou as correlações entre as variáveis abióticas e os pontos amostrais. Das 21 variáveis mensuradas (Material Suplementar, Tabela S1), onze apresentaram as maiores contribuições para a formação das duas primeiras dimensões da PCA (Material Suplementar, Figura S2), as quais explicaram mais de 99% da variância dos dados e apresentaram uma clara distinção entre os pontos (Figura 2). O ponto P1 foi diferenciado dos demais na segunda dimensão da ordenação e foi associado as maiores concentrações de p,p'- DDT e LABs totais (Figura 2). Os pontos P2, P3 e P4 formaram um agrupamento distinto e foram associadas as maiores concentrações de elementos-traço, HPAs, PCBs totais e lama. Esse agrupamento foi diferenciado do site P5 na primeira dimensão da ordenação. O ponto P5 foi associado as maiores porcentagens de areia (Figura 2).

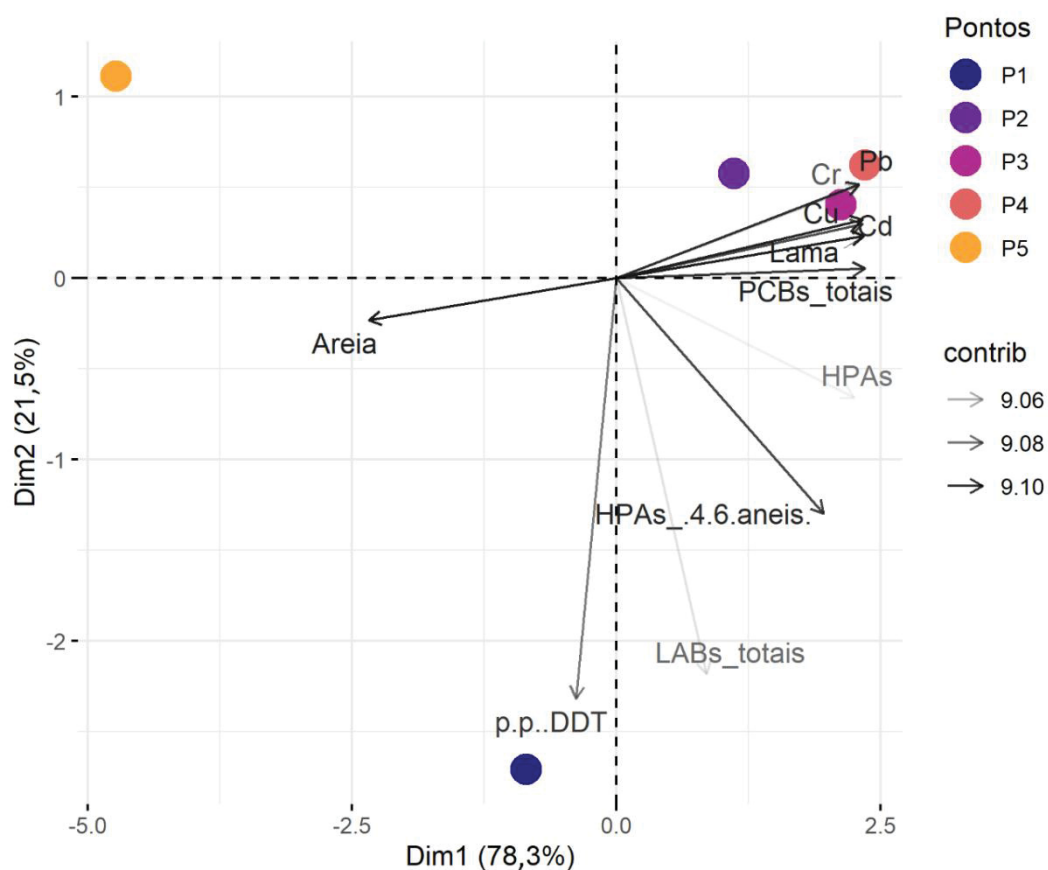


Figura 2. Análise de Componentes Principais (PCA) mostrando a diferenciação dos locais em relação a granulometria e as concentrações de elementos-traço e os contaminantes orgânicos nas amostras de sedimento do Complexo Estuarino de Paranaguá (CEP).

As concentrações de elementos-traço de maneira geral tendem a aumentar com a variação do tamanho do grão, sendo que quanto menor for o grão, maior será a concentração do elementos-traço (LORING; RANTALA, 1992). No presente estudo foi possível observar essa correlação, visto que nos pontos P2, P3 e P4 ocorreu a predominância de sedimentos mais finos, lamosos, e estes foram os pontos com maior concentração de elementos-traço, com destaque para o As (Fig 2 e Tabela 3). Os pontos P3 e P4 estão localizados na Baía de Antonina (Fig. 1), e resultados semelhantes já foram reportados na literatura, indicando a presença de alguns elementos-traço em concentrações elevadas nessa região, como o As (ANGELI et al., 2020a, 2020b; ROCHA et al., 2017). Segundo CHOUEIRI et al., (2009) um dos principais fatores para enriquecimento de elementos-traço nesta região pode ser explicado pela morfodinâmica, topografia do local e grande influência fluvial que pode levar a ressuspensão de metais, levando a um acúmulo de elementos-traço, principalmente de As, na região em questão (POSSATTO et al., 2015; ROCHA et al., 2017).

A parte interna da Baía de Antonina é uma região que possui intensa atividade agrícola que pode estar contribuindo para o aporte de As para o CEP através da drenagem superficial. Sabe-se que o uso indiscriminado de fertilizantes que contém As como princípio ativo ou como impureza, tem ocasionado elevado acúmulo deste elemento nos solos (ISLAM et al., 2016). O intemperismo natural dos solos e rochas também podem ser uma fonte de As para o meio aquático (ANGELI et al., 2020b).

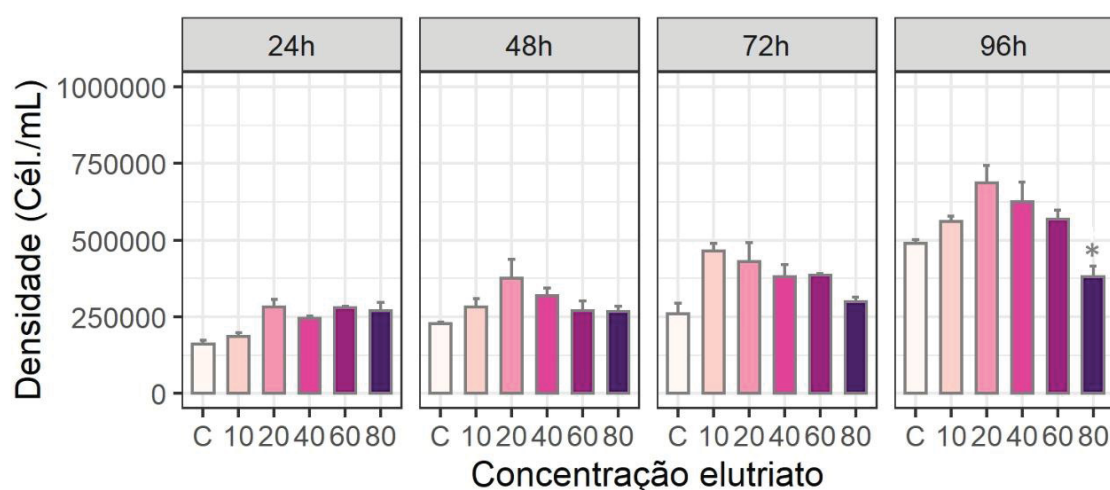
Os DDTs não apresentaram correlação com os elementos-traço (Fig 2), sendo detectadas concentrações de DDTs mais elevados no ponto P1,. A concentração encontrada no P1 foi maior do que o ERL. Cabe aqui destacar que o ponto P1 sofre influência direta de atividades antrópicas relacionadas ao Terminal Portuário de Paranaguá e às atividades urbanas relacionadas a cidade de Paranaguá (LIEBEZEIT et al., 2011; RIZZI et al., 2017). Estudos anteriores reportaram um aporte significativo de DDT na estação Anhaia, um canal artificial que lança esgoto sem tratamento proveniente da cidade de Paranaguá área a oeste do porto de Paranaguá, região próxima ao ponto P1. Conforme reportado por LIEBEZEIT et al., (2011), o esgoto doméstico é possivelmente a principal fonte de DDTs neste local.,

3.2. Ensaios toxicológicos das amostras de sedimentos do CEP: uma abordagem diferenciada de poluição

Por meio das análises PERMANOVA foi observado efeito significativo sobre as microalgas expostas aos elutriados nos pontos P1 e P3, em tempo de exposição e sobre a densidade celular da microalga *Tetraselmis* sp. (Tabela 4) quando comparado ao controle do teste. Os pontos P1 e P3, mesmo com baixas concentrações individuais (Tabela 1), apresentaram interação significativa entre os tratamentos (i.e., concentração do elutriado). O tempo de exposição indicou que a variabilidade no crescimento populacional entre os tratamentos é tempo dependente (Figura 3; Tabela 2). Essa interação foi mais expressiva entre o controle e a maior concentração testada (80%). Em comparação ao controle a concentração de 80% demonstrou valores significativamente maiores (pseudo-*t* teste, $P(MC) < 0.05$) e menores em 24h e 96h, respectivamente (Fig. 3; Material Suplementar, Tabela S2). No teste de toxicidade do ponto P1, os efeitos observados do elutriado para o crescimento populacional de microalga *Tetraselmis* sp. foram positivos em concentrações de até 60%. Esse padrão não foi consistente no teste de toxicidade do ponto P3. As amostras dos demais locais amostrados (P2, P4 e P5) não apresentaram toxicidade dentro das diluições testadas.

Os ensaios toxicológicos em concentrações menores de 60% não apresentaram efeito dose-resposta nas exposições aos elutriados. Isto pode estar relacionado ao fato de que as microalgas podem absorver e remover poluentes ambientais, como nutrientes (nitrogênio e fosfato) (RUIZ-MARIN; MENDOZA-ESPINOSA; STEPHENSON, 2010), metais pesados (ZHOU et al., 2012) e poluentes orgânicos emergentes (produtos farmacêuticos, pesticidas e hidrocarbonetos poliaromáticos) (GARCÍA-GALÁN et al., 2020; PROSENC et al., 2021). Usando também os nutrientes presentes no meio de cultivo, para o seu crescimento nas primeiras horas de exposição. Contudo, quando o tempo de exposição aos elementos-traço e o DDT é prolongado, o efeito tóxico se torna evidente pela diminuição da densidade celular, quando comparado com o controle.

a)



b)

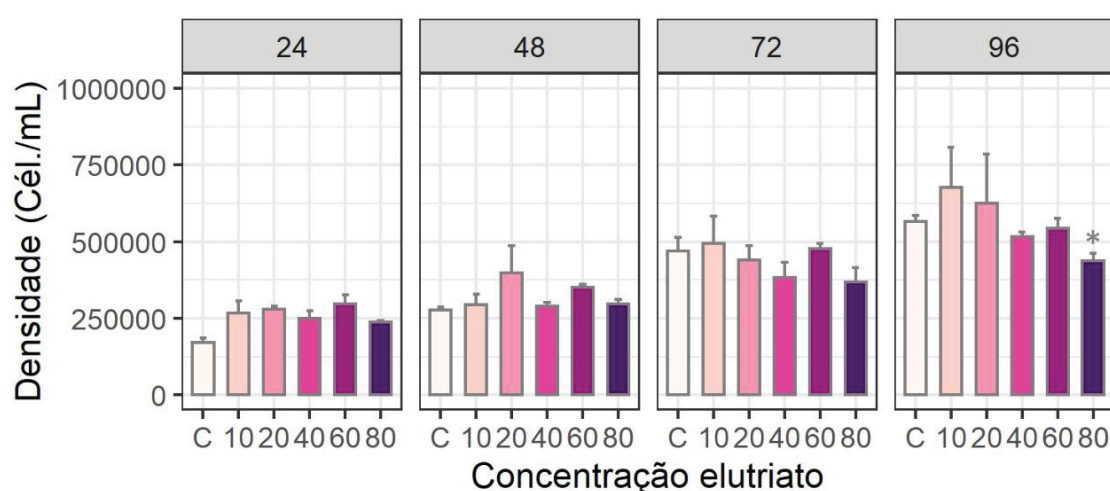


Figura 3. Ensaios de toxicidade crônica dos elutriatos das amostras P1 (a) e P3 (b) empregando a microalga *Tetraselmis* sp. nos tempos de exposição de 24, 48, 72 e 96h. * $P < 0,05$ indica crescimento significativamente menor em comparação ao controle.

