

JANAINA MAGALHÃES FLOR

Análise da comunidade de microalgas encontrada em lago ácido de mina de urânio (Caldas-MG): bioprospecção para avaliação de potencial biotecnológico

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia da Universidade de São Paulo, Instituto Butantan e Instituto de Pesquisas Tecnológicas para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

São Paulo
2022

JANAINA MAGALHÃES FLOR

Análise da comunidade de microalgas encontrada em lago ácido de mina de urânio (Caldas-MG): bioprospecção para avaliação de potencial biotecnológico

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia da Universidade de São Paulo, Instituto Butantan e Instituto de Pesquisas Tecnológicas para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Área de concentração: Biotecnologia

Orientadora: Profa Dra. Ana Clara Guerrini Schenberg

Versão corrigida. A versão original eletrônica, encontra-se disponível tanto na Biblioteca do ICB quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD).

São Paulo

2022

CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e informação Biomédica
do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Magalhães Flor, Janaina

Análise da comunidade de microalgas encontrada
em lago ácido de mina de urânio (Caldas-MG):
bioprospecção para avaliação de potencial
biotecnológico. / Janaina Magalhães Flor;
orientadora Ana Clara Guerrini Schenberg. -- São
Paulo, 2022.

112 p.

Dissertação (Mestrado)) -- Universidade de São
Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas.

1. Drenagem ácida de mina. 2. Biorremediação. 3.
Biotecnologia. 4. Microalgas. 5. Prospecção tecnológica.
I. Guerrini Schenberg, Ana Clara, orientador. II. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia

Universidade de São Paulo, Instituto Butantan, Instituto de Pesquisas Tecnológicas

Candidata: Janaina Magalhães Flor

Título da Dissertação: Análise da comunidade de microalgas encontrada em lago ácido de mina de urânio (Caldas-MG): bioprospecção para avaliação de potencial biotecnológico

Orientadora: Ana Clara Guerrini Schenberg

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Dissertação, em sessão pública realizada a/...../....., considerou

() Aprovado (a) () Reprovado (a)

Examinado (a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinado (a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinado (a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:



Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira", Butantã, São Paulo, SP - Av. Professor Lineu Prestes, 2415 - ICB III - 05508 000
Comissão de Ética em Pesquisa - Telefone(11) 3091-7733 - e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO DE ISENÇÃO

Certificamos que o Protocolo CEP-ICB nº **1221/2022** referente ao projeto intitulado: "**Análise da comunidade de microalgas encontrada em lago ácido de mina de urânio (Caldas-MG): bioprospecção para avaliação de potencial biotecnológico**", sob a responsabilidade do(a) aluno(a) "**Janaina Magalhães Flor**", e orientação do(a) Prof.(a) Dr.(a) "**Ana Clara Guerrini Schenberg**" do **Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia** foi analisado pela **CEUA** - Comissão de Ética no Uso de Animais e pelo **CEPSH** - Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos, tendo sido deliberado que o referido projeto não utilizará animais que estejam sob a égide da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, nem envolverá procedimentos regulados pela Resolução CONEP nº 466/2012.

São Paulo, 13 de Abril de 2022.

Prof. Dra. **Luciane Valéria Sita**
Coordenadora CEUA ICB/USP

Prof. Dra. **Camila Squarzoni Dale**
Coordenadora CEPSH ICB/USP

Dedico essa dissertação aos meus pais, Jair e Rosângela, por todo apoio durante a minha caminhada, e ao meu esposo, Nykolás, por sempre estar ao meu lado, nos piores e melhores momentos.

Eu amo muito vocês!

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente a Deus, pela proteção, pela saúde e pela minha vida.

A mim mesma, que enfrentei esse enorme desafio, sofri, chorei, mas resisti e não desisti.

Ao meu esposo, Nykolas, que aguentou minhas crises de ansiedade e sempre esteve do meu lado, nos piores e melhores momentos. Eu amo partilhar a vida com você!

Aos meus pais, Jair e Rosângela, que sempre me apoiaram e me incentivaram. Vocês são minha base! Um agradecimento especial ao meu pai por tantas idas a São Paulo junto comigo para que eu pudesse assistir as aulas tranquila e voltar com segurança para casa (que fica a quase 300 km da capital).

À Universidade de São Paulo e especialmente, ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia e a todos os professores com os quais eu tive contato, pois são incríveis e eu pude aprender muito com eles. Um agradecimento especial à minha orientadora, Profa. Dra. Ana Clara, pela disponibilidade em me ajudar em todas as etapas da Pós-Graduação.

Ao Laboratório de Poços de Caldas - LAPOC/CNEN por ter me proporcionado uma experiência grandiosa através da pesquisadora Dra. Heliana de Azevedo.

Agradeço também à Comissão Nacional de Energia Nuclear - CNEN pela concessão da bolsa de mestrado.

A todos, os meus mais sinceros agradecimentos!!!

“Se não puder voar, corra. Se não puder correr, ande. Se não puder andar, rasteje...
Mas continue em frente de qualquer jeito”.

Marthin Luther King

RESUMO

FLOR, J.M. **Análise da comunidade de microalgas encontrada em lago ácido de mina de urânio (Caldas-MG): bioprospecção para avaliação de potencial biotecnológico.** 2022. 115f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2022.

Ambientes antropogênicos extremos, como aqueles encontrados em áreas de mineração, são locais interessantes para estudos de biodiversidade e bioprospecção de organismos capazes de se desenvolverem e sobreviverem em tais ambientes. A primeira mina de extração de minério de urânio a ter sua jazida explorada no Brasil está localizada na região do Planalto de Poços de Caldas (Minas Gerais) e, atualmente, as atividades de mineração não ocorrem mais no local. Ainda assim, ocorre no local um grave problema ambiental: a drenagem ácida de mina em amostras de água. Neste contexto, torna-se necessário garantir a proteção dos seres humanos e do meio ambiente como um todo, dos efeitos das substâncias radioativas em locais sob influência de lançamentos de efluentes radioativos. Uma alternativa para monitorar tais ambientes é através da análise da comunidade de microalgas em amostras de água existentes no local para fornecer informações sobre espécies com potencial biotecnológico em ações de remediação. No presente estudo, foi realizada uma análise e interpretação de dados anteriormente levantados sobre a composição da comunidade de microalgas e também de cianobactérias em amostras de água encontrada na cava da mina de urânio da Unidade de Descomissionamento de Caldas - UDC/INB (ponto CM) e na Represa das Antas (ponto 14), a jusante do lançamento dos efluentes radioativos tratados provenientes da UDC/INB, e realizada a comparação de resultados obtidos nestes locais de amostragem com o objetivo de identificar as espécies presentes e que desempenham papéis importantes na área biotecnológica. Também foi realizada uma busca de patentes, com o intuito de avaliar o panorama de prospecção tecnológica a respeito da aplicação de microalgas em biorremediação, dando uma ideia do cenário das aplicações industriais que já estão em andamento atualmente. Como resultado, esperava-se encontrar uma diversidade de microalgas bem menor em CM do que em P14. Entretanto, os resultados foram bem semelhantes: em ambos os locais de amostragem, foi encontrada uma flora de microalgas e cianobactérias taxonomicamente diversa, sendo representada por 25 táxons no ponto CM e 28 em P14, dominados pelas classes Bacillariophyceae e Chlorophyceae. Além disso, para P14 foi registrado um grande número de

representantes da classe Dinophyceae. De todos os organismos registrados no presente estudo, muitos foram comuns para ambos os locais de amostragem, mas alguns táxons foram registrados somente no ponto CM, ponto com baixo pH (3,8) e elevadas concentrações de metais, como Mn, U e Zn. Das microalgas que foram registradas somente em CM, *Chlamydomonas* sp., *Desmodesmus* sp. e *Botryococcus* sp. se destacam com relação à biotecnologia, pois em busca na literatura, foi identificado que estas microalgas são muito usadas em processos biotecnológicos de remediação ambiental, remoção de contaminantes de águas residuais, produção de biocombustíveis, pigmentos, medicamentos, entre outros, assim como *Euglena* sp., que também foi registrada em P14. Nos últimos 5 anos, tendo como base de consulta apenas a plataforma WIPO, foram registradas 178 patentes utilizando microalgas em processos de remediação, até o momento da pesquisa. Embora seja recente a utilização de microalgas com o objetivo de produzir compostos e/ou produtos de alto valor, já existem empresas consolidadas atualmente no mercado, mostrando ser este um caminho bastante promissor e ambientalmente sustentável.

Palavras-chave: Drenagem ácida de mina. Biorremediação. Biotecnologia. Microalgas. Prospecção tecnológica.

ABSTRACT

FLOR, J.M. **Analysis of the microalgae community found in acid lake of uranium mine (Caldas-MG): bioprospecting for evaluation of biotechnological potential.** 2022. 115f. Masters thesis (Biotechnology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2022.

Extreme anthropogenic environments, like those found in mining areas, are interesting for biodiversity studies and bioprospection of living organisms capable of developing and surviving in such environments. The first uranium mine that had its deposit explored in Brazil is in the region of the Poços de Caldas Plateau (Minas Gerais) and currently, mining activities no longer take place there. Still, a serious environmental problem occurs at the site: acid mine drainage in water samples. In this context, it is necessary to guarantee the protection of human beings and the environment from the effects of radioactive substances in places under the influence of releases of radioactive effluents. An alternative to monitor such environments is through the analysis of the microalgae community in existing water samples at the site to provide information on species with biotechnological potential in remediation actions. In the present study, an analysis and interpretation of previously collected data was carried out on the composition of the microalgae community and also of cyanobacteria in samples of water found in the uranium mine pit of the Caldas Decommissioning Unit - UDC/INB (point CM) and at Represa das Antas (point 14), downstream of the release of treated radioactive effluents from the UDC/INB, and a comparison of the results obtained at these sampling sites was carried out in order to identify the species present and that play important roles in the area biotechnology. A patent search was also carried out, with the aim of evaluating the technological prospecting scenario regarding the application of microalgae in bioremediation, giving an idea of the scenario of industrial applications that are currently in progress. As a result, it was expected to find a much lower diversity of microalgae in CM than in P14. However, the results were very similar: in both sampling sites, a taxonomically diverse flora of microalgae and cyanobacteria was found, being represented by 25 taxa at the CM point and 28 at P14, dominated by the classes Bacillariophyceae and Chlorophyceae. In addition, for P14 many representatives of the Dinophyceae class were recorded. Of all the organisms recorded in the present study, many were common for both sampling sites, but some taxa were recorded only at the CM site, a site with low pH (3.8) and high concentrations

of metals such as Mn, U and Zn. Of the microalgae that were registered only in CM, *Chlamydomonas* sp., *Desmodesmus* sp. and *Botryococcus* sp. stand out in relation to biotechnology, since in a search in the literature, it was identified that these microalgae are widely used in biotechnological processes of environmental remediation, removal of contaminants from water waste, production of biofuels, pigments, medicines, among others, as well as *Euglena* sp., which was also recorded in P14. In the last 5 years, based only on the WIPO platform, 178 patents were registered using microalgae in remediation processes, until the moment of the research. Although the use of microalgae with the aim of producing high-value compounds and/or products is recent, there are already consolidated companies currently in the market, showing that this is a very promising and environmentally sustainable path.

Keywords: Acid Mine Drainage. Bioremediation. Biotechnology. Microalgae. Technological prospecting.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Representação de como ocorre a DAM	31
Figura 2. Fluxograma mostrando como é feito o tratamento com ozônio nos efluentes da UDC/INB	33
Figura 3. Fluxograma com as características químicas e físicas da DAM, bem como seus efeitos biológicos e no ecossistema	35
Figura 4. Classificação das microalgas nos seis filos: Dinophyta, Phaeophyta, Euglenophyta, Rodophyta, Bacillariophyta e Chlorophyta	39
Figura 5. Esquema mostrando a utilização de microalgas para remediação de ambientes contaminados com metais pesados	41
Figura 6. Fluxograma retratando as etapas da pesquisa realizada neste trabalho.....	43
Figura 7. Localização dos pontos analisados no presente estudo	44
Figura 8. Representação das classes de microalgas e cianobactérias registradas em CM.....	54
Figura 9. Classes de microalgas e cianobactérias, representadas em porcentagem, registradas em relação ao número de táxons na CM durante o período analisado	56
Figura 10. Representação das classes de microalgas e cianobactérias registradas em P14.....	59
Figura 11. Classes de microalgas e cianobactérias, representadas em porcentagem, registradas em relação ao número de táxons em P14 durante o período analisado	60
Figura 12. Densidade total (ind.mL ⁻¹) de indivíduos pertencentes a diferentes classes encontradas em amostras de água dos pontos CM e P14 durante o período estudado.....	65
Figura 13. Registros de micrografia ilustrando os representantes das microalgas e cianobactérias encontradas somente no ponto CM da UDC/INB	67
Figura 14. Registro de micrografia ilustrando <i>Peridinium</i> sp, dinoflagelado registrado em elevadas densidades em P14	77

Figura 15. Registro de micrografia ilustrando alguns representantes das microalgas encontradas nos pontos CM e P14.....	78
Figura 16. Quantidades de patentes depositadas no período de 2017 a 2022, colocando-se o termo de busca “ <i>microalgae</i> ” na plataforma WIPO	90
Figura 17. Quantidades de patentes de interesse depositadas no período de 2017 a 2022, utilizando-se o termo de busca “ <i>microalgae</i> ” na plataforma WIPO.....	91
Figura 18. Representação da quantidade de patentes envolvendo microalgas que foram depositadas entre 2017 a 2022, relacionando a quantidade de patentes na área de interesse e a quantidade total, em termos de porcentagem.....	92
Figura 19. Países nos quais as patentes de interesse foram depositadas	93
Figura 20. Quantidade de patentes com os principais assuntos abordados dentro da área de interesse	94

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Efeitos que alguns metais pesados desempenham da saúde humana.....	34
Tabela 2. Métodos comumente usados na remoção de metais pesados	36
Tabela 3. Valores mínimos e máximos das variáveis físico-químicas registradas em amostras da CM na UDC/INB e em P14 na Represa das Antas, obtidas de Azevedo et al. (2010) e Ferrari et al. (2015)	47
Tabela 4. Valores de densidade dos indivíduos pertencentes a comunidade de microalgas e cianobactérias representada por classes taxonômicas em amostras de água provenientes da CM nos diferentes meses	56
Tabela 5. Valores de densidade dos indivíduos pertencentes a comunidade de microalgas e cianobactérias representada por classes taxonômicas em amostras de água provenientes de P14 nos diferentes meses	61
Tabela 6. Representantes de microalgas e cianobactérias pertencentes às classes registradas no presente estudo	62

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

UDC – Unidade de Descomissionamento de Caldas

INB – Indústrias Nucleares do Brasil

DAM – Drenagem Ácida de Mina

LAPOC/CNEN – Laboratório de Poços de Caldas/Comissão Nacional de Energia Nuclear

CM – Cava da Mina

P14 – Ponto 14

Eh – Potencial Redox

DQO – Demanda Química de Oxigênio

DBO – Demanda Biológica de Oxigênio

IBRAM – Instituto Brasileiro de Mineração

CONAMA – Conselho Nacional do Meio Ambiente

CIPC – Complexo Industrial de Poços de Caldas

PRAD – Plano de Recuperação de Áreas Degradadas

IBAMA – Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis

BNDES - Banco Nacional de Desenvolvimento Econômico e Social

UNESC - Universidade do Extremo Sul Catarinense

LISTA DE SÍMBOLOS

SO_4^{2-} - Sulfato

Fe_{total} – Ferro total

Ca – Cálcio

U – Urânio

Al - Alumínio

Mn - Manganês

F⁻ - Flúor

Zn - Zinco

FeS_2 – Sulfeto de Ferro - pirita

H_2O - Água

O_2 - Oxigênio

CO_2 – Dióxido de Carbono

H_2SO_4 – Ácido Sulfúrico

Ce - Cério

Hg - Mercúrio

Cd - Cádmio

Cu - Cobre

Pb - Chumbo

Co - Cobalto

Mo - Molibdênio

Ni - Níquel

Th - Tório

Ba - Bário

Ra - Rádío

NO_3 - Nitrato

As – Arsênio

Cr – Cromo

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	20
2 REVISÃO DE LITERATURA	25
2.1 Mineração no Brasil.....	25
2.2 Unidade de Descomissionamento de Caldas – UDC	26
2.3 Áreas de mineração de urânio desativadas	29
2.4 Drenagem Ácida de Mina – DAM	30
2.5 Tratamento da DAM	32
2.6 Efeitos da DAM nos seres vivos.....	33
2.7 Biorremediação de ambientes contaminados com urânio e metais pesados	36
2.8 Aplicação de microalgas em processos de biorremediação.....	37
3 OBJETIVOS	41
4 MATERIAL E MÉTODOS	42
4.1 Plano geral do trabalho	42
4.2 Pontos escolhidos para tratamento dos dados.....	43
4.3 Tratamento dos dados.....	45
4.4 Identificação de espécies com potencial biotecnológico	45
4.5 Busca de patentes.....	45
4.6 Aplicações industriais das microalgas.....	46
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	46
5.1 Dados obtidos dos pontos CM e P14 quanto às variáveis físico-químicas	46
5.2 Dados obtidos dos pontos CM e P14 quanto às variáveis biológicas	52
5.2.1 Cava da mina – ponto CM.....	52
5.2.2 Represa das Antas – Ponto 14.....	57
5.2.3 Comparação entre os pontos CM e P14	61
5.2.3 Organismos encontrados somente em CM	65
5.2.4 Organismos encontrados em P14.....	75

5.2.5 Organismos encontrados em ambos os pontos	77
5.3 Potencial biotecnológico do fitoplâncton em ambientes extremos	81
5.3.1 <i>Chlamydomonas</i> sp.....	82
5.3.2 <i>Desmodesmus</i> sp.....	86
5.3.3 <i>Botryococcus</i> sp.....	88
5.3.4 <i>Euglena</i> sp.	89
5.4 Prospecção tecnológica – busca de patentes	90
5.5 Aplicações industriais das microalgas.....	95
6 CONCLUSÃO	98
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	100

1 INTRODUÇÃO

Na região do Planalto de Poços de Caldas, em Minas Gerais, está localizada a primeira mina de extração de minério de urânio a ter sua jazida explorada no Brasil. Essa mina recebeu o nome de Mina Osamu Utsumi e teve suas jazidas exploradas no período de 1982 a 1995, pela Unidade de Tratamento de Minérios das Indústrias Nucleares do Brasil – UTM/INB (CIPRIANI, 2002), atualmente denominada Unidade de Descomissionamento de Caldas, UDC/INB.

Sabe-se que qualquer atividade de mineração tem o potencial de causar impactos ambientais e, no caso da mineração de urânio, existem também os impactos radiológicos somados aos impactos convencionais.

Na UDC/INB, as pilhas de rejeitos de minérios com teor de urânio abaixo de 200 mg/kg, chamados de bota-foras, são as principais fontes de contaminação ao ambiente, através da geração de drenagem ácida de mina que acarretam baixos valores de pH e altas concentrações de ferro, sulfato, urânio, manganês e zinco (FRANKLIN, 2007).

Assim, mesmo com o encerramento das atividades de mineração na UDC, os impactos ambientais continuam a existir. Em relação às minas de urânio, materiais radioativos presentes nos locais em decorrência da exploração e elevadas concentrações de metais são uma das principais preocupações (ANTUNES; PEREIRA; GONÇALVES, 2007a). Em vista disso, recentemente, as áreas de mineração e produção de concentrado de urânio têm sido consideradas como exemplos de ambientes antropogênicos extremos no mundo: devido à ocorrência de toxicidade do metal urânio, bem como à elevada solubilidade e mobilidade de algumas espécies químicas de urânio no meio ambiente. Além disso, é comum efluentes de minas de urânio apresentarem drenagem ácida de mina (DAM), apresentando concomitantemente elevadas concentrações de metais dissolvidos e radioatividade (BASELGA-CERVERA et al., 2020).

Esses ambientes antropogênicos extremos, como nos casos com DAM, são locais interessantes para estudos de biodiversidade, pois são ambientes que causam estresse à maioria dos organismos, já que apresentam baixos valores de pH e alta solubilidade de metais, entre outros. Dessa forma, os organismos que são capazes

de viver em ambientes com DAM são geralmente chamados de acidofílicos ou ácido-tolerantes (VALENTE; GOMES, 2007). Dentre esses organismos, têm-se destacado as microalgas e a investigação destes organismos fotossintetizantes tolerantes vem ganhando importância no cenário atual de mudanças ambientais globais, podendo contribuir com conhecimento básico de mecanismos adaptativos, biogeografia funcional, cadeias alimentares, bem como de potencial biotecnológico para biorremediação e tecnologias aplicadas (BASELGA-CERVERA et al., 2020).

Atualmente, a UDC/INB encontra-se em fase de fechamento e o Brasil ainda não dispõe de tecnologia nem experiência sistematizada na remediação e descomissionamento de minas e usinas de urânio. Dessa forma, os principais riscos relacionados ao projeto de descomissionamento no local decorrem da insuficiência de informações que possibilitem a realização de um diagnóstico que seja adequadamente viável. Para contornar este problema, são necessários estudos adicionais para avaliar a viabilidade das medidas adotadas para o descomissionamento. Em geral, são levados em consideração estudos nas áreas de hidrologia, geoquímica, hidroquímica e radioproteção (INB, 2020), não sendo considerados estudos biológicos, como os de biorremediação ou biotratamentos. Sendo assim, o desenvolvimento de estudos na área de biorremediação neste local se tornam bastante promissores. A biorremediação está relacionada com o uso de organismos vivos para reduzir os poluentes ambientais a formas menos tóxicas, e é tida como um método alternativo para remoção de íons de metais pesados de áreas poluídas. Existem várias técnicas de biorremediação, como bioissorção, compostagem, biofiltros, bioacumulação, entre outras (SIDDIQUEE et al., 2015).