Segundo (LEONG; CHANG, 2020) as microalgas consomem alguns elementos-traço, como Cu e Zn, como oligoelementos em processos enzimáticos e no metabolismo celular, mesmo que outros elementos-traço estejam presentes como As, Cd, Cr e Pb e sejam tóxicos para esses organismo. Sun et al. (2015) observou que devido ao fenômeno hormesis, as microalgas quando expostas aos metais pesados, mesmo com baixos efeitos toxicológicos, podem estimular o crescimento e o metabolismo desses organismos. Essa hipótese poderia explicar o crescimento da microalga

Tetraselmis sp. nos menores tempos de exposição de 24 e 48h e também nas menores diluições (10% em 72h e 10 e 20% em 96h) para o ponto P3. Outro ponto importante que pode explicar esse crescimento tanto para o P1 e para o P3 é a recuperação da densidade celular após certo tempo de exposição, o que pode estar associado à maior resiliência dos organismos marinhos (*Tetraselmis* sp.) (ALMEIDA et al., 2021).

Tabela 2. Análise de variância por permutação entre os tratamentos e tempo de exposição da microalga *Tetraselmis* sp. aos elutriatos dos locais P1 e P3. Valores significativos: $P < 0.05$ (*), $P < 0.001$ (**), $P < 0.0001$ (***).

Fonte de variação	gl	P1		P3	
		MQ	Pseudo- <i>F</i>	MQ	Pseudo- <i>F</i>
Tratamento (Tr)	5	0.32226	14.078***	0.1219	3.0177*
Tempo (Te)	3	2.3979	104.75***	2.234	55.306***
Tr x Te	15	6.74E-02	2.9435**	4.60E-02	1.1387
Resíduo	48	2.29E-02		4.04E-02	

Os resultados dos ensaios toxicológicos dos pontos amostrados neste estudo demonstram que, possivelmente, esses pontos P1 e P3 estão recebendo uma maior contribuição antropogênica, devido as atividades antrópicas desenvolvidas nas proximidades das regiões amostradas, conforme resultados apresentados no primeiro tópico anteriormente. Essa abordagem nos apresenta um diagnóstico ambiental muito mais próximo da dinâmica que ocorre nesses ecossistemas, pois a resposta toxicologia observada nos ensaios de exposição considera o efeito da mistura dos contaminantes encontrados no CEP, abordagem que as diretrizes nacionais e internacionais da SQGs não consideram. Apesar de ter sido identificado no ponto P3 maiores concentrações de elementos-traço (As), e no ponto P1 as maiores concentrações de DDT entre os pontos amostrados (Tabela 1), outros contaminantes não rastreados nesse estudo podem estar presentes nessas amostras, e estes quando combinados aos contaminantes quantificados, podem causar efeitos deletérios aos ecossistemas aquáticos, efeito esse que a abordagem individualizada da contaminação química não considera.

A mistura de vários elementos-traço em concentrações inferiores (porém em níveis detectáveis) às estabelecidas pela SQGs no ponto P3 (Fig. 2; Tabela

1), pode ser a explicação para os efeitos toxicológicos encontrados neste estudo. Uma vez que os metais pesados estão em um sistema natural e formam essa mistura complexa, eles se tornam ainda mais tóxicos contra os sistemas biológicos do que quando comparados com suas concentrações individuais (ADNAN et al., 2021; FAUST et al., 1994). A toxicidade em ecossistemas naturais de maneira geral não ocorre a partir de um único tóxico, mas sim devido a exposição a uma mistura complexa de compostos (FİKİRDEŞİCİ; ALTINDAĞ; ÖZDEMİR, 2012; GRILLO et al., 2016). Além disso essas misturas podem se comportar de formas diferentes devido a inúmeros fatores como a quantidade de compostos presentes, a concentração e a especiação de cada elemento, que pode influenciar na interação com os demais, o tempo de exposição dos organismos, a espécie de organismo exposto, a dinâmica do local estudado e outros (ADNAN et al., 2021; FİKİRDEŞİCİ; ALTINDAĞ; ÖZDEMİR, 2012; XU et al., 2011). Adnan et al., (2021) reportou que os resultados toxicológicos para misturas variam quando a mesma mistura é avaliada de forma aguda ou crônica.

Apesar de poucos trabalhos abordarem a toxicologia como uma ferramenta para a avaliação de contaminação no CEP. Rizzi et al., (2017), usou células de peixe para avaliar a citotoxicidade de amostras de peixes do CEP e amostras sedimentares para a realização de análises químicas. Rizzi et al., (2017) também verificou que, embora a análise química dos sedimentos tenha indicado baixos níveis de compostos orgânicos e que não houve evidência de efeitos negativos com base em níveis de orientação, os bioensaios permitiram a detecção de quantidades significativas de compostos citotóxicos e desreguladores endócrinos em sedimentos do CEP, observando que os pontos próximos dos portos de Paranaguá e Antonina mostraram os maiores valores para a citotoxicidade. Além disso, RIZZI et al., (2017) ressalta a importância do uso integrado de ambas as ferramentas químicas e toxicológicas para o reconhecimento de áreas com diferentes graus de impacto e qualidade dos sedimentos. Apesar de empregar níveis de organização distintos, os resultados toxicológicos encontrados por (RIZZI et al., 2017) corroboram com os dados do presente estudo. Outros estudos também encontraram resultados significativos de contaminantes químicos e efeitos toxicológicos no CEP (ANGELI et al., 2020b; CHOUERI et al., 2009;)

Fikirdesici et al (2012) em seu estudo que investigou a toxicidade aguda de misturas de cádmio-arsênico para o microcrustáceo *Daphnia magna* reportou que o Cd foi considerado mais tóxico do que o As, porém a mistura de Cd e As foi considerada mais tóxica do que o Cd sozinho, demonstrando um efeito sinérgico entre esses elementos, tornando-o mais tóxico quando misturados. Por isso, que além da preocupação das ocorrências de níveis de As nos ecossistemas aquáticos como um elemento único, deve se preocupar também com o que ele pode afetar quando em uma mistura com outros contaminantes.

Os pontos P2, P4 e P5 não apresentaram uma resposta toxicológica significativa, sendo que o ponto P5 apresentou-se pristino quando comparado com os outros locais amostrados (Fig 2). Esse resultado pode indicar um local livre de contaminação ou com concentrações muito baixas de poluição, podendo ser usado como um ponto controle para futuros trabalhos realizados no CEP.

Determinar SQGs para um ambiente natural, requer uma avaliação e uma interação multidisciplinar, por isso não é simples a determinação desses indicadores. Porém a utilização de dados toxicológicos e químicos combinados, abrangendo interações complexas podem fornecer respostas mais completas quanto a qualidade ambiental do local estudado, com suas particularidades (RIBA et al., 2004). Apesar de existir vários estudos que contemplem análises químicas no CEP (ANGELI et al., 2020b; ROCHA et al., 2017; SOUZA et al., 2018) e também alguns que avaliaram a toxicidade de áreas do CEP com alguns organismos como ouriço e anfípodos (CHOUERI et al., 2009), peixes (RIZZI et al., 2017), é importante ressaltar que a escolha do organismos em estudo de monitoramentos ambientais precisa refletir a relevância desse organismo para todo o ecossistema aquático. O uso de organismos de base da cadeia alimentar como a microalgas marinhas verdes pode refletir o impacto do funcionamento de grande parte do ecossistema aquático quando correlacionado com dados de contaminantes químicos. Estudos que abordam essa combinação de ferramentas ambientais poderão fornecer dados mais robustos e completos a respeito qualidade ambiental e de monitoramento do CEP e de ecossistemas aquáticos em geral, uma abordagem ainda muito escassa na literatura.

Considerando os parâmetros quantificados e as diretrizes nacionais e internacionais da SQGs apresentados até o momento, os resultados indicam que a área de estudo não apresenta contaminação relevante pelos estressores químicos avaliados. Contudo, os dados toxicológicos para os pontos amostrados P1 e P3 não demonstram a mesma tendência. Os resultados dos ensaios toxicológicos apresentaram respostas importantes pelas microalgas expostas aos elutriados destas amostras de sedimentos coletados no CEP. Os resultados dos ensaios de toxicidade crônica são apresentados na Figura 3.

4. CONCLUSÃO

Os resultados deste estudo demonstraram que os testes de toxicidade são uma importante ferramenta que, quando integrada a outros parâmetros, permitiram a avaliação da qualidade do sedimento através do elutriado e consequentemente da qualidade ambiental, dando uma perspectiva mais ampla e multidisciplinar do que acontece no ambiente estudado. Neste trabalho foi possível comparar dados químicos e toxicológicos de amostras de sedimento superficial no CEP e relacionar esses resultados às características particulares e às influências antrópicas de cada local amostrado, trazendo maior confiabilidade aos dados da qualidade ambiental. Porém, entender e avaliar a interação desses contaminantes como uma mistura complexa nos compartimentos ambientais e como essa mistura pode afetar os ecossistemas é algo que precisa ser mais explorado. Assim, estudos como este mostram a importância de considerar as análises toxicológicas na criação de diretrizes de qualidade ambiental para indicar se um local está contaminado ou não. Essa abordagem considera ainda a particularidade de cada ambiente e como esses ambientes são afetados por inúmeros compostos lançados nesses corpos aquáticos e por isso a importância da avaliação da interação desses compostos como uma mistura e não apenas de forma individual.

REFERÊNCIAS – CAPÍTULO 2

ABNT. **ABNT NBR 12648:2018 - Aquatic ecotoxicology - Chronic toxicity - Test with algae (Chlorophyceae).** [s.l.: s.n.]. Disponível em: <<https://www.abntcatalogo.com.br/norma.aspx?ID=391089>>.

ADNAN, N. A. et al. Comparison of joint effect of acute and chronic toxicity for combined assessment of heavy metals on *Photobacterium* sp.NAA-MIE. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 18, n. 12, 2021.

ALI, H.; KHAN, E.; SAJAD, M. A. Phytoremediation of heavy metals-Concepts and applications. **Chemosphere**, v. 91, n. 7, p. 869–881, 2013.

ALMEIDA, A. C. O. DE et al. Evaluation of toxicity of zinc oxide nanorods on green microalgae of freshwater and marine ecosystems. **Environmental Chemistry and Ecotoxicology**, v. 3, p. 85–90, 2021.

ANGELI, J. L. F. et al. Geochemical mapping in a subtropical estuarine system influenced by large grain-shipping terminals: Insights using Metal/Metal ratios and multivariate analysis. **Environmental Earth Sciences**, v. 79, n. 19, 2020a.

ANGELI, J. L. F. et al. Statistical assessment of background levels for metal contamination from a subtropical estuarine system in the SW Atlantic (Paranaguá Estuarine System, Brazil). **Journal of Sedimentary Environments**, v. 5, n. 1, p. 137–150, 2020b.

BAI, J. et al. Arsenic and heavy metal pollution in wetland soils from tidal freshwater and salt marshes before and after the flow-sediment regulation regime in the Yellow River Delta, China. **Journal of Hydrology**, v. 450–451, p. 244–253, 2012.

BARLETTA, M.; LIMA, A. R. A.; COSTA, M. F. Distribution, sources and consequences of nutrients, persistent organic pollutants, metals and microplastics in South American estuaries. **Science of the Total Environment**, v. 651, p. 1199–1218, 2019.

BETTINETTI, R.; GIAREI, C.; PROVINI, A. Chemical analysis and sediment toxicity bioassays to assess the contamination of the River Lambro (Northern Italy). **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 45, n. 1, p. 72–78, 2003.

BOOIJ, P. et al. Toxic pressure of herbicides on microalgae in Dutch estuarine and coastal waters. **Journal of Sea Research**, v. 102, p. 48–56, 2015.

BUCHMAN, M. F. NOAA Screening Quick Reference. p. 12, 2008.

BURTON, G. A.; JOHNSTON, E. L. Assessing contaminated sediments in the context of multiple stressors. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 29, n. 12, p. 2625–2643, 2010.

CAMARGO, M. G. DE. SYSGRAN: UM SISTEMA DE CÓDIGO ABERTO PARA ANÁLISES GRANULOMÉTRICAS DO SEDIMENTO. **Revista Brasileira de Geociências**, v. 36, n. 2, p. 371–378, 2006.

CARDOSO, F. D.; DAUNER, A. L. L.; MARTINS, C. C. A critical and comparative appraisal of polycyclic aromatic hydrocarbons in sediments and suspended particulate material from a large South American subtropical estuary. **Environmental Pollution**, v. 214, p. 219–229, 2016.

CHAPMAN, P. M. et al. Appropriate applications of sediment quality values for metals and metalloids. **Environmental Science and Technology**, v. 33, n. 22, p. 3937–3941, 1999.