Ainda no que diz respeito às atividades de mineração de urânio, elas são conhecidas por terem potencial de liberar radionuclídeos, além de outros metais estáveis em corpos aquáticos situados próximos a essas áreas, ocasionando modificações nas características químicas e biológicas do ambiente (ANTUNES et al., 2007b). Isto pôde ser observado na pesquisa de Ronqui (2008), que analisou os efeitos ambientais causados pelos efluentes tratados provenientes da UDC na Represa das Antas, represa localizada ao entorno da UDC, e percebeu que foram lançados efluentes fora dos padrões especificados pela legislação vigente para água de Classe II (CONAMA 357/2005). Isto se refletiu diretamente nos índices biológicos do mesmo estudo, pois no ponto em que os efluentes foram lançados na Represa das

Antas, foram verificados os menores valores de densidade e biomassa de protozoários ciliados e da microalga dinoflagelada *Peridinium* sp. Sendo assim, esta autora verificou que o lançamento destes efluentes neste ecossistema estaria levando a possíveis efeitos ambientais desfavoráveis (RONQUI, 2008).

Um dos problemas ambientais de maior destaque no local é a ocorrência da drenagem ácida de mina - DAM. No caso da UDC, rejeitos de minério de baixo teor de urânio nas pilhas de rejeitos de mineração (“bota foras”) associados ao sulfeto de ferro - a pirita (FeS_2) -, em presença de água e oxigênio propiciam condições adequadas para a ocorrência da DAM, levando a formação de efluentes ácidos radioativos. As águas de surgência dos bota foras de número 4 e 8 são as principais fontes de drenagem ácida. Essas águas são canalizadas para as bacias BNF e BIA e depois, bombeadas para a unidade de tratamento com cal. O sobrenadante é bombeado para as bacias D3 e D4 e depois, para descarte, por gravidade, na bacia de Águas Claras, onde está localizada a Represa das Antas. O precipitado da unidade de tratamento, contendo majoritariamente SO_4 , Fe, Ca e U, é bombeado para a cava da mina (M. Nascimento, comunicação pessoal, 16 de fevereiro, 2022).

Ações regulatórias e de inspeção realizadas pela Comissão Nacional de Energia Nuclear - CNEN na UDC, têm apontado a existência de pontos críticos, os quais incluem questões relacionadas ao controle do lançamento de efluentes radioativos tratados, que carregam consigo uma mistura de metais estáveis e radioativos, principalmente em pontos de interface da UDC/INB com o meio ambiente.

Recentemente, documento publicado pela Agência Internacional de Energia Atômica - IAEA, o BSS GSR Part 3 (2014), aborda que a proteção do ambiente contra as radiações ionizantes deve incluir espécies não humanas, a fim de garantir a proteção dos bens e serviços ambientais. Nesse contexto, diferentes organizações internacionais têm reconhecido a necessidade de garantir que tanto os seres humanos quanto o meio ambiente em diferentes níveis de organização, estejam adequadamente protegidos dos efeitos das substâncias radioativas em locais sob influência de lançamentos controlados e/ou previstos de efluentes radioativos em instalações nucleares (ICRP-91, 2003; IAEA, 2006; OECD-NEA, 2007; ICRP-108, 2008; HINTON et.al., 2013).

Estudos realizados na UDC mostraram que, mesmo no efluente tratado, foram registradas elevadas concentrações de urânio, alumínio, manganês, flúor e zinco (FERRARI et al., 2017). Rodgher et al. (2013) também encontraram concentrações elevadas de sulfato, manganês e flúor no efluente tratado, no ponto em que é lançado na Bacia de Águas Claras e mostraram que este efluente é capaz de afetar a qualidade da água, indicando que os métodos de tratamento convencionais do efluente precisam ser revistos.

Ferrari et al. (2015), ao analisarem amostras de efluente não tratado, procedentes da cava da mina na UDC, notaram que estressores químicos como pH ácido e altas concentrações de contaminantes estáveis e radioativos, apresentaram potencial para influenciar a composição da comunidade zooplanctônica, onde os rotíferos apresentaram uma densidade maior do que os cladóceros. No trabalho destes autores, foram registradas as espécies *Keratella americana*, *K. cochlearis*, *Bosmidopsis deitersi* e *Bosmina* sp. pela primeira vez em ambiente impactado por DAM, indicando suas capacidades em colonizarem ambientes extremos (FERRARI et al., 2015).

Outro grupo de organismos capaz de tolerar concentrações elevadas de urânio são os fungos. No trabalho de Coelho (2019) foram identificadas cinco espécies fúngicas que se destacaram devido à alta resistência ao urânio encontrado na mina Osamu Utsumi e, além disso, apresentaram um ótimo potencial para remoção do urânio em meio aquoso, sendo muito importantes como microrganismos potenciais em ações de biorremediação (COELHO, 2019).

As microalgas também ganham destaque neste assunto. Pesquisadores em todo o mundo têm se dedicado a estudar microalgas em corpos aquáticos ácidos de origem antropogênica e com a ocorrência de DAM (KALIN et al., 2006; GARCÍA-BALBOA, et al., 2013; HERLORY et al., 2013; KUMAR et al., 2016; BASELGA-CERVERA, et al., 2018; BASELGA-CERVERA, et al., 2020; GOMES et al., 2021). No estudo de Kalin et al. (2006), foi demonstrado que, embora tenha ocorrido um declínio no número de táxons de microalgas ao longo de duas décadas estudando um ambiente contaminado por mineração de urânio, a diversidade restante ainda foi surpreendente apesar das condições químicas extremas, indicando que esses indivíduos são um componente essencial na abordagem da engenharia ecológica sustentável para restauração de áreas de gestão de rejeitos de mineração.

Apesar de já terem sido realizados diversos estudos na UDC, nenhum deles realizou análise da comunidade de microalgas com o propósito de levantar informações acerca de espécies com potencial biotecnológico em ações de remediação. Isso é de suma importância, visto que a DAM é um impacto de longo período de duração, implicando na necessidade de medidas permanentes de remediação (FRANKLIN, 2007).

Neste contexto, torna-se relevante avaliar alternativa de remediação para locais impactados pela DAM através do potencial de aplicação biotecnológica de espécies de microrganismos resistentes a drenagem ácida de mina. Isso pode ser feito por meio de biotratamentos, com a utilização de organismos capazes de realizar biossorção, como cianobactérias (MARQUES, 2006) e microalgas (FAVAS et al., 2019; KALIN et al., 2005; SALAMA et al., 2019). Dentre as microalgas extremofílicas acidofílicas, que podem ser isoladas facilmente de ambientes contaminados com DAM, podem-se destacar os gêneros: *Chlamydomonas*, *Euglena*, *Klebsormidium*, *Ochromonas*, *Pinnularia* e *Coccomyxa* (MALAVASI, SORU, CAO, 2020).

Neste contexto, o presente estudo foi realizado a fim de fornecer informações de bioprospecção com potencial biotecnológico, acerca da composição da comunidade de microalgas em ambiente antropogênico extremo, afetado por drenagem ácida em área de mineração de urânio, e comparar com as espécies encontradas em bacia hidrográfica que recebe os efluentes tratados vindos desta área.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Mineração no Brasil

O Brasil é um país com uma enorme riqueza mineral, tendo seus minérios explorados desde o Brasil Colônia. Com o passar dos anos, foram criadas empresas destinadas à exploração de toda essa riqueza. Sendo assim, o setor de mineração ganhou força novamente a partir de 1930, com ações do Poder Público visando seu fortalecimento (JÚNIOR, 2018).

Embora a mineração contribua significativamente para a economia nacional, levando ao superávit da balança comercial do país, ela apresenta riscos e impactos socioambientais. São essas as duas visões que prevalecem a respeito da mineração no país. Segundo o Instituto Brasileiro de Mineração, o IBRAM, (2014) “embora promova impactos na natureza, a mineração é uma das atividades produtivas mais sustentáveis”.

Entretanto, muitas vezes as áreas de exploração mineral são identificadas como responsáveis por afetar negativamente a qualidade ambiental de onde estão inseridas (SILVA, 2019). Infelizmente, têm ocorrido com frequência acidentes em áreas de mineração. No Brasil, o caso de Mariana em 2015 e Brumadinho em 2019, ambos em Minas Gerais, repercutiram no cenário mundial e representam grandes tragédias, com perdas de vidas humanas e enormes impactos ecológicos e socioeconômicos. Os impactos ambientais por contaminação de minérios podem estar relacionados à presença de compostos, como manganês, ferro, cobre, chumbo, que causam efeitos tóxicos em diversos grupos de organismos (COSTA, 2019).

No Brasil, as principais atividades de mineração que têm contribuído para a liberação de rejeitos que podem levar a contaminação do solo e da água por metais pesados, são os de interesse comercial, como níquel, ouro e ferro (MUNIZ, 2006).

No município de Poços de Caldas, além das empresas que realizam as atividades de mineração atualmente, existe uma grande preocupação em relação à mina de urânio (Osamu Utsumi) inativa localizada na região. Esta foi a primeira mina de urânio a ser explorada no Brasil e é localizada nas dependências do Complexo Unidade de Tratamento de Minérios das Indústrias Nucleares do Brasil (UTM/INB), denominado atualmente de Unidade de Descomissionamento de Caldas - UDC. As atividades de mineração no local tiveram início em 1982 e término em 1995. Porém,

o descomissionamento e o encerramento total das atividades nesta área são limitados, devido à geração da Drenagem Ácida de Mina (DAM), considerada como um dos principais impactos ambientais negativos, que provoca degradação da qualidade de águas superficiais e subterrâneas, solos e sedimentos. Além de Caldas e Poços de Caldas (MG), outros municípios também sofrem com o problema da DAM aqui no Brasil, como Serra do Navio (AP), Boquira (BA), Santo Amaro (BA) (ARAÚJO, 2016). A drenagem ácida de mina geralmente ocorre devido à presença de metais contendo sulfetos, principalmente pirita, associados com matrizes de rochas, que ao entrar em contato com água e oxigênio, geram ácido sulfúrico. Este, por sua vez, quando se dilui em água, leva à solubilização dos minerais, caracterizando um efluente com alta acidez (FERRARI, 2010).

No que diz respeito à toxicidade de metais, incluindo o metal radioativo urânio, cabe ressaltar que a mesma pode variar de acordo com a espécie aquática, devido às características intrínsecas de cada espécie e/ou aos genótipos diferentes da mesma espécie (BAIRD et al., 1991), bem como com as condições ambientais relacionadas à qualidade da água (exemplo: dureza, pH, alcalinidade, matéria orgânica dissolvida), que tendem a afetar grandemente a especiação química e assim, a biodisponibilidade dos metais estáveis e radioativos no ambiente.

No cenário atual, é muito importante a preservação do ecossistema como um todo, incluindo variáveis de qualidade química da água e englobando os seres humanos, os animais, as plantas, enfim, todas as formas de vida. Sendo assim, é de extrema importância a identificação de possíveis riscos ambientais e a adoção de medidas para mitigar estes impactos.

2.2 Unidade de Descomissionamento de Caldas – UDC

A mina de urânio Osamu Utsumi foi a primeira mina de urânio a ser explorada no Brasil, com início de operação pela INB no ano de 1982. Na época, o local era chamado de Complexo Mínero-Industrial do Planalto de Poços de Caldas (CIPC). Devido à pouca demanda e custos elevados de produção, de 1990 a 1992 as atividades foram paralisadas, sendo retomadas em 1993. Em outubro de 1995, as atividades foram definitivamente encerradas. Ao longo dos 13 anos de exploração não contínua, foram geradas aproximadamente 1241 toneladas de urânio (MAJDALANI, 2001). A quantidade de urânio produzida correspondeu a apenas 22% da capacidade

da Instalação, o que evidencia um projeto mínero-industrial com problemas, como mal conhecimento da mineralização e jazidas em questão (CIPRIANI, 2002). Por se localizar em uma região que já apresenta elevada radioatividade natural, devido às rochas vulcânicas e depósitos de minerais de urânio, isso tem despertado o interesse de pesquisadores de diversas áreas (FERRARI, 2010).

Atualmente, o local é chamado de UDC/INB e está localizado no Planalto de Poços de Caldas, o qual corresponde a uma das maiores intrusões alcalinas do mundo, e está localizado a uma altitude média de 1300 metros. A região é drenada por duas principais bacias hidrográficas: a Bacia de Águas Claras (que compreende o Ribeirão das Antas) e o Rio Verde, e ambas recebem efluentes da área de mineração da UDC. O Ribeirão das Antas é responsável por drenar cerca de 70% do Planalto e abastecer a principal represa da cidade de Poços de Caldas, a Represa Bortolan, a qual é utilizada pela população para recreação, passeios de barco e pesca. Além disso, as águas deste Ribeirão também são utilizadas para irrigação de culturas. Ao redor da instalação havia uma baixa densidade populacional e uma alta densidade de fazendas (AMARAL, 1985; CIPRIANI, 2002).

O efluente tratado proveniente da UDC é lançado diretamente no Reservatório das Antas na mesma taxa tanto na estação seca quanto chuvosa, correspondendo a um volume de $2,6 \times 10^6$ m³/ano. Este reservatório possui um fluxo de água unidirecional (FERRARI, 2017) e é tido como um ambiente oligotrófico (RODGHER, 2013). É um reservatório com uma área de drenagem de 51 km², comprimento máximo de 3500 metros, média de 4 metros de profundidade, volume de $3,9 \times 10^6$ m³ e vazão de 9,52 m³/s (INB, 1999 apud. FERRARI, 2017).

Na região, o clima é caracterizado por dois períodos bem marcantes: intensa pluviosidade e temperaturas brandas (de outubro a março) e intensa estiagem e temperaturas baixas (abril a setembro) (CIPRIANI, 2002). Em relação ao clima, a região é caracterizada, de acordo com o critério de Köppen, como Cwb, pertencendo ao grupo A, característico de climas tropicais e quentes, e ao grupo C, com condições mesotérmicas, marcando um verão quente e chuvoso e um inverno seco e frio (ZUQUETTE, 2009). A média anual de temperatura é em torno de 19°C e a precipitação máxima é de 1700mm (FERNANDES, 1998).

Atualmente, o Complexo encontra-se em fase de descomissionamento. Durante os anos do seu funcionamento, foram produzidos concentrados de urânio suficientes para o suprimento de combustível ao reator de Angra I. Além disso, por ter

sido o primeiro complexo de mineração de urânio explorado no Brasil, foi possível que a indústria brasileira iniciasse a produção de concentrado de urânio na forma de diuranato de amônia, também conhecido como *yellow cake*, e o desenvolvimento da tecnologia do ciclo do combustível nuclear (FLORES, 2006).

Esta área destinada a mineração do urânio era constituída por: cava da mina a céu aberto, na qual eram extraídos os minérios; pilhas de material estéril; áreas de beneficiamento físico e estocagem do minério; área de beneficiamento químico do minério e produção do concentrado de urânio; bacia de rejeitos; depósito de materiais radioativos; área para tratamento de efluentes vindos da produção do concentrado de urânio; área para tratamento de água contaminada; estocagem de insumos; fábrica de ácido sulfúrico e instalações administrativas (FLORES, 2006; NASCIMENTO, 1988).

Atualmente, as atividades de mineração não ocorrem no local há bastante tempo, estando em operação apenas a unidade de tratamento de efluentes cujo processo será descrito posteriormente com mais detalhes. Além disso, estão em andamento projetos de Descomissionamento e o Programa de Recuperação Ambiental de Áreas Degradadas (PRAD). Atualmente, os principais riscos relacionados ao projeto de descomissionamento decorrem da insuficiência de informações que possibilitem a realização de um estudo que seja adequadamente viável, e, para contornar este problema, são necessários estudos adicionais que possam avaliar a viabilidade das medidas adotadas para o descomissionamento. O PRAD tem como objetivo a recuperação ambiental de toda a área que abrigava o antigo complexo, sendo elas a cava da mina, instalações industriais, barragem de rejeitos e as pilhas de rejeitos de mineração de onde foi retirado o urânio (INB, 2020).

Além disso, os principais problemas enfrentados pela INB para o descomissionamento da mina são as concentrações elevadas de metais e radionuclídeos nas bacias de rejeitos, contaminação de flúor, urânio, manganês e sulfato (SOUZA, SILVEIRA, PEREIRA, 2013).

A INB afirma que as atividades desenvolvidas em Caldas eram todas regulamentadas por órgãos de controle ambiental. Sendo assim, ao emitirem as licenças para as atividades operacionais no local, a CNEN e o IBAMA, estabeleceram medidas também para o pós atividades operacionais. Dentre essas medidas estavam que a INB deveria promover o descomissionamento das unidades após o processo produtivo, com o objetivo de desenvolver a área para outras finalidades. O plano de

descomissionamento inclui: desmontagem e descontaminação de instalações e equipamentos, segregação e destinação final de resíduos e recuperação de áreas degradadas (INB, 2020).

Somente dez anos após o fim das atividades de mineração de urânio em Caldas, foram iniciados os projetos para a descontaminação de suas instalações e terrenos (INB, 2020).

2.3 Áreas de mineração de urânio desativadas

Por muito tempo, as preocupações acerca da toxicidade química e radiológica do urânio estavam concentradas no ponto de vista da sua ocorrência natural e relacionados com a saúde humana, na qual tem o poder de causar sérios prejuízos quando inalado e/ou ingerido (BLEISE, 2003). Assim, pouca importância era dada quanto à proteção radiológica ambiental. Entretanto, recentemente diversas organizações internacionais passaram a reconhecer a importância de se proteger também o meio ambiente, em seus diferentes níveis de organização, frente aos impactos da radiação ionizante proveniente de instalações nucleares, através de lançamentos controlados e/ou previstos de efluentes radioativos (ICRP-91, 2003; IAEA, 2006; ICRP-108, 2008; OECD-NEA, 2007).

Assim, com o objetivo de atender aos interesses da proteção radiológica de espécies não humanas, são necessários estudos visando determinar doses e taxas de doses seguras de radiação ionizante e/ou concentrações de radionuclídeos para a manutenção da biota (ICRP-91, 2003).

O Urânio é um elemento de ocorrência natural na crosta terrestre, estando presente em rochas, solo, águas superficiais e subterrâneas, ar, animais e plantas. Sendo assim, ocorre também em muitos alimentos e água potável, mesmo que em quantidades vestigiais. Em sua forma natural, geralmente contém três isótopos, ^{238}U , ^{235}U e ^{234}U , todos radioativos, porém as propriedades radioativas diferem entre eles, dependendo da sua meia-vida. Quanto maior a sua meia-vida, menor a atividade específica. Todos os isótopos naturais de urânio emitem partículas alfa, mas no seu processo de decaimento, são emitidas também partículas beta e gama. Na natureza, o urânio está em equilíbrio secular com os seus filhos de decaimento. Populações que vivem próximas às minas de urânio desativadas são expostas à radiação dos produtos de decaimento do urânio, como por exemplo o Radônio (^{222}Rn), gás nobre que, pode

facilmente se desprender de rochas e solos, e gera grande preocupação mundial, visto que é responsável por causar o câncer de pulmão, que aparecerá anos depois da exposição. Embora exista esta grande preocupação com os riscos de toxicidade radiológica da exposição ao urânio, os riscos ecotoxicológicos são ainda maiores, pois o urânio é solúvel em diversos ecossistemas (BLEISE, 2003; MKANDAWIRE, 2013).

Instalações destinadas a mineração de urânio, mesmo quando as atividades de mineração já foram encerradas, ainda continuam gerando impactos ambientais no local de mineração e fora dele, devido à exposição a altas concentrações de substâncias radioativas e metais (LOZANO, 2000).

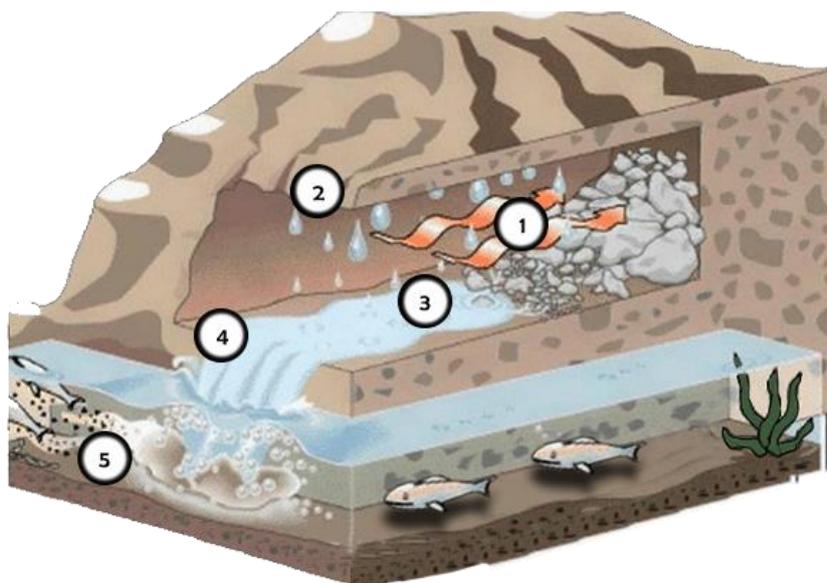
Na literatura, existem poucos estudos sobre o impacto dos efluentes tratados de áreas de mineração em ambientes aquáticos, mas é importante que os operadores de minas estejam cientes de todos os potenciais riscos ambientais destas águas tratadas, pois ainda podem apresentar contaminantes residuais que podem estar em concentrações tóxicas para muitos organismos. Então, todos esses problemas devem ser considerados durante o desenvolvimento de estratégias para tratamento e descarte dos efluentes (HARFORD, 2015).