CHAPMAN, R. L. Algae: The world's most important "plants"-an introduction. **Mitigation and Adaptation Strategies for Global Change**, v. 18, n. 1, p. 5–12, 2013.

CHOUERI, R. B. et al. Integrated sediment quality assessment in Paranaguá Estuarine System, Southern Brazil. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 72, n. 7, p. 1824–1831, 2009.

CHOUVELON, T. et al. Chemical contaminants (trace metals, persistent organic pollutants) in albacore tuna from western Indian and south-eastern Atlantic Oceans: Trophic influence and potential as tracers of populations. **Science of the Total Environment**, v. 596–597, p. 481–495, 2017.

CONAMA. National Environment Council. General Guidelines for evaluation of the material to be dredged in Brazilian waters. 2012.

FAUST, M. et al. Algal toxicity of binary combinations of pesticides. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 53, n. 1, p. 134–141, 1994.

FERNANDES, L. et al. Accumulation of sediment, organic matter and trace metals with space and time, in a creek along Mumbai coast, India. **Estuarine, Coastal and Shelf Science**, v. 91, n. 3, p. 388–399, 2011.

FİKİRDEŞİCİ, Ş.; ALTINDAĞ, A.; ÖZDEMİR, E. Investigation of acute toxicity of cadmium-arsenic mixtures to *Daphnia magna* with toxic units approach. **TÜBİTAK**, v. 36, n. 4, p. 543–550, 2012.

GALLO, A. et al. Species-specific sensitivity of three microalgae to sediment elutriates. **Marine Environmental Research**, v. 156, n. October 2019, p. 104901, 2020.

GARCÍA-GALÁN, M. J. et al. Microalgae-based bioremediation of water contaminated by pesticides in peri-urban agricultural areas. **Environmental Pollution**, v. 265, 2020.

GAUTHIER, L. et al. Metabolome response to anthropogenic contamination on microalgae: a review. **Metabolomics**, v. 16, n. 1, p. 1–13, 2020.

GOH, B. H. H. et al. Sustainability of direct biodiesel synthesis from microalgae biomass: A critical review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 107, n. February, p. 59–74, 2019.

GRILLO, C. A. et al. Degradation of bioabsorbable Mg-based alloys: Assessment of the effects of insoluble corrosion products and joint effects of alloying components on mammalian cells. **Materials Science & Engineering**

C, v. 58, p. 372–380, 2016.

HAN, D.; CURRELL, M. J. Persistent organic pollutants in China's surface water systems. **Science of the Total Environment**, v. 580, p. 602–625, 2017.

HUND-RINKE, K. et al. Grouping concept for metal and metal oxide nanomaterials with regard to their ecotoxicological effects on algae, daphnids and fish embryos. **NanoImpact**, v. 9, n. October 2017, p. 52–60, 2018.

ISLAM, S. et al. Arsenic accumulation in rice: Consequences of rice genotypes and management practices to reduce human health risk. **Environment International**, v. 96, p. 139–155, 2016.

KANU, I.; ACHI, O. . Industrial Effluents and Their Impact on Water Quality of Receiving Rivers in Nigeria. **Journal of applied technology in Environmental Sanitation**, v. 1, p. 75–86, 2011.

LAKSHMANASENTHIL, S. et al. Harmful metals concentration in sediments and fishes of biologically important estuary, Bay of Bengal. **Journal of Environmental Health Science and Engineering**, v. 11, n. 1, p. 1–7, 2013.

LAMOUR, M. R.; ANGULO, R. J.; SOARES, C. R. Bathymetrical Evolution of Critical Shoaling Sectors on Galheta Channel, Navigable Access to Paranaguá Bay, Brazil. **Journal of Coastal Research**, v. 231, n. 231, p. 49–58, 2007.

LAMOUR, M. R.; SOARES, C. R.; CARRILHO, J. C. Mapas dos parâmetros texturais de sedimentos de fundo do Complexo Estuarino de Paranaguá - PR. **Boletim Paranaense de Geosciencias**, n. 55, p. 77–82, 2004.

LANA, P. C. et al. The Subtropical Estuarine Complex of Paranaguá Bay, Brazil. **Ecological Studies**, v. 144, p. 131–145, 2001.

LEAL, P. P. et al. Copper ecotoxicology of marine algae: a methodological appraisal. **Chemistry and Ecology**, v. 32, n. 8, p. 786–800, 2016.

LEONG, Y. K.; CHANG, J. S. Bioremediation of heavy metals using microalgae: Recent advances and mechanisms. **Bioresource Technology**, v. 303, n. January, p. 122886, 2020.

LEVY, J. L.; STAUBER, J. L.; JOLLEY, D. F. Sensitivity of marine microalgae to copper: The effect of biotic factors on copper adsorption and toxicity. **Science of the Total Environment**, v. 387, n. 1–3, p. 141–154, 2007.

LIEBEZEIT, G. et al. DDT in biota of Paranaguá Bay, Southern Brazil: Recent input and rapid degradation. **Water, Air, and Soil Pollution**, v. 220, n. 1–4, p. 181–188, 2011.

LIU, F. et al. Distribution and transportation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) at the Humen river mouth in the Pearl River delta and their influencing factors. **Marine Pollution Bulletin**, v. 84, n. 1–2, p. 401–410, 2014.

LONG, E. R. et al. Incidence of adverse biological effects within ranges of chemical concentrations in marine and estuarine sediments. **Environmental Management**, v. 19, n. 1, p. 81–97, 1995.

LORING, D. H.; RANTALA, R. T. T. Manual for the geochemical analyses of marine sediments and suspended particulate matter. **Earth Science Reviews**, v. 32, n. 4, p. 235–283, 1992.

LUO, X. J. et al. Polycyclic aromatic hydrocarbons in suspended particulate matter and sediments from the Pearl River Estuary and adjacent coastal areas, China. **Environmental Pollution**, v. 139, n. 1, p. 9–20, 2006.

MARTINS, C. C. et al. Anthropogenic organic matter inputs indicated by sedimentary fecal steroids in a large South American tropical estuary (Paranaguá estuarine system, Brazil). **Marine Pollution Bulletin**, v. 60, n. 11, p. 2137–2143, 2010.

MAYERLE, R. et al. A case study of sediment transport in the Paranaguá Estuary Complex in Brazil. **Ocean Engineering**, v. 106, p. 161–174, 2015.

MCLUSKY, D. S.; ELLIOTT, M. Transitional waters: A new approach, semantics or just muddying the waters? **Estuarine, Coastal and Shelf Science**, v. 71, n. 3–4, p. 359–363, 2007.

MORRONI, L. et al. Integrated characterization and risk management of marine sediments: The case study of the industrialized Bagnoli area (Naples, Italy). **Marine Environmental Research**, v. 160, n. December 2019, p. 104984, 2020.

MUCHA, A. P.; VASCONCELOS, M. T. S. D.; BORDALO, A. A. Macrobenthic community in the Douro estuary: Relations with trace metals and natural sediment characteristics. **Environmental Pollution**, v. 121, n. 2, p. 169–180, 2003.

NICHOLS, W. J.; SEMINOFF, J. A.; ETNOYER, P. **Handbook of Marine Fisheries Conservation and Management**. [s.l.] Oxford University Press, 2010.

PELUSI, A. et al. Effects of elutriates from contaminated coastal sediments on different life cycle phases of planktonic diatoms. **Marine Environmental Research**, v. 155, n. January, p. 104890, 2020.

POSSATTO, F. E. et al. Marine debris in a World Heritage Listed Brazilian estuary. **Marine Pollution Bulletin**, v. 91, n. 2, p. 548–553, 2015.

PROSENC, F. et al. Microalgae-based removal of contaminants of emerging concern: Mechanisms in *Chlorella vulgaris* and mixed algal-bacterial cultures. **Journal of Hazardous Materials**, v. 418, n. May, 2021.

RIBA, I. et al. Sediment quality in the Atlantic Coast of Spain. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 23, n. 2, p. 271–282, 2004.

RIZZI, J. et al. Characterization of quality of sediments from Paranaguá Bay (Brazil) by combined in vitro bioassays and chemical analyses. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 36, n. 7, p. 1811–1819, 2017.

ROCHA, M. L. DA et al. Metals impact into the Paranaguá Estuarine Complex (Brazil) during the exceptional flood of 2011. **Brazilian Journal of Oceanography**, v. 65, n. 1, p. 54–68, 2017.

RUIZ-MARIN, A.; MENDOZA-ESPINOSA, L. G.; STEPHENSON, T. Growth and nutrient removal in free and immobilized green algae in batch and semi-continuous cultures treating real wastewater. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 1, p. 58–64, 2010.

SANTOS, D. M. et al. Organotin compounds in the Paranaguá Estuarine Complex, Paraná, Brazil: Evaluation of biological effects, surface sediment, and suspended particulate matter. **Marine Pollution Bulletin**, v. 58, n. 12, p. 1922–1926, 2009.

SELVAKUMAR, S.; CHANDRASEKAR, N.; KUMAR, G. Hydrogeochemical characteristics and groundwater contamination in the rapid urban development areas of Coimbatore, India. **Water Resources and Industry**, v. 17, n. December 2016, p. 26–33, 2017.

SODANGO, T. H. et al. Review of the Spatial Distribution, Source and Extent of Heavy Metal Pollution of Soil in China: Impacts and Mitigation Approaches. **Journal of Health & Pollution**, v. 8, n. 17, 2018.

SOUZA, A. C. et al. Occurrence of halogenated organic contaminants in estuarine sediments from a biosphere reserve in Southern Atlantic. **Marine Pollution Bulletin**, v. 133, n. May, p. 436–441, 2018.

SOUZA, I. S. et al. Using an integrated approach to assess the sediment quality of an estuary from the semi-arid coast of Brazil. **Marine Pollution Bulletin**, v. 104, n. 1–2, p. 70–82, 2016.

SRINIVASA REDDY, M. et al. Seasonal distribution and contamination levels of total PHCs, PAHs and heavy metals in coastal waters of the Alang-Sosiya ship scrapping yard, Gulf of Cambay, India. **Chemosphere**, v. 61, n. 11, p. 1587–1593, 2005.

SUMAN, T. Y.; RADHIKA RAJASREE, S. R.; KIRUBAGARAN, R. Evaluation of zinc oxide nanoparticles toxicity on marine algae *Chlorella vulgaris* through flow cytometric, cytotoxicity and oxidative stress analysis. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 113, p. 23–30, 2015.

SUN, J. et al. Microstructures and functional groups of *Nannochloropsis* sp. cells with arsenic adsorption and lipid accumulation. **Bioresource Technology**, v. 194, p. 305–311, 2015.

UNEP. UNEP Determination of petroleum hydrocarbons in sediments. **Reference Methods For Marine Pollution Studies**, v. 17, n. 20, 1992.

USEPA. Method 3050B. Acid Digestion of Sediments, Sludges, and Soils. n. December, p. 1–12, 1996.

USESE, A. et al. Enrichment, contamination and geo-accumulation factors for assessing arsenic contamination in sediment of a Tropical Open Lagoon, Southwest Nigeria. **Environmental Technology & Innovation**, v. 8, p. 126–131, 2017.

VALER, R.M & GLOCK, L. Quantificação de algas clorofíceas de interesse ecotoxicológico através do método espectrofotométrico. **Acta Limnol. Bras.**, v.

11, n. 2, p. 149–156, 1999.

VAN, T. N. et al. Arsenic and Heavy Metal Contamination in Soils under Different Land Use in an Estuary in. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 13, p. 2–13, 2016.

VERREAULT, J. et al. Changes in prolactin in a highly organohalogen contaminated Arctic top predator seabird, the glaucous gull. **General and Comparative Endocrinology**, v. 156, n. 3, p. 569–576, 2008.

VOLPI GHIRARDINI, A.; ARIZZI NOVELLI, A.; TAGLIAPIETRA, D. Sediment toxicity assessment in the Lagoon of Venice (Italy) using *Paracentrotus lividus* (Echinodermata: Echinoidea) fertilization and embryo bioassays. **Environment International**, v. 31, n. 7 SPEC. ISS., p. 1065–1077, 2005.

WANG, D. et al. Historical deposition behaviors of PAHs in the Yangtze River Estuary: Role of the sources and water currents. **Chemosphere**, v. 90, n. 6, p. 2020–2026, 2013.

XU, X. et al. Assessment of toxic interactions of heavy metals in multi-component mixtures using sea urchin embryo-larval bioassay. **Toxicology in Vitro**, v. 25, n. 1, p. 294–300, 2011.