2.4 Drenagem Ácida de Mina – DAM

Quando se trata de mineração, o principal problema ambiental que se apresenta é a DAM. Na UDC, a DAM ocorre devido à oxidação natural do sulfeto metálico pirita (FeS_2) que, ao entrar em contato com H_2O e O_2 , forma H_2SO_4 e este quando se dilui na água, leva à solubilização dos minerais existentes na rocha, o que caracteriza um efluente com alta acidez e altos teores de ferro, sulfato e metais traços como manganês, zinco e urânio (FERRARI, 2010; FRANKLIN, 2007).

Abaixo, tem-se um esquema mostrando como ocorre a DAM (Figura 1).

Figura 1 - Representação de como ocorre a DAM. Para que ocorra a DAM, é necessário que haja infiltração de água, juntamente com exposição das rochas de mineração ao oxigênio, seguida de uma reação química entre a água, o oxigênio e o sulfeto metálico presente nas rochas, levando a formação de ácido sulfúrico. Este, por sua vez, quando se dilui em água, solubiliza os metais ali existentes, caracterizando um efluente ácido.



Fonte: Adaptado de Steve Thomas Post-gazette.

Como pode ser observado na figura acima, para que a DAM ocorra é necessário que:

- 1- Pilhas de rochas da mineração sejam expostas ao oxigênio
- 2 - Ocorra a infiltração da água, para que entre em contato com as rochas
- 3 - Ocorra a reação química entre a água, o oxigênio e sulfeto metálico, formando ácido sulfúrico
- 4 – O ácido sulfúrico se dilua na água, dissolvendo os metais ali existentes
- 5 – Logo, os efluentes gerados são ácidos e contaminam o ambiente, trazendo riscos à biota aquática.

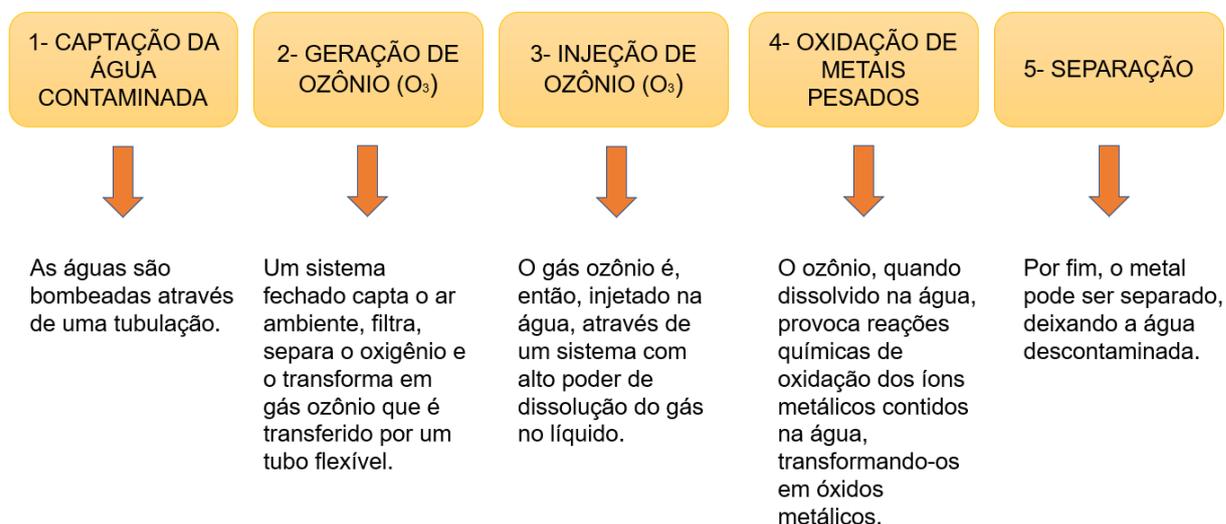
Na DAM temos a presença de uma variedade de metais dissolvidos que, em geral, podem apresentar inúmeros efeitos tóxicos agudos ou crônicos a muitos organismos (SIMATE, NDVOLU, 2014).

2.5 Tratamento da DAM

Em locais com a ocorrência de DAM ocorre a produção de águas ácidas que precisam ser tratadas antes de serem lançadas no corpo aquático ao redor. Os tratamentos convencionais mais utilizados são aqueles baseados na neutralização da DAM através da adição de óxido de cálcio ou carbonato de cálcio. Dessa forma, ocorre uma elevação no pH e a precipitação dos metais. No caso da UDC, o tratamento é feito da seguinte forma: as águas ácidas são neutralizadas com hidróxido de cálcio para que o pH se eleve e os contaminantes sejam precipitados. Após sua neutralização, as águas são enviadas para bacias de decantação e são adicionados floculantes, que vão aglutinar os sólidos em suspensão. Em seguida, o sobrenadante – água limpa isenta de U, Fe, Al e Mn - é liberado para o meio ambiente. Neste processo de tratamento, são utilizadas quantidades bastante elevadas de cal para elevar o pH, principalmente pelo fato de o Mn ser removido da água somente em pH acima de 10,5 (SILVA, 2016). Esse sistema tradicionalmente empregado para remoção de Mn destas águas ácidas, por meio de precipitação na forma de hidróxidos, implica em um alto custo operacional e em adição de produtos químicos que apresentam toxicidade para a vida aquática (BAROLLI et al., 2016).

Sendo assim, diante deste problema ambiental, autores têm se dedicado a estudar formas alternativas para eficiente tratamento da DAM. Silva (2016) estudou uma opção de tratamento envolvendo a oxidação com ozônio, no qual foi possível observar que a adição contínua de ozônio em meio onde existe Mn leva à formação do íon solúvel permanganato e, devido ao elevado potencial eletroquímico de redução do ozônio, foi possível a precipitação do Mn em soluções ácidas, o que faz com que não seja necessária sua remoção através do consumo de grandes quantidades de cal hidratada adicionada. Além do Mn, testes com ozônio também se mostraram extremamente eficientes na remoção de Fe e Ce em até 99%. Com esse tratamento, as concentrações de Mn ficaram abaixo dos limites estabelecidos pelo CONAMA 430 e 357, que corresponde a 1,0 mg/L para o lançamento de efluentes. Consequentemente, os tratamentos com ozônio se mostraram uma solução ambientalmente adequada e que pode se estender às outras minas que também sofram com o impacto da DAM (SILVA, 2016). Esse tratamento com ozônio é feito da seguinte forma:

Figura 2 - Fluxograma mostrando como é feito o tratamento com ozônio nos efluentes da UDC/INB.



Fonte: Informações extraídas de ERENO (2013).

Barolli et al. (2016) também estudaram a aplicação de ozônio para o tratamento da DAM na INB e viram que ele realmente é capaz de tratar de maneira eficaz a DAM de águas com pH baixo, concentrações elevadas de Mn e Fe, e outros metais. Após tratamento com ozônio, esses autores verificaram uma redução na concentração de Mn de 20 – 89mg/L para abaixo de 1,0 mg/L. Atualmente, a UDC/INB está dedicada a realizar o descomissionamento da área, e desenvolve um projeto com o objetivo de descontaminar as águas superficiais provenientes da DAM e esse tratamento se faz por meio da injeção de ozônio para oxidação de metais pesados. Após oxidação desses metais, estes serão retirados para serem aproveitados para outros fins posteriormente.

Hoje na INB estão em andamento projetos de Descomissionamento e o PRAD, conforme já foi falado anteriormente.

2.6 Efeitos da DAM nos seres vivos

Existem muitas pesquisas que documentam o impacto da DAM nos ecossistemas, mas pouco se sabe sobre o impacto da DAM diretamente na saúde humana. O que se sabe é que, para que os humanos sejam afetados pela DAM, primeiro eles precisam ser expostos aos contaminantes da DAM e isso pode

acontecer através de uma exposição direta, como pessoas nadando em águas contaminadas ou pisando em solos, consumindo essas águas contaminadas, ou por meio de uma exposição indireta através da acumulação de metais ao longo da cadeia alimentar. O que se sabe é que muitos componentes e poluentes da DAM, como arsênio, cianeto, mercúrio, chumbo e urânio, são prejudiciais à saúde humana causando várias doenças (GARLAND, 2011).

Os metais existentes na DAM podem ter muitos efeitos na saúde humana, alguns retratados na tabela abaixo, segundo SIMATE, NDVOLU (2014).

Tabela 1 - Efeitos que alguns metais pesados desempenham na saúde humana.

Metal pesado	Efeitos na saúde humana
Mn	Danos no Sistema Nervoso Central – SNC, quando em contato ou inalado
Cd	Doenças pulmonares, aumento da pressão sanguínea, disfunções renais
Hg	Danos no sistema nervoso
Cu	Danos nos rins e no fígado, anemia
Pb	Retardo mental em crianças, danos agudos ou crônicos no sistema nervoso

Fonte: SIMATE, NDVOLU (2014)

Com relação à vida aquática, os metais, mesmo em quantidades muito pequenas, podem causar danos irreversíveis. Dentre os metais pesados que são responsáveis por causar toxicidade aos organismos aquáticos, podemos citar cádmio, cobre, chumbo e zinco, entre outros. No trabalho de Ferrari et al. (2017), os autores verificaram, por meio de ensaios de toxicidade aguda com microcrustáceos, que os efluentes tratados provenientes da UDC apresentaram elevadas concentrações de U, Mn, Al, Zn e fluoreto, caracterizando este efluente como tóxico a estes organismos.

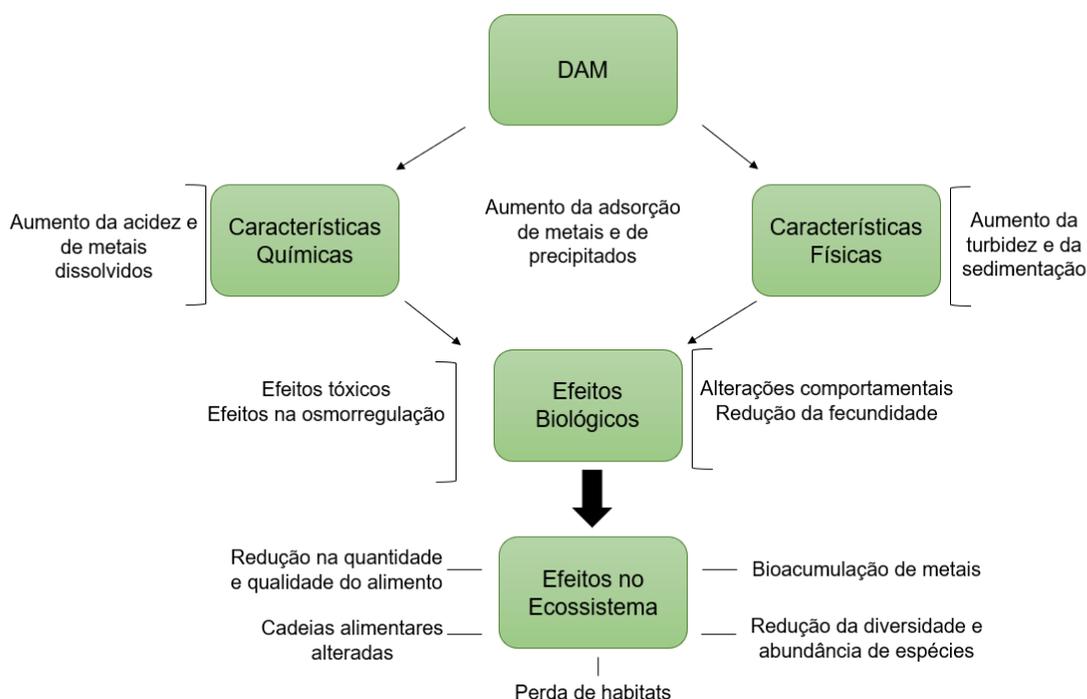
Além disso, os organismos aquáticos podem absorver os contaminantes diretamente da água ou por meio da cadeia alimentar também. Dentre os efeitos tóxicos neste grupo de organismos, podemos citar redução na taxa de crescimento, desenvolvimento de anomalias, imobilidade e até mesmo efeitos letais (KHAYATZADEH, ABBASI, 2010). Ainda, em meio aquoso, os metais pesados podem estimular a formação de espécies reativas de oxigênio, que podem causar danos aos

peixes e outras espécies aquáticas (JIWAN, KALAMDHAD, 2011). No que diz respeito à cadeia alimentar, o consumo de peixes com altos níveis de metais, como por exemplo, Hg, pode trazer riscos à saúde humana (JIWAN, KALAMDHAD, 2011).

Quanto às plantas, assim como todos os outros organismos, alguns íons metálicos são essenciais como micronutrientes para o crescimento, como Co, Cu, Fe, Mn, Mo, Ni e Zn (JIWAN, KALAMDHAD, 2011) porém em concentração acima da considerada necessária trazem danos, como por exemplo, efeitos em processos fisiológicos, no qual metais como Cd, Ni e Cu podem afetar as funções fotossintéticas das plantas (SHARMA, AGRAWAL, 2004).

Para ilustrar, os efeitos da DAM estão esquematizados no fluxograma abaixo, representado na figura 3, segundo Bray (2007).

Figura 3 - Fluxograma com as características químicas e físicas da DAM, bem como seus efeitos biológicos e no ecossistema.



Fonte: Adaptado de Bray (2007).

2.7 Biorremediação de ambientes contaminados com urânio e metais pesados

Os procedimentos comumente usados para remoção de metais de ambientes aquosos normalmente incluem precipitação química, osmose reversa, troca iônica, ultrafiltração, eletrodialise e fitorremediação (AHALYA et al., 2003). A tabela 2 explica resumidamente cada um destes métodos.

Tabela 2 - Métodos comumente usados na remoção de metais pesados.

MÉTODO	FUNCIONAMENTO
OSMOSE REVERSA	Os metais são separados por uma membrana semi-permeável devido a aplicação de uma pressão mais elevada do que a pressão osmótica causada pelos sólidos dissolvidos na água.
ELETRODIÁLISE	Acontece devido a um processo de separação eletroquímica dos íons dos metais pesados através do uso de membranas de troca iônica seletivas.
ULTRAFILTRAÇÃO	Os sólidos passam através de uma membrana semipermeável acionadas por pressão, são capturados e descartados.
TROCA IÔNICA	Íons metálicos de soluções são trocados com íons mantidos por forças eletrostáticas em uma resina de troca.
PRECIPITAÇÃO QUÍMICA	Precipitação dos metais através da adição de coagulantes como cal, sais de ferro, entre outros.
FITORREMEDIAÇÃO	Uso de plantas para remediação de solos, sedimentos e águas contaminadas com metais.

Fonte: AHALYA et al., 2003.

Entretanto, todos estes métodos apresentam inúmeras desvantagens, como alto custo, alta necessidade de reagentes e energia, remoção incompleta do metal,

geração de lodo tóxico que também irão necessitar de tratamento, entre outros (AHALYA et al., 2003).

Além do que já foi dito anteriormente de que as técnicas convencionais de descontaminação de áreas afetadas por urânio e outros metais são caras, elas ainda são, muitas vezes, ineficientes, principalmente quando as concentrações dos metais estão abaixo de 100 mg/L. No caso de espécies químicas radioativas é comum ocorrerem baixas concentrações químicas do elemento de interesse, mas que apresentem elevadas concentrações de atividades de radiação. Para solucionar este desafio, o emprego de microrganismos como algas, fungos e bactérias pode vir a ser a melhor opção, visto que estes organismos possuem propriedades celulares que os tornam capazes de interagir com estes metais pesados, mesmo quando estão em baixas concentrações. Além disso, processos diferentes podem ser usados de acordo com cada tipo de contaminação, da área contaminada e também do microrganismo que será empregado. Sendo assim, o principal objetivo da biorremediação para a área da biotecnologia ambiental é desenvolver rotas tecnológicas viáveis e de poucos impactos ambientais, que solucionem um determinado problema ambiental (LEMOS et al., 2008).

Com relação a ambientes contaminados com urânio, o principal objetivo da biorremediação é fazer com que ele se torne menos propenso a mover-se com águas subterrâneas, de modo a evitar a contaminação dos ambientes no entorno (MADIGAN et al., 2018).

Existem várias alternativas para remediar ambientes contaminados com urânio, sendo os métodos passivos e *in situ* os mais econômicos e menos prejudiciais ao meio ambiente (FAVAS et al., 2019).

2.8 Aplicação de microalgas em processos de biorremediação

É comum o uso de microalgas como bioindicadores de qualidade ambiental em áreas afetadas por mineração de urânio, além também de serem muito úteis em processos de remediação, como será mostrado mais adiante neste trabalho. Os ensaios com algas são ecologicamente significativos, pois sendo produtores primários, estes organismos desempenham um papel muito importante nas cadeias alimentares aquáticas.

García-Balboa (2013) analisou águas residuais com baixos valores de pH, altas concentrações de urânio e outros metais provenientes de antiga área de mineração de Urânio em Salamanca (Espanha), utilizando duas espécies de microalgas nos testes de toxicidade, *Chlamydomonas reinhardtii* e *Dictyosphaerium chlorelloides*. Como era esperado, as águas residuais foram extremamente tóxicas para as espécies de microalgas em questão, inibindo 100% seus crescimentos e matando as células em apenas algumas horas de exposição. Porém, ao analisarem a comunidade de microalgas da área, verificaram que existiam algumas espécies capazes de viver nestas águas residuais, indicando que provavelmente estas espécies passaram por algum processo de adaptação ao longo da sua evolução. Então, em um outro experimento, os mesmos autores incubaram adicionalmente as algas *C. reinhardtii* e *D. chlorelloides* por algumas semanas com a água residual e puderam notar que a densidade celular de algumas culturas aumentou novamente, devido ao aparecimento e crescimento de células resistentes ao efeito tóxico das águas residuais de mineração de urânio. Concluíram então, que espécies de Chlorophyta tem se tornado extremamente capazes de se adaptarem rapidamente às águas residuais vindas de mineração de urânio.

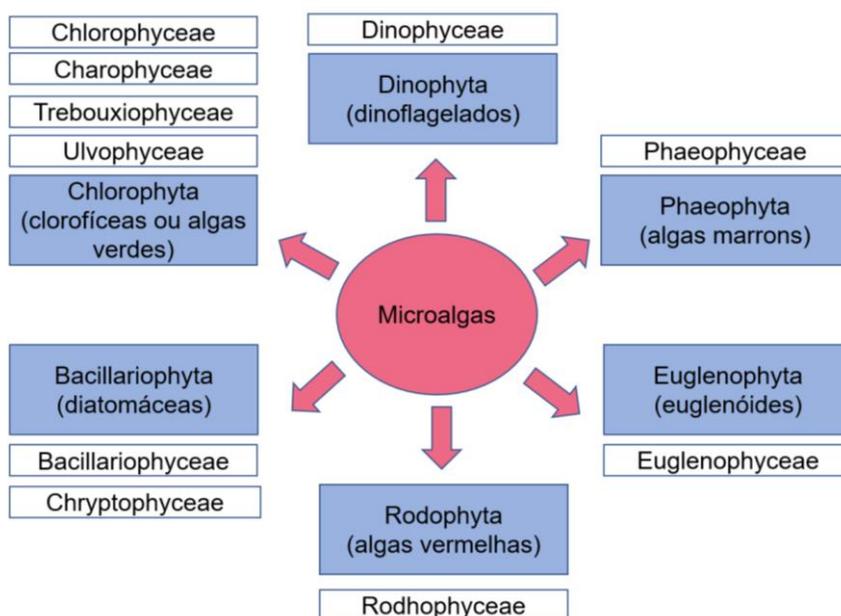
Outro estudo realizado em efluentes tratados de mineração de U foi feito por Herlory et al. (2013) em uma região da França, com o objetivo de verificar o potencial de bioindicação de diatomáceas para avaliar a qualidade das águas nas quais estes efluentes eram depositados. Como resultado, observaram mudanças na composição da comunidade de diatomáceas induzidas pelo lançamento de efluentes, onde identificaram espécies que foram sensíveis a este efluente e espécies que foram capazes de tolerar essas alterações ambientais. Este estudo mostra que as microalgas também podem ser utilizadas como uma ferramenta eficiente para biomonitoramento de ambientes afetados por urânio.

Além dessas questões de adaptação das microalgas a ambientes contendo urânio, elas também são importantíssimas nas questões de biorremediação. Atualmente, o emprego de algas para remoção, biotransformação ou tratamento de poluentes e/ou águas contaminadas é chamado de ficorremediação. Este é um método eficiente, de baixo custo e menos prejudicial ao ambiente do que a maioria dos métodos convencionais empregados (FAVAS et al., 2019).

Existem cerca de 50.000 espécies descritas de microalgas, e sua divisão é geralmente baseada nos pigmentos resultantes do seu metabolismo e na constituição

das suas paredes celulares, sendo através da estrutura celular a classificação mais comum (Ahmad et al., 2022). Na figura 4, estão representados os filões das microalgas com as principais classes pertencentes a cada filão.