ZHOU, G. J. et al. Biosorption of zinc and copper from aqueous solutions by two freshwater green microalgae *Chlorella pyrenoidosa* and *Scenedesmus obliquus*. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 19, n. 7, p. 2918–2929, 2012.

7. ANEXO CAPÍTULO 2 – MATERIAL SUPLEMENTAR

AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DO SEDIMENTO DA BAÍA DE PARANAGUÁ SOBRE MICROALGAS VERDES E CORRELAÇÃO COM NÍVEIS DE CONTAMINAÇÃO E AS ATIVIDADES ANTRÓPICAS LOCAIS

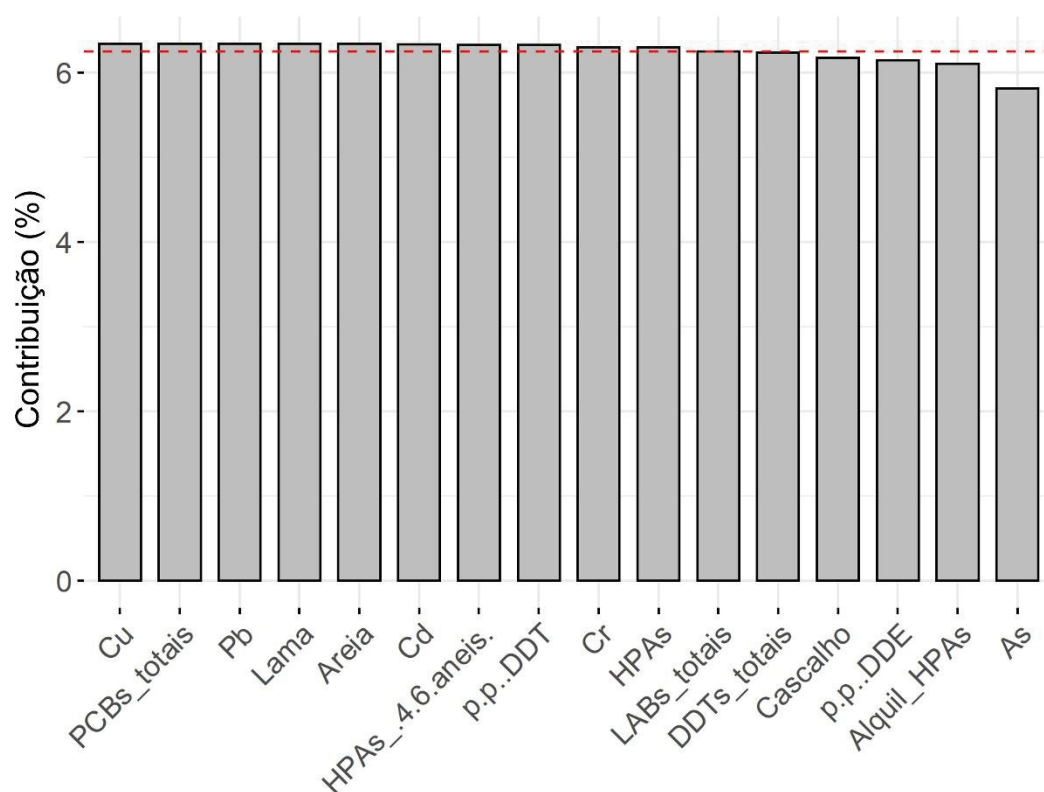


Figura S1. Avaliação das variáveis que mais contribuíram na formação dos dois primeiros componentes da PCA. A linha de referência (tracejada vermelha) corresponde ao valor esperado se a contribuição for uniforme.

Tabela S1. Valores mensurados para as variáveis granulométricas (%), Orgânicos (ng/g) e elementos-traço (mg/kg) no sedimento dos pontos amostrais no CEP.

Variáveis		Pontos				
		P1	P2	P3	P4	P5
Granulometria	Cascalho	0.00	0.00	0.00	0.00	0.06
	Areia	47.84	17.13	4.82	0.95	85.89
	Silt	35.28	61.40	65.27	53.74	10.99
	Argila	16.89	21.47	29.91	45.31	3.06
Orgânicos	HPAs	38.80	36.80	46.90	48.30	3.21
	Alquil_HPAs	12.50	15.80	21.60	23.50	2.52
	HPAs_(2-3 anéis)	3.99	4.07	6.10	4.84	0.69
	HPAs_(4-6 anéis)	22.30	17.00	19.30	20.00	0.00
	PCBs_Totais	0.40	0.64	0.73	0.75	0.00
	LABs_Totais	17.30	6.92	8.53	6.53	0.00
	p,p'-DDE	0.47	0.43	0.65	0.59	0.00
	o,p'-DDD	0.17	0.17	0.25	0.37	0.00
	p,p'-DDD	0.29	0.17	0.23	0.32	0.00
	p,p'-DDT	1.23	0.00	0.00	0.00	0.00
Metais/As	As	5.08	8.39	7.60	7.55	3.12
	Cd	0.38	0.58	0.66	0.66	0.18
	Cr	20.93	35.71	37.44	41.30	11.13
	Cu	7.04	11.45	12.87	13.13	2.65
	Ni	8.55	15.05	14.53	16.44	4.26
	Pb	7.25	12.31	13.87	14.01	3.92
	Zn	36.51	52.39	53.34	57.25	18.28

Tabela S2. Resultados das análises pareadas por permutação (pseudo-*t* teste) entre as diferentes concentrações e tempos de exposição da microalga marinha *Tetraselmis* sp. ao elutriato dos sedimentos dos sites P1 e P3. Valores significativos: $P(MC) < 0.05$ (*), $P(MC) < 0.001$ (**), $P(MC) < 0.0001$ (**).

Fonte de variação	P1				P3			
	24h	48h	72h	96h	24h	48h	72h	96.00
C, 10	1.23	2.30	4.28*	3.18*	2.67	0.33	0.11	0.66
C, 20	4.81*	2.53	2.60	3.84*	5.31*	1.34	0.48	0.15
C, 40	4.68**	3.93*	2.24	2.07	3.06*	0.58	1.32	2.13
C, 60	6.40**	1.42	3.21*	2.51	4.34*	4.59*	0.21	0.69
C, 80	4.03*	2.11	1.15	2.88*	3.88*	0.99	1.56	4.17*
10, 20	3.93	1.25	0.60	2.20	0.39	1.04	0.42	0.32
10, 40	3.62*	0.99	1.66	0.85	0.32	0.04	0.99	1.11
10, 60	5.58**	0.37	3.23*	0.17	0.68	1.49	0.01	0.85
10, 80	3.15*	0.51	5.81**	4.26*	0.69	0.16	1.15	1.86
20, 40	1.60	0.68	0.64	0.73	1.10	1.18	0.84	0.54
20, 60	0.10	1.44	0.61	1.91	0.56	0.35	0.81	0.34
20, 80	0.40	1.59	2.23	4.95**	3.43*	1.06	1.07	1.22
40, 60	3.30*	1.26	0.25	0.72	1.26	3.20*	1.81	0.71
40, 80	0.90	1.66	1.79	3.52*	0.47	0.37	0.22	2.65
60, 80	0.42	0.04	4.72*	4.01*	2.18	2.72	2.10	2.67

8. SUMÁRIO DE RESULTADOS E CONCLUSÃO GERAL

Nessa dissertação, foi realizada a calibração de um método espectrofotométrico para a realização de leituras de densidade celular de duas microalgas verdes. Esse método foi posteriormente utilizado para as leituras das densidades celulares da microalga marinha *Tetraselmis* sp, utilizada para avaliar a toxicidade das amostras de sedimento do Complexo Estuarino de Paranaguá (CEP) e correlacionar seus resultados com possíveis mudanças de origem antrópica no ecossistema local. Para isso apresentamos os resultados em dois capítulos.

O primeiro capítulo apresentou a validação de um método para a quantificação das microalgas *D. subspicatus* e *Tetraselmis* sp, em termos de densidade celular (cell/mL). Os resultados observados no capítulo 1 validam a Hipótese 1 desta pesquisa, pois mostraram que ambas as microalgas verdes testadas demonstraram correlação linear satisfatória entre o comprimento de onda e a densidade celular corroborada por análise estatística apropriada, indicando que a calibração é confiável, além de ser rápida e de fácil reprodução para aplicação na determinação da densidade celular de microalgas em controle de cultivos e em testes ecotoxicológicos.

Para o capítulo foram realizadas análises toxicológicas expondo a microalga marinha *Tetraselmis* sp ao elutriado das amostras de sedimento do CEP. Os resultados dos parâmetros quantitativos dos estressores químicos (elementos-traço e compostos orgânicos) atenderam os requisitos das diretrizes de qualidade de sedimentos (SQGs). Todavia, os resultados dos ensaios de toxicidade demonstraram que amostras de sedimento dos pontos P1 e P3 apresentaram efeito tóxico à microalga *Tetraselmis* sp. após 96h de exposição. Esses resultados permitem validar a Hipótese 2 desta pesquisa, uma vez que foi possível identificar efeito tóxico sobre as microalgas expostas as amostras de sedimentos. Os resultados observados no presente estudo trazem um alerta sobre o potencial efeito sinérgico que a mistura de contaminantes pode causar a ecossistemas aquáticos expostos, mesmo em concentrações que não apresentem risco conforme estabelecido pelas regulamentações ambientais.

A Hipótese 3 da pesquisa pode ser validada parcialmente, uma vez que os pontos identificados com presença de toxicidade apresentaram-se próximos de regiões com influência antrópica intensa, contudo as concentrações dos estressores químicos não se demonstraram acima das diretrizes vigentes norteadores da qualidade do sedimento. Esta observação acende um alerta para os tomadores de decisão que muitas vezes ainda se baseiam em valores únicos dos elementos para indicar se um local está potencialmente contaminado ou não. A abordagem apresentada neste estudo de integração de valores químicos e toxicológicos nos estudos de monitoramento ambientais permite que cientistas ambientais utilizem ferramentas de investigação mais confiáveis e rápidas, e produzam resultados mais próximos da realidade sobre a qualidade dos sedimentos e a atual condição ambiental.

8.1 Recomendações

O presente trabalho traz um alerta sobre o potencial efeito sinérgico dos contaminantes e da importância do uso de ensaios toxicológicos combinados à parâmetros químicos, principalmente quando esses estudos são usados por tomadores de decisão para fins de regulamentações nacionais e internacionais. Contudo, algumas recomendações se fazem necessárias ao final desse estudo para direcionar os próximos passos da pesquisa nessa área. Diante dos resultados e conclusões apresentados, recomenda-se:

- um monitoramento mais amplo, realizando mais amostragens em mais pontos da malha amostral e um maior número de réplicas para os testes toxicológicos para termos um poder analítico maior com análises mais robustas.
- Neste sentido, recomenda-se ainda um monitoramento em longo prazo, realizando amostragens periódicas a fim de traçar um perfil de condições ambientais de contaminação da região.
- Realizar testes toxicológicos empregando outros níveis tróficos e diferentes organismos a fim de identificar os níveis de estresse ao qual

estão expostos visto que diferentes espécies podem responder de forma distinta quando expostas a um mesmo contaminante.

- Realizar análises de outros estressores químicos além dos investigados nesta pesquisa, para aprofundar o entendimento da contaminação química das amostras de sedimento.

9. REFERÊNCIAS DA DISSERTAÇÃO

ABNT. **ABNT NBR 12648:2018 - Aquatic ecotoxicology - Chronic toxicity - Test with algae (Chlorophyceae).** [s.l.: s.n.]. Disponível em: <<https://www.abntcatalogo.com.br/norma.aspx?ID=391089>>.

ABNT 16181. **ABNT NBR 16181:2013 - Aquatic ecotoxicology — Chronic toxicity — Test with marine microalgae.** [s.l.: s.n.]. Disponível em: <Subst?ncia qu?mica>.

ADAMS, J. B. Examen des méthodes et des cadres utilisés pour déterminer les besoins environnementaux en eau des estuaires. **Hydrological Sciences Journal**, v. 59, n. 3–4, p. 451–465, 2014.

ADNAN, N. A. et al. Comparison of joint effect of acute and chronic toxicity for combined assessment of heavy metals on *Photobacterium* sp.NAA-MIE. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 18, n. 12, 2021.

ANDERSON, M.J., GORLEY, R.N., CLARKE, K.R.. **PERMANOVA+ for PRIMER: Guide to Software and Statistical Methods.** Primer-E Ltd., The University of Auckland. 214 pp, 2008.

ALI, H.; KHAN, E.; SAJAD, M. A. Phytoremediation of heavy metals-Concepts and applications. **Chemosphere**, v. 91, n. 7, p. 869–881, 2013.