Figura 4 - Classificação das microalgas nos seis filões: Dinophyta, Phaeophyta, Euglenophyta, Rodophyta, Bacillariophyta e Chlorophyta. Próximo de cada filão, estão representadas também suas principais classes.



Fonte: Adaptado de Ahmad et al., 2022.

As microalgas também compõem o fitoplâncton em ambientes aquáticos e são a base de muitas cadeias alimentares, desempenhando importantes papéis nos ecossistemas (WIPO, 2016).

Entre os microrganismos, as microalgas são de grande interesse para a engenharia ecológica devido à sua capacidade de remover metais, urânio e outros radionuclídeos de efluentes de mineração de urânio e águas residuais. Ou seja, possuem potencial biotecnológico, principalmente através da biorremediação de ambientes contaminados, além de serem uma alternativa sustentável (FAVAS et al., 2019; KALIN et al, 2005; SALAMA et al., 2019).

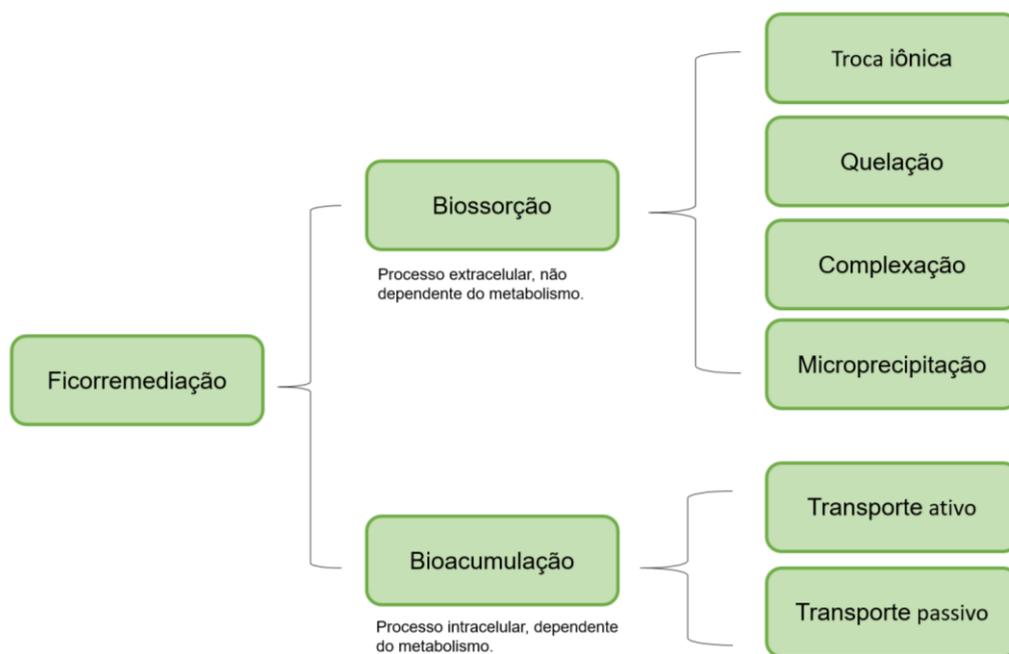
Um número muito grande de microalgas é tolerante a vários metais e o urânio pode ser associado a elas por adsorção às superfícies das células, adsorção a polissacarídeos extracelulares, absorção em células e incorporação em vacúolos,

incorporação em aragonita – CaCO_3 , estruturas associadas a algumas algas marinhas e de água doce, e precipitação na superfície celular ou internamente (KALIN et al., 2005).

Muitas microalgas são úteis na remoção de metais por meio de dois processos: biossorção e bioacumulação. A biossorção é um processo físico-químico no qual um material biológico concentra passivamente e liga a sua estrutura celular com o contaminante, que muitas vezes são os metais, com o objetivo de removê-los da solução aquosa. Biomassas de microrganismos como bactérias, fungos, algas e leveduras, são capazes de atuarem como biossorbentes, acumulando metais de forma eficiente. Esse processo de biossorção pode envolver os seguintes mecanismos: transporte através da membrana celular, complexação, troca iônica, precipitação e adsorção física (JAVANBAKHT, ALAVI, ZILOUEI, 2014). As microalgas são comumente usadas para estes processos devido a sua boa relação custo-benefício e alta capacidade e eficiência da adsorção de metais (UBANDO et al., 2021).

Logo, as microalgas realizam a remoção de metais de duas maneiras, como pode ser visto na figura 5: a primeira, é uma rápida adsorção extracelular passiva, a biossorção, e a segunda é uma difusão intracelular lenta, gerando um acúmulo, a bioacumulação. A parede celular das microalgas é composta principalmente por polissacarídeos (celulose e alginato), lipídeos e proteínas orgânicas, os quais fornecem diversos grupos funcionais, como hidroxila, carboxila, amino, éter, entre outros, que são capazes de se ligar aos metais pesados. Enquanto a adsorção ocorre de forma rápida, através de ligações covalentes ou trocas iônicas, por exemplo, a bioacumulação é lenta, pois os metais pesados passam por transporte ativo pela membrana celular até chegarem no citoplasma e se ligarem com sítios de ligação de proteínas e peptídeos, transportadores de metal, agentes redutores de estresse oxidativo e fitoquelatinas (LEONG; CHANG, 2020).

Figura 5 - Esquema mostrando a utilização de microalgas para remediação de ambientes contaminados com metais pesados.



Fonte: Adaptado de Salama et al., 2019.

3 OBJETIVOS

- Apresentar e analisar dados de estudos anteriores sobre caracterização da composição da comunidade de microalgas em amostras de efluentes do ponto da cava da mina na UDC/INB e amostras de água no ponto 14 na Bacia de Águas Claras – Represa das Antas, a jusante do ponto de lançamento do efluente tratado proveniente da INB;
- Discutir a influência de variáveis físico-químicas na composição da comunidade de microalgas;
- Avaliar, com base na literatura, o potencial de aplicação biotecnológica de espécies encontradas na comunidade de microalgas presentes em efluentes da UDC/INB, com foco em remediação de ambientes impactados por mineração de urânio e drenagem ácida de mina.
- Analisar as patentes depositadas no período de 2017 – junho 2022 referentes ao uso de microalgas na biorremediação de águas contaminadas.

- Mostrar o panorama, atualmente, das aplicações industriais das microalgas.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Plano geral do trabalho

Este trabalho possui a característica de ser uma pesquisa documental, realizada através da análise e interpretação de dados referentes à composição da comunidade de microalgas encontrada em amostras de efluentes radioativos dentro da UDC/INB, bem como em amostras de água em um ponto no ambiente, na Represa das Antas.

Essas amostras foram coletadas por pesquisadores do Setor de Radioecologia do LAPOC/CNEN e a identificação de gêneros e/ou espécies de microalgas foi realizada por especialista no assunto. No entanto, estes dados nunca foram interpretados nem publicados em revistas científicas indexadas e se encontram armazenados no banco de dados do Setor.

Sendo assim, essa dissertação terá como foco a análise destes dados primários coletados por outros pesquisadores, com o objetivo de interpretá-los, gerando resultados para divulgação e conhecimento científico.

Os dados foram obtidos de documentos oficiais pertencentes ao Laboratório de Radioecologia do LAPOC/CNEN, incluindo relatórios internos (AZEVEDO et al., 2010) e a pesquisa documental foi estruturada em três fases, sendo elas:

1 – Fase Pré-Analítica: foi identificado o problema de pesquisa e foram levantados os questionamentos que nortearam o desenvolvimento do trabalho, como: será que houveram diferenças nos principais grupos de microalgas presentes nos dois locais analisados? Quais espécies foram encontradas somente no ponto mais impactado? Por que algumas espécies sobrevivem em condições extremas e outras não? Como esses organismos se adaptaram a estes ambientes? Como esses organismos são úteis e importantes para a Biotecnologia?

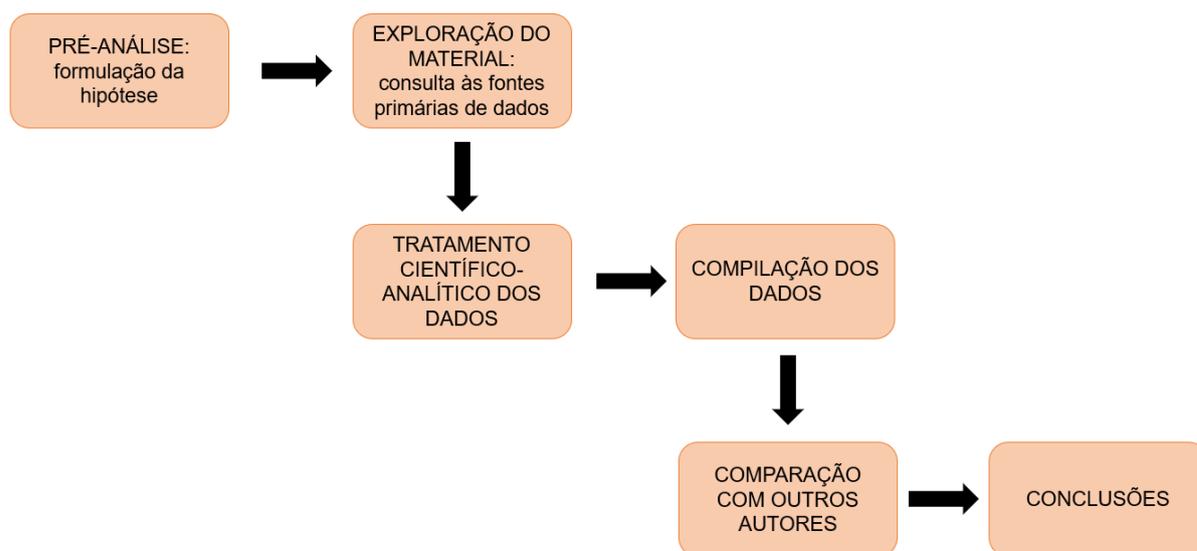
2 – Fase de exploração do material: consulta do material de apoio contendo todas as informações referentes às coletas, identificações dos organismos, bem como suas

classificações. Esse material corresponde a um Relatório Interno escrito por Azevedo et al. (2010).

3 – Fase de tratamento dos dados: foi feito um tratamento científico-analítico dos dados referentes às microalgas, através de uma leitura atenta e por meio de buscas na literatura para a elaboração de inferências e comparações com dados de outros autores para que, dessa forma, fosse possível interpretar estes dados e extrair conclusões.

O fluxograma abaixo (figura 6) ilustra de forma resumida as etapas utilizadas na pesquisa documental em questão.

Figura 6 - Fluxograma retratando as etapas da pesquisa realizada neste trabalho.