ALMEIDA, A. C. O. DE et al. Evaluation of toxicity of zinc oxide nanorods on green microalgae of freshwater and marine ecosystems. **Environmental Chemistry and Ecotoxicology**, v. 3, p. 85–90, 2021.

ALTENBURGER, R.; NENDZA, M.; SCHÜÜRMAN, G. Mixture toxicity and its modeling by quantitative structure-activity relationships. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 22, n. 8, p. 1900–1915, 2003.

ALTENBURGER, R.; WALTER, H.; GROTE, M. What contributes to the combined effect of a complex mixture? **Environmental Science and Technology**, v. 38, n. 23, p. 6353–6362, 2004.

AMIN, O. A.; COMOGLIO, L. I.; SERICANO, J. L. Polynuclear aromatic and chlorinated hydrocarbons in mussels from the coastal zone of Ushuaia, Tierra del Fuego, Argentina. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 30, n. 3, p. 521–529, 2011.

ANGELI, J. L. F. et al. Arsenic and other trace elements in two catfish species from Paranaguá Estuarine Complex, Paraná, Brazil. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 185, n. 10, p. 8333–8342, 2013.

ANGELI, J. L. F. et al. Geochemical mapping in a subtropical estuarine system

influenced by large grain-shipping terminals: Insights using Metal/Metal ratios and multivariate analysis. **Environmental Earth Sciences**, v. 79, n. 19, 2020a.

ANGELI, J. L. F. et al. Statistical assessment of background levels for metal contamination from a subtropical estuarine system in the SW Atlantic (Paranaguá Estuarine System, Brazil). **Journal of Sedimentary Environments**, v. 5, n. 1, p. 137–150, 2020b.

ARIEDE, M. B. et al. Cosmetic attributes of algae - A review. **Algal Research**, v. 25, n. July, p. 483–487, 2017.

ARORA, M. et al. Heavy metal accumulation in vegetables irrigated with water from different sources. **Food Chemistry**, v. 111, n. 4, p. 811–815, 2008.

ASHRAF, M. A. Persistent organic pollutants (POPs): a global issue, a global challenge. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 24, n. 5, p. 4223–4227, 2017.

ASLAN, J. F.; PINTO, A. E. M.; DE OLIVEIRA, M. M. Poluição Do Meio Ambiente Marinho: Um Breve Panorama Dos Princípios, Instrumentos Jurídicos E Legislação Brasileira. **Planeta Amazônia: Revista Internacional de Direito Ambiental e Políticas Públicas**, n. 9, p. 175–186, 2017.

ATSDR. Guidance for the Preparation of an Interaction Profile. **U.S. Department of Health and Human Services**, n. February, 2001.

AUTHMAN, M. M. Use of Fish as Bio-indicator of the Effects of Heavy Metals Pollution. **Journal of Aquaculture Research & Development**, v. 06, n. 04, 2015.

BACCHETTA, C. et al. Combined toxicological effects of pesticides: A fish multi-biomarker approach. **Ecological Indicators**, v. 36, p. 532–538, 2014.

BAI, J. et al. Arsenic and heavy metal pollution in wetland soils from tidal freshwater and salt marshes before and after the flow-sediment regulation regime in the Yellow River Delta , China. **Journal of Hydrology**, v. 450–451, p. 244–253, 2012.

BARLETTA, M.; LIMA, A. R. A.; COSTA, M. F. Distribution, sources and consequences of nutrients, persistent organic pollutants, metals and microplastics in South American estuaries. **Science of the Total Environment**, v. 651, p. 1199–1218, 2019.

BERBEL, G. B. B.; FAVARO, D. I. T.; BRAGA, E. S. Impact of harbour, industry and sewage on the phosphorus geochemistry of a subtropical estuary in Brazil. **Marine Pollution Bulletin**, v. 93, n. 1–2, p. 44–52, 2015.

BETTINETTI, R.; GIAREI, C.; PROVINI, A. Chemical analysis and sediment

toxicity bioassays to assess the contamination of the River Lambro (Northern Italy). **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 45, n. 1, p. 72–78, 2003.

BÍCEGO, M.C., TANIGUCHI, S., YOGUI, G.T., MONTONE, R.C., SILVA, D.A.M. DA, LOURENÇO, R.A., MARTINS, C.C., SASAKI, S.T., PELLIZARI, V.H., WEBER, R.R., 2006. Assessment of contamination by polychlorinated biphenyls and aliphatic and aromatic hydrocarbons in sediments of the Santos and São Vicente Estuary System, São Paulo, Brazil. **Marine Pollution Bulletin**, v. 52, p. 1804–1816, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2006.09.010>.

BHUVANA, P. et al. Spectral characterization of bioactive compounds from microalgae: *N. Oculata* and *C. Vulgaris*. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 19, n. April, p. 101094, 2019.

BLISS, C. I. the Toxicity of Poisons Applied Jointly. **Annals of Applied Biology**, v. 26, n. 3, p. 585–615, 1939.

BOOIJ, P. et al. Toxic pressure of herbicides on microalgae in Dutch estuarine and coastal waters. **Journal of Sea Research**, v. 102, p. 48–56, 2015.

BORGES MENEZES, R. P.; DE SOUZA ANTUNES, A. M. Using the WTO/TBT enquiry point to monitor tendencies in the regulation of environment, health, and safety issues affecting the chemical industry. **Environment International**, v. 31, n. 3, p. 407–416, 2005.

BOROS, B. V.; OSTAFE, V. Evaluation of ecotoxicology assessment methods of nanomaterials and their effects. **Nanomaterials**, v. 10, n. 4, 2020.

BOTTÉ, S. E.; FREIJE, R. H.; MARCOVECCHIO, J. E. Distribution of several heavy metals in tidal flats sediments within bahía blanca estuary (Argentina). **Water, Air, and Soil Pollution**, v. 210, n. 1–4, p. 371–388, 2010.

BREIVIK, K. et al. Atmospheric emissions of some POPs in Europe: a discussion of existing inventories and data needs. **Environmental Science and Policy**, v. 9, n. 7–8, p. 663–674, 2006.

BRICAUD, A.; BÉDHOMME, A.-L.; MOREL, A. Optical properties of diverse phytoplanktonic species: experimental results and theoretical interpretation. **Journal of Plankton Research**, v. 10, p. 857–873, 1988.

BUCHMAN, M. F. NOAA Screening Quick Reference. p. 12, 2008.

BURTON, G. A.; JOHNSTON, E. L. Assessing contaminated sediments in the context of multiple stressors. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 29, n. 12, p. 2625–2643, 2010.

CAMARGO, M. G. DE. SYSGRAN: UM SISTEMA DE CÓDIGO ABERTO

PARA ANÁLISES GRANULOMÉTRICAS DO SEDIMENTO. **Revista Brasileira de Geociências**, v. 36, n. 2, p. 371–378, 2006.

CAMPANELLA, L. et al. Trace metals in seagrass, algae and molluscs from an uncontaminated area in the Mediterranean. **Environmental Pollution**, v. 111, n. 1, p. 117–126, 2001.

CARDOSO, F. D.; DAUNER, A. L. L.; MARTINS, C. C. A critical and comparative appraisal of polycyclic aromatic hydrocarbons in sediments and suspended particulate material from a large South American subtropical estuary. **Environmental Pollution**, v. 214, p. 219–229, 2016.

CARSON, R. **Silent Spring**. [s.l.: s.n.]. v. 43

CESAR, A. et al. Comparative sediment quality assessment in different littoral ecosystems from Spain (Gulf of Cadiz) and Brazil (Santos and São Vicente estuarine system). **Environment International**, v. 33, n. 4, p. 429–435, 2007.

CHAPMAN, P. M. et al. Appropriate applications of sediment quality values for metals and metalloids. **Environmental Science and Technology**, v. 33, n. 22, p. 3937–3941, 1999.

CHAPMAN, R. L. Algae: The world's most important “plants”-an introduction. **Mitigation and Adaptation Strategies for Global Change**, v. 18, n. 1, p. 5–12, 2013.

CHISTI, Y. Biodiesel from microalgae beats bioethanol. **Trends in Biotechnology**, v. 26, n. 3, p. 126–131, 2008.

CHOUERI, R. B. et al. Integrated sediment quality assessment in Paranaguá Estuarine System, Southern Brazil. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 72, n. 7, p. 1824–1831, 2009.

CHOUVELON, T. et al. Chemical contaminants (trace metals, persistent organic pollutants) in albacore tuna from western Indian and south-eastern Atlantic Oceans: Trophic influence and potential as tracers of populations. **Science of the Total Environment**, v. 596–597, p. 481–495, 2017.

CHU, W. L. et al. Heavy metal pollution in Antarctica and its potential impacts on algae. **Polar Science**, v. 20, p. 75–83, 2019.

CONAMA. National Environment Council. General Guidelines for evaluation of the material to be dredged in Brazilian waters. 2012.

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

DA SILVA, A. M. F. et al. Organochlorines and polychlorinated biphenyl environmental pollution in south coast of Rio De Janeiro state. **Marine**

Pollution Bulletin, v. 108, n. 1–2, p. 325–331, 2016.

DANKOWSKA, A.; DOMAGAŁA, A.; KOWALEWSKI, W. Quantification of *Coffea arabica* and *Coffea canephora* var. *robusta* concentration in blends by means of synchronous fluorescence and UV-Vis spectroscopies. **Talanta**, v. 172, n. January, p. 215–220, 2017.

DAVARPANA, E.; GUILHERMINO, L. Single and combined effects of microplastics and copper on the population growth of the marine microalgae *Tetraselmis chuii*. **Estuarine, Coastal and Shelf Science**, v. 167, p. 269–275, 2015.

DAVARPANA, E.; GUILHERMINO, L. Are gold nanoparticles and microplastics mixtures more toxic to the marine microalgae *Tetraselmis chuii* than the substances individually? **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 181, n. January, p. 60–68, 2019.

DEBELIUS, B. et al. Toxicity and bioaccumulation of copper and lead in five marine microalgae. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 72, n. 5, p. 1503–1513, 2009.

DOMINGOS, R. F. et al. Metals in the Aquatic Environment—Interactions and Implications for the Speciation and Bioavailability: A Critical Overview. **Aquatic Geochemistry**, v. 21, n. 2–4, p. 231–257, 2015.

DOONG, R. AN et al. Characterization and composition of heavy metals and persistent organic pollutants in water and estuarine sediments from Gao-ping River, Taiwan. **Marine Pollution Bulletin**, v. 57, n. 6–12, p. 846–857, 2008.

DURANTE, C. A. et al. POPs in the South Latin America: Bioaccumulation of DDT, PCB, HCB, HCH and Mirex in blubber of common dolphin (*Delphinus delphis*) and Fraser's dolphin (*Lagenodelphis hosei*) from Argentina. **Science of the Total Environment**, v. 572, p. 352–360, 2016.

DURUIBE, J. O.; OGWUEGBU, M. O. C.; EGWURUGWU, J. N. Heavy metal pollution and human biotoxic effects. **International Journal of Physical Sciences**, v. 2, n. 5, p. 112–118, 2007.

EBERT, I. et al. Toxicity of the fluoroquinolone antibiotics enrofloxacin and ciprofloxacin to photoautotrophic aquatic organisms. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 30, n. 12, p. 2786–2792, 2011.

EDWARDS, M.; BEŁDOWSKI, J. Chemical munitions dumped at sea. **Deep-Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography**, v. 128, p. 1–3, 2016.

EQANI, S. A. M. A. S. et al. Uptake of organochlorine pesticides (OCPs) and polychlorinated biphenyls (PCBs) by river water fish: The case of River Chenab.

Science of the Total Environment, v. 450–451, p. 83–91, 2013.

EQANI, S. A. M. A. S.; MALIK, R. N.; MOHAMMAD, A. The level and distribution of selected organochlorine pesticides in sediments from River Chenab, Pakistan. **Environmental Geochemistry and Health**, v. 33, n. 1, p. 33–47, 2011.

EROGLU, A. et al. Effects of heavy metals (Cd, Cu, Cr, Pb, Zn) on fish glutathione metabolism. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 22, n. 5, p. 3229–3237, 2015.

FÁBREGAS, J. et al. Growth rate of the microalga *Tetraselmis suecica* changes the biochemical composition of *Artemia* species. **Marine Biotechnology**, v. 3, n. 3, p. 256–263, 2001.

FAUST, M. et al. Algal toxicity of binary combinations of pesticides. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 53, n. 1, p. 134–141, 1994.

FERNANDES, L. et al. Accumulation of sediment, organic matter and trace metals with space and time, in a creek along Mumbai coast, India. **Estuarine, Coastal and Shelf Science**, v. 91, n. 3, p. 388–399, 2011.

FERREIRA, C. S. G. et al. Acute toxicity of oxytetracycline and florfenicol to the microalgae *Tetraselmis chuii* and to the crustacean *Artemia parthenogenetica*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 67, n. 3, p. 452–458, 2007.

FIELD, C. B. et al. Primary production of the biosphere: Integrating terrestrial and oceanic components. **Science**, v. 281, n. 5374, p. 237–240, 1998.

FİKİRDEŞİCİ, Ş.; ALTINDAĞ, A.; ÖZDEMİR, E. Investigation of acute toxicity of cadmium-arsenic mixtures to *Daphnia magna* with toxic units approach. **TÜBİTAK**, v. 36, n. 4, p. 543–550, 2012.

FRANKLIN, N. M. et al. Effect of initial cell density on the bioavailability and toxicity of copper in microalgal bioassays. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 21, n. 4, p. 742–751, 2002.

GALLO, A. et al. Species-specific sensitivity of three microalgae to sediment elutriates. **Marine Environmental Research**, v. 156, n. October 2019, p. 104901, 2020.

GARCÍA-GALÁN, M. J. et al. Microalgae-based bioremediation of water contaminated by pesticides in peri-urban agricultural areas. **Environmental Pollution**, v. 265, 2020.

GAUTHIER, L. et al. Metabolome response to anthropogenic contamination on microalgae: a review. **Metabolomics**, v. 16, n. 1, p. 1–13, 2020.

GHASEMI, J. B.; HASHEMI, B. Surfactant-mediated complex formation for

determination of traces amounts of zinc, cadmium, and lead with 4-(2-thiazolylazo) resorcinol and chemometric methods. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 183, n. 1–4, p. 57–63, 2011.

GIMÉNEZ, L. et al. Macrofaunal patterns and animal-sediment relationships in Uruguayan estuaries and coastal lagoons (Atlantic coast of South America). **Journal of Sea Research**, v. 87, p. 46–55, 2014.

GOH, B. H. H. et al. Sustainability of direct biodiesel synthesis from microalgae biomass: A critical review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 107, n. February, p. 59–74, 2019.

GRIFFITHS, M. J. et al. Interference by pigment in the estimation of microalgal biomass concentration by optical density. **Journal of Microbiological Methods**, v. 85, n. 2, p. 119–123, 2011.

GRILLO, C. A. et al. Degradation of bioabsorbable Mg-based alloys : Assessment of the effects of insoluble corrosion products and joint effects of alloying components on mammalian cells. **Materials Science & Engineering C**, v. 58, p. 372–380, 2016.

GUILLARD, R. R. L. Culture of Marine Invertebrate Animals. In: SMITH, W. L.; M.H.CHANLEY (Eds.). . **Culture of Marine Invertebrate Animals**. 1st editio ed. London: [s.n.]. p. 29–60.

HAN, D.; CURRELL, M. J. Persistent organic pollutants in China's surface water systems. **Science of the Total Environment**, v. 580, p. 602–625, 2017.

HARMENS, H. et al. Terrestrial mosses as biomonitors of atmospheric POPs pollution: A review. **Environmental Pollution**, v. 173, p. 245–254, 2013.

HASHIM, M. A. et al. Remediation technologies for heavy metal contaminated groundwater. **Journal of Environmental Management**, v. 92, n. 10, p. 2355–2388, 2011.

HASSINK, J. A Model of the Physical Protection of Organic Matter in Soils The capacity of soils to preserve organic C and N by their association with clay and silt particles. **Plant and Soil**, v. 191, p. 77–87, 1997.

HAVLIK, I. et al. On-line monitoring of large cultivations of microalgae and cyanobacteria. **Trends in Biotechnology**, v. 31, n. 7, p. 406–414, 2013.

HILSCHEROVA, K. et al. Redistribution of organic pollutants in river sediments and alluvial soils related to major floods. **Journal of Soils and Sediments**, v. 7, n. 3, p. 167–177, 2007.

HODGSON, E. **A Textbook of Modern Toxicology**. Third edit ed. [s.l.] John Wiley & Sons, 2004.

HUANG, L.; FANG, H. W.; CHEN, M. H. Experiment on surface charge distribution of fine sediment. **Science China Technological Sciences**, v. 55, n. 4, p. 1146–1152, 2012.

HUND-RINKE, K. et al. Grouping concept for metal and metal oxide nanomaterials with regard to their ecotoxicological effects on algae, daphnids and fish embryos. **NanoImpact**, v. 9, n. October 2017, p. 52–60, 2018.

HUNG, H. et al. Toward the next generation of air quality monitoring: Persistent organic pollutants. **Atmospheric Environment**, v. 80, p. 591–598, 2013.

HYKA, P. et al. Flow cytometry for the development of biotechnological processes with microalgae. **Biotechnology Advances**, v. 31, n. 1, p. 2–16, 2013.

IMRE, S.; VLASE, L.; MUNTEAN, D. L. Bioanalytical method validation. **Revista Romana de Medicina de Laborator**, v. 10, n. 1, p. 13–21, 2008.

ISLAM, S. et al. Arsenic accumulation in rice: Consequences of rice genotypes and management practices to reduce human health risk. **Environment International**, v. 96, p. 139–155, 2016.

IVORRA, L. et al. Environmental characterization of 4,4'-dichlorobenzophenone in surface waters from Macao and Hong Kong coastal areas (Pearl River Delta) and its toxicity on two biological models: *Artemia salina* and *Daphnia magna*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 171, n. December 2018, p. 1–11, 2019.

JANKOWSKA, E.; SAHU, A. K.; OLESKOWICZ-POPIEL, P. Biogas from microalgae: Review on microalgae's cultivation, harvesting and pretreatment for anaerobic digestion. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 75, n. October 2015, p. 692–709, 2017.

JONES, K. .; VOOGT, P. DE. Persistent organic pollutants (POPs) : state of the science. **Environmental Pollution**, v. 100, p. 209–221, 1999.

KANU, I.; ACHI, O. . Industrial Effluents and Their Impact on Water Quality of Receiving Rivers in Nigeria. **Journal of applied technology in Environmental Sanitation**, v. 1, p. 75–86, 2011.

KARA, Y. Bioaccumulation of Cu, Zn and Ni from the wastewater by treated *Nasturtium officinale*. **International Journal of Environmental Science and Technology**, v. 2, n. 1, p. 63–67, 2005.

KASILINGAM, K. et al. Trace element concentration in surface sediments of Palk Strait, southeast coast of Tamil Nadu, India. **Marine Pollution Bulletin**, v. 111, n. 1–2, p. 500–508, 2016.

KASSAMBARA, A., MUNDT, F. **factoextra: Extract and Visualize the Results of Multivariate Data Analyses**. R package version 1.0.7., 2020. Disponível em: <https://CRAN.R-project.org/package=factoextra>

KATSANEVAKIS, S. et al. Ecosystem-based marine spatial management: Review of concepts, policies, tools, and critical issues. **Ocean and Coastal Management**, v. 54, n. 11, p. 807–820, 2011.

KHAN, S. et al. Health risks of heavy metals in contaminated soils and food crops irrigated with wastewater in Beijing, China. **Environmental Pollution**, v. 152, n. 3, p. 686–692, 2008.

KÖNEMANN, W. H.; PIETERS, M. N. Confusion of concepts in mixture toxicology. **Food and Chemical Toxicology**, v. 34, n. 11–12, p. 1025–1031, 1996.

KRÖGER, M.; MÜLLER-LANGER, F. Review on possible algal-biofuel production processes. **Biofuels**, v. 3, n. 3, p. 333–349, 2012.

LAKSHMANASENTHIL, S. et al. Harmful metals concentration in sediments and fishes of biologically important estuary, Bay of Bengal. **Journal of Environmental Health Science and Engineering**, v. 11, n. 1, p. 1–7, 2013.

LAMOUR, M. R.; ANGULO, R. J.; SOARES, C. R. Bathymetrical Evolution of Critical Shoaling Sectors on Galheta Channel, Navigable Access to Paranaguá Bay, Brazil. **Journal of Coastal Research**, v. 231, n. 231, p. 49–58, 2007.

LAMOUR, M. R.; SOARES, C. R.; CARRILHO, J. C. Mapas dos parâmetros texturais de sedimentos de fundo do Complexo Estuarino de Paranaguá - PR. **Boletim Paranaense de Geociências**, n. 55, p. 77–82, 2004.

LANA, P. C. et al. The Subtropical Estuarine Complex of Paranaguá Bay, Brazil. **Ecological Studies**, v. 144, p. 131–145, 2001.

LAU, M. H. Y. et al. Environmental policy, legislation and management of persistent organic pollutants (POPs) in China. **Environmental Pollution**, v. 165, p. 182–192, 2012.

LAURENS, L. M. L.; WOLFRUM, E. J. Feasibility of spectroscopic characterization of algal lipids: Chemometric correlation of NIR and FTIR Spectra with exogenous lipids in algal biomass. **Bioenergy Research**, v. 4, n. 1, p. 22–35, 2011.

LE, S., JOSSE, J., HUSSON, F., 2008. FactoMineR: An R Package for Multivariate Analysis. **Journal of Statistical Software**, v. 25, n. 1, p. 1-18. 10.18637/jss.v025.i01

LEAL, P. P. et al. Copper ecotoxicology of marine algae: a methodological

- appraisal. **Chemistry and Ecology**, v. 32, n. 8, p. 786–800, 2016.
- LEE, J. W. et al. Significance of adverse outcome pathways in biomarker-based environmental risk assessment in aquatic organisms. **Journal of Environmental Sciences (China)**, v. 35, p. 115–127, 2015.
- LELIAERT, F. et al. Phylogeny and Molecular Evolution of the Green Algae. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 31, n. 1, p. 1–46, 2012.
- LEONG, Y. K.; CHANG, J. S. Bioremediation of heavy metals using microalgae: Recent advances and mechanisms. **Bioresource Technology**, v. 303, n. January, p. 122886, 2020.
- LESSA, G. C. et al. Brazilian Estuaries. In: [s.l: s.n.].
- LEVY, J. L.; STAUBER, J. L.; JOLLEY, D. F. Sensitivity of marine microalgae to copper: The effect of biotic factors on copper adsorption and toxicity. **Science of the Total Environment**, v. 387, n. 1–3, p. 141–154, 2007.
- LI, Y. et al. A comparative study: The impact of different lipid extraction methods on current microalgal lipid research. **Microbial Cell Factories**, v. 13, n. 1, 2014.
- LI, Y. et al. Prioritization of pharmaceuticals in water environment in China based on environmental criteria and risk analysis of top-priority pharmaceuticals. **Journal of Environmental Management**, v. 253, n. October 2019, p. 109732, 2020.
- LIEBEZEIT, G. et al. DDT in biota of Paranaguá Bay, Southern Brazil: Recent input and rapid degradation. **Water, Air, and Soil Pollution**, v. 220, n. 1–4, p. 181–188, 2011.
- LIU, F. et al. Distribution and transportation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) at the Humen river mouth in the Pearl River delta and their influencing factors. **Marine Pollution Bulletin**, v. 84, n. 1–2, p. 401–410, 2014.
- LOEWE, S.; MUISCHNEK, H. uber Kombinationswirkungen. In: [s.l: s.n.].
- LONG, E. R. et al. Incidence of adverse biological effects within ranges of chemical concentrations in marine and estuarine sediments. **Environmental Management**, v. 19, n. 1, p. 81–97, 1995.
- LORING, D. H.; RANTALA, R. T. T. Manual for the geochemical analyses of marine sediments and suspended particulate matter. **Earth Science Reviews**, v. 32, n. 4, p. 235–283, 1992.
- LU, L. et al. Biomass and nutrient productivities of *Tetraselmis chuii* under mixotrophic culture conditions with various C:N ratios. **Chinese Journal of Oceanology and Limnology**, v. 35, n. 2, p. 303–312, 2017a.

LU, L. et al. A comparative study on three quantitating methods of microalgal biomass. **Indian Journal of Geo-Marine Sciences**, v. 46, n. 11, p. 2265–2272, 2017b.

LUO, X. J. et al. Polycyclic aromatic hydrocarbons in suspended particulate matter and sediments from the Pearl River Estuary and adjacent coastal areas, China. **Environmental Pollution**, v. 139, n. 1, p. 9–20, 2006.

LÜRLING, M. Phenotypic plasticity in the green algae *Desmodesmus* and *Scenedesmus* with special reference to the induction of defensive morphology. **Annales de Limnologie**, v. 39, n. 2, p. 85–101, 2003.

MACLEOD, M. et al. Applications of contaminant fate and bioaccumulation models in assessing ecological risks of chemicals: A case study for gasoline hydrocarbons. **Environmental Science and Technology**, v. 38, n. 23, p. 6225–6233, 2004.

MAGALHÃES, D. DE P.; FERRÃO-FILHO, A. DA S. a Ecotoxicologia Como Ferramenta No Biomonitoramento De Ecossistemas Aquáticos. **Oecologia Australis**, v. 12, n. 03, p. 355–381, 2008.

MALEV, O. et al. Comparative toxicity of imidacloprid and its transformation product 6-chloronicotinic acid to non-target aquatic organisms: Microalgae *Desmodesmus subspicatus* and amphipod *Gammarus fossarum*. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 104, n. 3, p. 178–186, 2012.

MANOLI, E.; SAMARA, C. Polycyclic aromatic hydrocarbons in natural waters: Sources, occurrence and analysis. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 18, n. 6, p. 417–428, 1999.

MARTINS, C. C. et al. Anthropogenic organic matter inputs indicated by sedimentary fecal steroids in a large South American tropical estuary (Paranaguá estuarine system, Brazil). **Marine Pollution Bulletin**, v. 60, n. 11, p. 2137–2143, 2010.

MATHIMANI, T. et al. Review on cultivation and thermochemical conversion of microalgae to fuels and chemicals: Process evaluation and knowledge gaps. **Journal of Cleaner Production**, v. 208, p. 1053–1064, 2019.

MAYERLE, R. et al. A case study of sediment transport in the Paranagua Estuary Complex in Brazil. **Ocean Engineering**, v. 106, p. 161–174, 2015.

MCLUSKY, D. S.; ELLIOTT, M. Transitional waters: A new approach, semantics or just muddying the waters? **Estuarine, Coastal and Shelf Science**, v. 71, n. 3–4, p. 359–363, 2007.

MEGHARAJ, M.; BOUL, H. L.; THIELE, J. H. Effects of DDT and its metabolites on soil algae and enzymatic activity. **Biology and Fertility of Soils**, v. 29, n. 2,

p. 130–134, 1999.

MEMON, A. R.; SCHRÖDER, P. Implications of metal accumulation mechanisms to phytoremediation. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 16, n. 2, p. 162–175, 2009.

MENG, J. et al. Traditional and new POPs in environments along the Bohai and Yellow Seas: An overview of China and South Korea. **Chemosphere**, v. 169, p. 503–515, 2017.

MERHABY, D. et al. Organic pollution in surficial sediments of Tripoli harbour, Lebanon. **Marine Pollution Bulletin**, v. 93, n. 1–2, p. 284–293, 2015.

METTING, F. B. Biodiversity and application of microalgae. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 17, n. 5–6, p. 477–489, 1996.

MIASHIRO, L.; LOMBARDI, J. V.; MERCANTE, C. T. J. Ecotoxicity assessment in aquaculture system using the test organism *Pseudokirchneriella subcapitata* (Chlorophyceae). **Acta Scientiarum - Biological Sciences**, v. 34, n. 4, p. 373–379, 2012.

MIRAGLIA, M. et al. Detection and traceability of genetically modified organisms in the food production chain. **Food and Chemical Toxicology**, v. 42, n. 7, p. 1157–1180, 2004.

MORENO-GARRIDO, I.; LUBIÁN, L. M.; SOARES, A. M. V. M. Influence of cellular density on determination of EC50 in microalgal growth inhibition tests. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 47, n. 2, p. 112–116, 2000.

MORRONI, L. et al. Integrated characterization and risk management of marine sediments: The case study of the industrialized Bagnoli area (Naples, Italy). **Marine Environmental Research**, v. 160, n. December 2019, p. 104984, 2020.

MUCHA, A. P.; VASCONCELOS, M. T. S. D.; BORDALO, A. A. Macrobenthic community in the Douro estuary: Relations with trace metals and natural sediment characteristics. **Environmental Pollution**, v. 121, n. 2, p. 169–180, 2003.

MÜLLER, C. C.; RAYA-RODRIGUEZ, M. T.; CYBIS, L. F. Diagnóstico da qualidade analítica na quantificação de cianobactérias. **Engenharia Sanitaria e Ambiental**, v. 15, n. 3, p. 283–290, 2010.

MWANAMOKI, P. M. et al. Trace metals and persistent organic pollutants in sediments from river-reservoir systems in Democratic Republic of Congo (DRC): Spatial distribution and potential ecotoxicological effects. **Chemosphere**, v. 111, p. 485–492, 2014.

NAMIEŚNIK, J.; RABAJCZYK, A. The speciation and physico-chemical forms of

metals in surface waters and sediments. **Chemical Speciation and Bioavailability**, v. 22, n. 1, p. 1–24, 2010.

NAYAR, S. et al. Environmental effects of dredging on sediment nutrients, carbon and granulometry in a tropical estuary. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 127, n. 1–3, p. 1–13, 2007.

NICHOLLS, K. H.; DILLON, P. J. An Evaluation of Phosphorus-Chlorophyll-Phytoplankton Relationships for Lakes. **Internationale Revue der gesamten Hydrobiologie und Hydrographie**, v. 63, n. 2, p. 141–154, 1978.

NICHOLS, W. J.; SEMINOFF, J. A.; ETNOYER, P. **Handbook of Marine Fisheries Conservation and Management**. [s.l.] Oxford University Press, 2010.

NICOLAS, D. et al. Fish under influence: A macroecological analysis of relations between fish species richness and environmental gradients among European tidal estuaries. **Estuarine, Coastal and Shelf Science**, v. 86, n. 1, p. 137–147, 2010.

NIELSEN, S. L.; HANSEN, B. W. Evaluation of the robustness of optical density as a tool for estimation of biomass in microalgal cultivation: The effects of growth conditions and physiological state. **Aquaculture Research**, v. 50, n. 9, p. 2698–2706, 2019.

NIVA, C. C. et al. Soil ecotoxicology in Brazil is taking its course. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 23, n. 11, p. 11363–11378, 2016.

OLIVARES, I. R. B.; LOPES, F. A. Essential steps to providing reliable results using the Analytical Quality Assurance Cycle. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 35, n. October 1993, p. 109–121, 2012.

OLIVEIRA, T. M. N. DE; KLEINE, T.; VAZ, C. **Toxicologia aquática com microcrustáceos**. 1 ed ed. Curitiba, PR: [s.n.].

OMAR, T. F. T. et al. Occurrence, distribution, and sources of emerging organic contaminants in tropical coastal sediments of anthropogenically impacted Klang River estuary, Malaysia. **Marine Pollution Bulletin**, v. 131, n. August 2017, p. 284–293, 2018.

PARKER, M. S.; MOCK, T.; ARMBRUST, E. V. Genomic Insights into Marine Microalgae. **Annual Review of Genetics**, v. 42, n. 1, p. 619–645, 2008.

PARMAR, A.; SHARMA, S. Derivative UV-vis absorption spectra as an invigorated spectrophotometric method for spectral resolution and quantitative analysis: Theoretical aspects and analytical applications: A review. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 77, p. 44–53, 2016.

PASCHOALINO, M. P.; MARCONE, G. P. S.; JARDIM, W. F. Os Nanomateriais e a Questão Ambiental. **Química Nova**, v. 33, n. 2, p. 421–430, 2010.

PELUSI, A. et al. Effects of elutriates from contaminated coastal sediments on different life cycle phases of planktonic diatoms. **Marine Environmental Research**, v. 155, n. January, p. 104890, 2020.

POSSATTO, F. E. et al. Marine debris in a World Heritage Listed Brazilian estuary. **Marine Pollution Bulletin**, v. 91, n. 2, p. 548–553, 2015.

PRADO, R. et al. Suitability of cytotoxicity endpoints and test microalgal species to disclose the toxic effect of common aquatic pollutants. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 114, p. 117–125, 2015.

PRATA, J. C. et al. Influence of microplastics on the toxicity of the pharmaceuticals procainamide and doxycycline on the marine microalgae *Tetraselmis chuii*. **Aquatic Toxicology**, v. 197, n. February, p. 143–152, 2018.

PRAVDIĆ, V. Surface Charge Characterization of Sea Sediments. **Limnology and Oceanography**, v. 15, n. 2, p. 230–233, 1970.

PRIETO, B.; SILVA, B.; LANTES, O. Biofilm quantification on stone surfaces: Comparison of various methods. **Science of the Total Environment**, v. 333, n. 1–3, p. 1–7, 2004.

PRIMAVERA, J. H. Overcoming the impacts of aquaculture on the coastal zone. **Ocean and Coastal Management**, v. 49, n. 9–10, p. 531–545, 2006.

PROSENC, F. et al. Microalgae-based removal of contaminants of emerging concern: Mechanisms in *Chlorella vulgaris* and mixed algal-bacterial cultures. **Journal of Hazardous Materials**, v. 418, n. May, 2021.

PULZ, O.; GROSS, W. Valuable products from biotechnology of microalgae. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 65, n. 6, p. 635–648, 2004.

QADIR, A.; MALIK, R. N.; HUSAIN, S. Z. Spatio-temporal variations in water quality of Nullah Aik-tributary of the river Chenab, Pakistan. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 140, n. 1–3, p. 43–59, 2008.

QU, C. et al. The status of organochlorine pesticide contamination in the soils of the Campanian Plain, southern Italy, and correlations with soil properties and cancer risk. **Environmental Pollution**, v. 216, p. 500–511, 2016.

R CORE TEAM. **R: A language and environment for statistical computing**. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, 2021. Disponível em <<https://www.R-project.org/>> ultimo acesso 10 jan. 2022.

REGNIER, P. et al. Modelling Estuarine Biogeochemical Dynamics: From the Local to the Global Scale. **Aquatic Geochemistry**, v. 19, n. 5–6, p. 591–626, 2013.

RIBA, I. et al. Sediment quality in the Atlantic Coast of Spain. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 23, n. 2, p. 271–282, 2004.

RIBANI, M. et al. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Quim. Nova**, v. 27, n. 5, p. 771–780, 2004.

RIBEIRO RODRIGUES, L. H. et al. Algal density assessed by spectrophotometry: A calibration curve for the unicellular algae *Pseudokirchneriella subcapitata*. **Journal of Environmental Chemistry and Ecotoxicology**, v. 3(8), n. August, p. 225–228, 2011.

RICART, M. et al. Effects of low concentrations of the phenylurea herbicide diuron on biofilm algae and bacteria. **Chemosphere**, v. 76, n. 10, p. 1392–1401, 2009.

RICE, E. W.; BAIRD, R. B.; EATON, A. D. **Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater**, 23rd Edition. Third ed. [s.l.] American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environment Federation, 2017. v. 53

RIZZI, J. et al. Characterization of quality of sediments from Paranaguá Bay (Brazil) by combined in vitro bioassays and chemical analyses. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 36, n. 7, p. 1811–1819, 2017.

ROBINS, P. E. et al. Impact of climate change on UK estuaries: A review of past trends and potential projections. **Estuarine, Coastal and Shelf Science**, v. 169, p. 119–135, 2016.

ROCHA, M. L. DA et al. Metals impact into the Paranaguá Estuarine Complex (Brazil) during the exceptional flood of 2011. **Brazilian Journal of Oceanography**, v. 65, n. 1, p. 54–68, 2017.

ROCHE, H. et al. Organochlorines in the Vaccarès Lagoon trophic web (Biosphere Reserve of Camargue, France). **Environmental Pollution**, v. 157, n. 8–9, p. 2493–2506, 2009.

RODRIGUES, L. H. R. et al. Algal density assessed by spectrophotometry: A calibration curve for the unicellular algae *Pseudokirchneriella subcapitata*. **Journal of Environmental Chemistry and Ecotoxicology**, v. 3, n. August, p. 225–228, 2011.

ROESLER, C. S.; PERRY, M. J.; CARDER, K. L. Modeling in situ phytoplankton absorption from total absorption spectra in productive inland marine waters. **Limnology and Oceanography**, v. 34, n. 8, p. 1510–1523, 1989.

ROSSI, S.; FIORILLO, I. Biochemical features of a *protoceratium reticulatum* red tide in Chipana Bay (Northern Chile) in summer conditions. **Scientia Marina**, v. 74, n. 4, p. 633–642, 2010.

RUIZ-MARIN, A.; MENDOZA-ESPINOSA, L. G.; STEPHENSON, T. Growth and nutrient removal in free and immobilized green algae in batch and semi-continuous cultures treating real wastewater. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 1, p. 58–64, 2010.

SÁ, F. et al. Arsenic fractionation in estuarine sediments: Does coastal eutrophication influence As behavior? **Marine Pollution Bulletin**, v. 96, n. 1–2, p. 496–501, 2015.

SAHARAN, B. S. et al. Towards Algal Biofuel Production : A Concept of Green Bio Energy Development. **Innovative Romanian Food Biotechnology**, v. 12, n. 3, p. 1–21, 2013.

SAKAI, H.; KOJIMA, Y.; SAITO, K. Distribution of heavy metals in water and sieved sediments in the Toyohira river. **Water Research**, v. 20, n. 5, p. 559–567, 1986.

SANTOS-BALLARDO, D. U. et al. A simple spectrophotometric method for biomass measurement of important microalgae species in aquaculture. **Aquaculture**, v. 448, p. 87–92, 2015.

SANTOS, D. M. et al. Organotin compounds in the Paranaguá Estuarine Complex, Paraná, Brazil: Evaluation of biological effects, surface sediment, and suspended particulate matter. **Marine Pollution Bulletin**, v. 58, n. 12, p. 1922–1926, 2009.

SARRAFZADEH, M. H. et al. Evaluation of various techniques for microalgal biomass quantification. **Journal of Biotechnology**, v. 216, p. 90–97, 2015.

SATHASIVAM, R.; KI, J. S. Heat shock protein genes in the green alga *Tetraselmis suecica* and their role against redox and non-redox active metals. **European Journal of Protistology**, v. 69, p. 37–51, 2019.

SELVAKUMAR, S.; CHANDRASEKAR, N.; KUMAR, G. Hydrogeochemical characteristics and groundwater contamination in the rapid urban development areas of Coimbatore , India. **Water Resources and Industry**, v. 17, n. December 2016, p. 26–33, 2017.

SFAKIANAKIS, D. G. et al. Effect of heavy metals on fish larvae deformities: A review. **Environmental Research**, v. 137, p. 246–255, 2015.

SHEN, J.; WEI, Y. D.; YANG, Z. The impact of environmental regulations on the location of pollution-intensive industries in China. **Journal of Cleaner Production**, v. 148, p. 785–794, 2017.

SHOAIB, N. et al. Toxicity of pesticides on photosynthesis of diatoms. **Pakistan Journal of Botany**, v. 43, n. 4, p. 2067–2069, 2011.

SIERATOWICZ, A. et al. Acute and chronic toxicity of four frequently used UV filter substances for *Desmodesmus subspicatus* and *Daphnia magna*. **Journal of Environmental Science and Health - Part A Toxic/Hazardous Substances and Environmental Engineering**, v. 46, n. 12, p. 1311–1319, 2011.

SILVA, A. et al. Ecotoxicity tests using the green algae *Chlorella vulgaris*-A useful tool in hazardous effluents management. **Journal of Hazardous Materials**, v. 167, n. 1–3, p. 179–185, 2009.

SILVA, D. C. V. R. DA; POMPEO, M.; PAIVA, T. C. B. DE. A ecotoxicologia no Contexto atual no Brasil. In: **Ecologia de reservatórios e interfaces**. [s.l: s.n.]. p. 340–353.

SODANGO, T. H. et al. Review of the Spatial Distribution , Source and Extent of Heavy Metal Pollution of Soil in China: Impacts and Mitigation Approaches. **Journal of Health & Pollution**, v. 8, n. 17, 2018.

SOHRABI, M. R.; MIRZABEYGI, V.; DAVALLO, M. Use of continuous wavelet transform approach for simultaneous quantitative determination of multicomponent mixture by UV–Vis spectrophotometry. **Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 201, p. 306–314, 2018.

SOUZA, A. C. et al. Occurrence of halogenated organic contaminants in estuarine sediments from a biosphere reserve in Southern Atlantic. **Marine Pollution Bulletin**, v. 133, n. May, p. 436–441, 2018.

SOUZA, I. S. et al. Using an integrated approach to assess the sediment quality of an estuary from the semi-arid coast of Brazil. **Marine Pollution Bulletin**, v. 104, n. 1–2, p. 70–82, 2016.

SPOLAORE, P. et al. Open Archive Toulouse Archive Ouverte (OATAO) Commercial Applications of Microalgae. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 101, p. 87–96, 2006.

SRINIVASA REDDY, M. et al. Seasonal distribution and contamination levels of total PHCs, PAHs and heavy metals in coastal waters of the Alang-Sosiya ship scrapping yard, Gulf of Cambay, India. **Chemosphere**, v. 61, n. 11, p. 1587–1593, 2005.

STAUBER, J. L.; FRANKLIN, N. M.; ADAMS, M. S. Applications of flow cytometry to ecotoxicity testing using microalgae. **Trends in Biotechnology**, v. 20, n. 4, p. 141–143, 2002.

STONE, S. et al. Development and application of a multispecies toxicity test with tropical freshwater microalgae. **Environmental Pollution**, v. 250, p. 97–106, 2019.

STRANDESEN, M. et al. Fate and distribution modelling of metals in life cycle impact assessment. **Ecological Modelling**, v. 203, n. 3–4, p. 327–338, 2007.

SUBIDA, M. D. et al. Multivariate methods and artificial neural networks in the assessment of the response of infaunal assemblages to sediment metal contamination and organic enrichment. **Science of the Total Environment**, v. 450–451, p. 289–300, 2013.

SUMAN, T. Y.; RADHIKA RAJASREE, S. R.; KIRUBAGARAN, R. Evaluation of zinc oxide nanoparticles toxicity on marine algae *Chlorella vulgaris* through flow cytometric, cytotoxicity and oxidative stress analysis. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 113, p. 23–30, 2015.

SUN, J. et al. Microstructures and functional groups of *Nannochloropsis* sp. cells with arsenic adsorption and lipid accumulation. **Bioresource Technology**, v. 194, p. 305–311, 2015.

SUPARMANIAM, U. et al. Insights into the microalgae cultivation technology and harvesting process for biofuel production: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 115, n. August, p. 109361, 2019.

TAVERNIERS, I.; DE LOOSE, M.; VAN BOCKSTAELE, E. Trends in quality in the analytical laboratory. I. Traceability and measurement uncertainty of analytical results. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 23, n. 7, p. 480–490, 2004.

TIEYU, W. et al. Contamination of persistent organic pollutants (POPs) and relevant management in China. **Environment International**, v. 31, n. 6, p. 813–821, 2005.

TINCANI, F. H. et al. Pseudoreplication and the usage of biomarkers in ecotoxicological bioassays. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 36, n. 10, p. 2868–2874, 2017.

TOMASELLI, L. **Handbook of Microalgal Culture**. Oxford, UK: Blackwell, 2004.

TOMBESI, N. et al. Records of organochlorine pesticides in soils and sediments on the southwest of Buenos Aires Province, Argentina. **Environmental Earth Sciences**, v. 77, n. 11, p. 1–11, 2018.

TSAI, W. T. Current status and regulatory aspects of pesticides considered to be persistent organic pollutants (POPs) in Taiwan. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 7, n. 10, p. 3615–3627, 2010.

TURNER, A.; TAYLOR, A. On site determination of trace metals in estuarine sediments by field-portable-XRF. **Talanta**, v. 190, n. August, p. 498–506, 2018.

ÚBEDA-MÍNGUEZ, P. et al. Tools for microalgal biotechnology: development of an optimized transformation method for an industrially promising microalga—*Tetraselmis chuii*. **Journal of Applied Phycology**, v. 27, n. 1, p. 223–232, 2015.

UNEP. UNEP Determination of petroleum hydrocarbons in sediments. **Reference Methods For Marine Pollution Studies**, v. 17, n. 20, 1992.

UPSTONE, S. **Validating UV / Visible Spectrophotometers**. [s.l: s.n.].

USEPA. Method 3050B. Acid Digestion of Sediments, Sludges, and Soils. n. December, p. 1–12, 1996.

USESE, A. et al. Enrichment , contamination and geo-accumulation factors for assessing arsenic contamination in sediment of a Tropical Open Lagoon , Southwest Nigeria. **Environmental Technology & Innovation**, v. 8, p. 126–131, 2017.

VALENCIA-AVELLAN, M. et al. Evaluating water quality and ecotoxicology assessment techniques using data from a lead and zinc effected upland limestone catchment. **Water Research**, v. 128, p. 49–60, 2017.

VALER, R.M & GLOCK, L. Quantificação de algas clorofíceas de interesse ecotoxicológico através do método espectrofotométrico. **Acta Limnol. Bras.**, v. 11, n. 2, p. 149–156, 1999.

VALER, R. .; GLOCK, L. Quantificação de algas clorofíceas de interesse ecotoxicológico através do método espectrofotométrico. **acta limnologica brasiliensia**, v. 11, n. 2, p. 149–156, 1999.

VAN, T. N. et al. Arsenic and Heavy Metal Contamination in Soils under Different Land Use in an Estuary in. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 13, p. 2–13, 2016.

VERREAULT, J. et al. Changes in prolactin in a highly organohalogen contaminated Arctic top predator seabird, the glaucous gull. **General and Comparative Endocrinology**, v. 156, n. 3, p. 569–576, 2008.

VIOLANTE, A. et al. Mobility and bioavailability of heavy metals and metalloids in soil environments. **Journal of Soil Science and Plant Nutrition**, v. 10, n. 3, p. 268–292, 2010.

VOLPI GHIRARDINI, A.; ARIZZI NOVELLI, A.; TAGLIAPIETRA, D. Sediment toxicity assessment in the Lagoon of Venice (Italy) using *Paracentrotus lividus* (Echinodermata: Echinoidea) fertilization and embryo bioassays. **Environment**

International, v. 31, n. 7 SPEC. ISS., p. 1065–1077, 2005.

WANG, D. et al. Historical deposition behaviors of PAHs in the Yangtze River Estuary: Role of the sources and water currents. **Chemosphere**, v. 90, n. 6, p. 2020–2026, 2013.

WANIA, F.; MACKAY, D. Tracking the distribution of persistent organic pollutants. **Environmental Science and Technology**, v. 30, n. 9, 1996.

WARREN, L. A.; HAACK, E. A. Biogeochemical controls on metal behaviour in freshwater environments. **Earth-Science Reviews**, v. 54, n. 4, p. 261–320, 2001.

WENNING, R. J.; MARTELLO, L. POPs in Marine and Freshwater Environments. In: **Environmental Forensics for Persistent Organic Pollutants**. [s.l.] Elsevier B.V., 2014. p. 357–390.

WIBERG, P. L.; HARRIS, C. K. Desorption of p,p'-DDE from sediment during resuspension events on the Palos Verdes shelf, California: A modeling approach. **Continental Shelf Research**, v. 22, n. 6–7, p. 1005–1023, 2002.

WILSON, M. P.; SCHWARZMAN, M. R. Toward a new U.S. chemicals policy: Rebuilding the foundation to advance new science, green chemistry, and environmental health. **Environmental Health Perspectives**, v. 117, n. 8, p. 1202–1209, 2009.

WU, D. et al. Algae (*Microcystis* and *Scenedesmus*) absorption spectra and its application on Chlorophyll a retrieval. **Frontiers of Earth Science**, v. 7, n. 4, p. 522–530, 2013.

WU, X. et al. A review of toxicity and mechanisms of individual and mixtures of heavy metals in the environment. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 23, n. 9, p. 8244–8259, 2016.

XU, W.; WANG, X.; CAI, Z. Analytical chemistry of the persistent organic pollutants identified in the Stockholm Convention: A review. **Analytica Chimica Acta**, v. 790, p. 1–13, 2013.

XU, X. et al. Assessment of toxic interactions of heavy metals in multi-component mixtures using sea urchin embryo-larval bioassay. **Toxicology in Vitro**, v. 25, n. 1, p. 294–300, 2011.

YE, J. et al. Enantioselective environmental toxicology of chiral pesticides. **Chemical Research in Toxicology**, v. 28, n. 3, p. 325–338, 2015.

ZAGATTO, P. A.; BERTOLETTI, E. **Ecotoxicologia Aquática - Princípios e Aplicações**. 2 Ed ed. São Carlos, SP: [s.n.].

ZHAO, X. et al. Grain size effect on PBDE and PCB concentrations in

sediments from the intertidal zone of Bohai Bay, China. **Chemosphere**, v. 81, n. 8, p. 1022–1026, 2010.

ZHOU, F. et al. Determination of trace ions of cobalt and copper by UV–vis spectrometry in purification process of zinc hydrometallurgy. **Optik**, v. 184, n. January, p. 227–233, 2019.

ZHOU, G. J. et al. Biosorption of zinc and copper from aqueous solutions by two freshwater green microalgae *Chlorella pyrenoidosa* and *Scenedesmus obliquus*. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 19, n. 7, p. 2918–2929, 2012.