Fonte: Autora (2022)

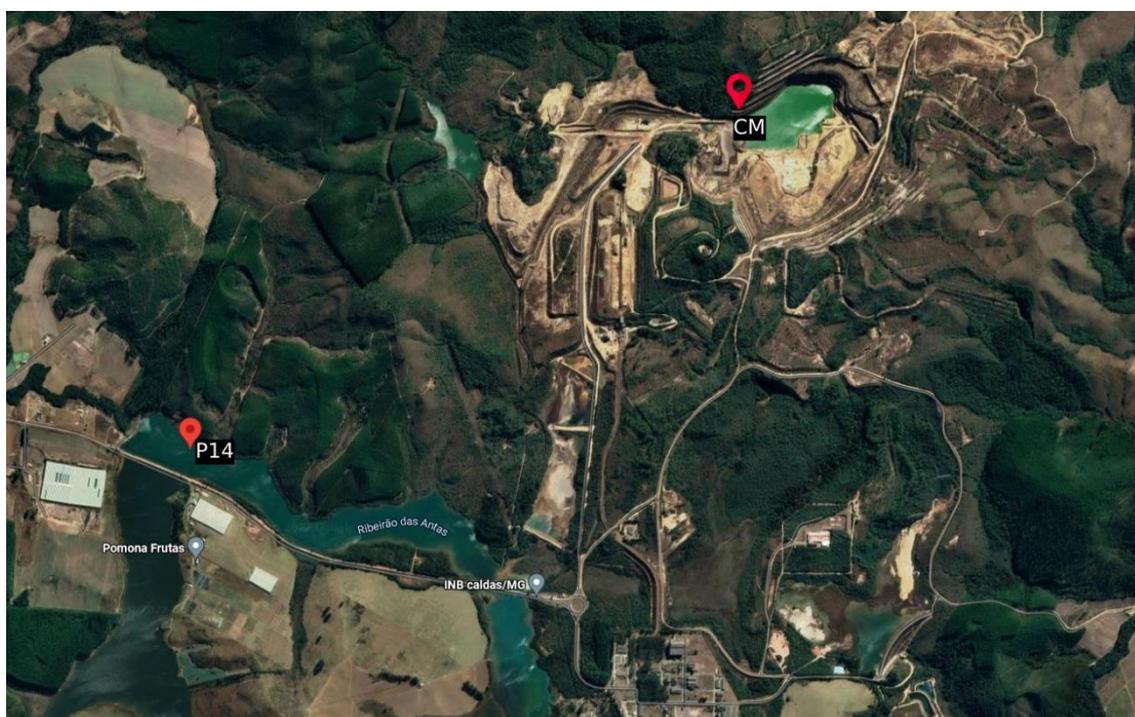
4.2 Pontos escolhidos para tratamento dos dados

Para a interpretação dos dados, foram escolhidos dois locais interessantes sob o ponto de vista biológico: um ponto dentro da UDC/INB e outro ponto na Bacia de Águas Claras – na Represa das Antas.

Na área da UDC/INB foi escolhido o ponto correspondente à cava da mina, ponto CM, que corresponde ao efluente *in natura* com ocorrência da DAM, cujas coordenadas geográficas são: 21°56'46,0"S 46°30'06,7"W. Na Represa das Antas foi escolhido o ponto 14, a jusante do ponto que recebe os efluentes tratados da UDC/INB, de localização 21°57'43,1"S 46°31'44,8"W. Ambos os pontos estão mostrados na figura 7.

Os dados interpretados neste trabalho foram referentes às amostragens realizadas em quatro períodos distintos (outubro/08, janeiro/09, abril/09 e julho/09).

Figura 7 - Localização dos pontos analisados no presente estudo.



Fonte: GoogleMaps.

De acordo com informações contidas no Relatório de Atividades do Laboratório de Radioecologia do LAPOC/CNEN escrito por Azevedo et al. (2010), as amostras de água foram coletadas a 0,5m de profundidade em ambos os pontos, com garrafa de Van Dorn de 5L de capacidade e as microalgas foram coletadas através de uma rede de coleta com abertura de 10 μ m, metodologia adequada para a coleta de fitoplâncton. Após a coleta, as amostras foram conduzidas ao Laboratório para identificação. Para identificação dos organismos em nível de gênero e, quando possível, até espécie, os pesquisadores responsáveis por essa atividade utilizaram bibliografia especializada (ANAGNOSTIDIS, K., 1988, 1989; KOMÁREK, 1999) e para a contagem dos

organismos, utilizaram o método de UTERMOHL (1958) através de microscópio invertido (AZEVEDO et al., 2010).

4.3 Tratamento dos dados

Com relação aos dados referentes à comunidade de microalgas encontrada nos locais descritos acima, bem como as cianobactérias, essas informações foram consolidadas em gráficos e tabelas, com os organismos agrupados por classes taxonômicas. Em seguida, foram verificadas as distribuições dos organismos por local e período amostrado, além de uma identificação de quais organismos estavam presentes com maior frequência nos períodos analisados e então, foi realizada busca na literatura a respeito das suas principais características e potenciais biotecnológicos. Para isso, não foi utilizado nenhum software específico, sendo a análise e interpretação feitas somente de forma quantitativa através de gráficos e tabelas para discutir a influência das variáveis físico-químicas na composição da comunidade de microalgas.

4.4 Identificação de espécies com potencial biotecnológico

Nesta etapa, foram identificados, com base na literatura, os principais grupos de microalgas que possuem potencial biotecnológico, principalmente com foco em biorremediação de ambientes contaminados.

4.5 Busca de patentes

Foi realizada uma busca de patentes na base de dados WIPO – World Intellectual Property Organization, colocando-se o termo de busca “*microalgae*” e analisando os resultados que apareceram no período de 2017 a 2022, escolhendo para análise mais detalhada as patentes relacionadas com os assuntos abordados neste trabalho, ou seja, patentes referentes ao uso de microalgas na biorremediação de águas contaminadas.

Os dados que foram analisados para escolha das patentes de interesse corresponderam a: título, número de publicação, CIP (Código Internacional de Patentes), país, setores de classificação e requerentes.

A análise destes dados também foi feita através de projeções usando gráficos e tabelas produzidas no Excell, não sendo utilizado nenhum programa ou software específico.

Dessa forma, neste item a metodologia envolveu a extração, agrupamento e formatação dos dados.

4.6 Aplicações industriais das microalgas

Por fim, foi feita uma breve busca das empresas que atualmente empregam microalgas em seus processos visando o desenvolvimento de produtos de alto valor.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Dados obtidos dos pontos CM e P14 quanto às variáveis físico-químicas

Conforme mencionado na metodologia deste trabalho, os dados foram obtidos de documentos oficiais pertencentes ao Setor de Radioecologia do LAPOC/CNEN, escritos por Azevedo et al. (2010). Entretanto, estes dados nunca haviam sido analisados, tratados e interpretados até então.

Assim, com base nos dados obtidos de Azevedo et al. (2010) e dados de comunicação pessoal do LAPOC/CNEN, foi possível analisar as variáveis físico-químicas relacionadas ao ponto 14 e, com os dados contidos e publicados por Ferrari et al. (2015), foi possível visualizar algumas características físico-químicas também para amostras do ponto CM e discuti-las.

Tabela 3 - Valores mínimos e máximos das variáveis físicas e químicas registradas em amostras da CM na UDC/INB e em P14 na Represa das Antas, obtidos de Azevedo et al. (2010) e Ferrari et al. (2015), no período outubro/08, janeiro/09, abril/09 e julho/09. Potencial hidrogeniônico (pH), condutividade elétrica (CE), temperatura (T), oxigênio dissolvido (OD), fluoreto (F⁻), sulfato (SO₄²⁻), alumínio (Al), ferro total (Fe), manganês (Mn), Zinco (Zn), urânio (U), tório (Th), fósforo total (P) e nitrogênio total (N).

Variáveis visualizadas nos trabalhos mencionados acima	Ponto CM	Ponto 14	CONAMA 430 Descarga de efluente	CONAMA 357 Classe 2	Ofício CNEN SLC/50
pH	3,6 – 4,1	6,1 – 6,9	5 – 9	6 - 9	
CE (µS/cm)	1976 - 2760	138,4 – 563			
T (°C)	17,1 – 24,9	16,8 – 26,5	< 40 °C		
Eh (mV)	413 – 556,7	133,1 – 292			
OD (mg/L)	6,7 – 7,1	6,3 – 7,5		>5	
F ⁻ (mg/L)	33,4 – 75,1	<0,05 – 1,8	10	1,4	
SO ₄ ²⁻ (mg/L)	366,6 - 1832	29,4 – 203,1		250	
Al (mg/L)	68,3 – 106,5	-			
Fe total (mg/L)	1,76 – 10,8	0,13 – 1,09	15		
Mn (mg/L)	71,5 – 143,0	0,71	1	0,10	
Zn (mg/L)	10,8 – 19,9	0,01	5	0,18	
U (mg/L)	0,1 – 4,2	0,006 - <0,01		0,02	0,02

Variáveis visualizadas nos trabalhos mencionados acima	Ponto CM	Ponto 14	CONAMA 430 Descarga de efluente	CONAMA 357 Classe 2	Ofício CNEN SLC/50
Th (mg/L)	0,1 – 0,3	<0,01 - <0,05			0,02
P total (µg/L)	5,6 – 1,8	-		50	
N total (µg/L)	700 - 840	-			

Fonte: Azevedo et al. (2010) e Ferrari et al. (2015).

De acordo com Ferrari et al. (2015), as amostras de água da CM apresentaram pH ácido, com valores médios correspondendo a 3,8, condutividade elétrica com valores médios em 2391 µS/cm e altos valores de Al, Mn e Zn. Rodgher et al. (2013) ao analisarem amostras de água também provenientes da UDC/INB, encontraram valores semelhantes de pH, condutividade elétrica e altos valores de Zn, Mn, U, fluoreto e sulfato.

Baselga-Cervera et al. (2020) encontraram valores semelhantes de pH (3,6) ao analisarem amostras de um lago a céu aberto na mina de urânio Quinta do Bispo em Portugal. Por outro lado, os valores de condutividade e concentração de urânio foram muito superiores, sendo 6800 µS/cm e 1016 ± 61 mg/L, respectivamente. Esses autores acreditam que os níveis altos de urânio, juntamente com a acidez, podem ser considerados como os principais fatores que são capazes de moldar a comunidade de microalgas de determinado local, o que não foi visto com tanta clareza no presente estudo, já que os níveis não estavam tão elevados assim.

Comparando os resultados das análises físico-químicas encontradas no efluente *in natura*, quase todas as variáveis estavam acima dos limites estabelecidos pelo CONAMA 430 (2011), que trata do lançamento de efluentes, como F^- , Fe_{total} , Mn, Zn, SO_4^{2-} , Th, U, entre outros, e o pH que estava abaixo do recomendado. Por isso, este efluente ácido que sai da CM deve, obrigatoriamente, passar por um processo de tratamento antes de ser lançado no ambiente. Na UDC/INB, este efluente é tratado com cal hidratada para que o pH se eleve de 3 para 10. Assim, com o auxílio de floculantes, os metais estáveis e radioativos precipitam e decantam e, então, o sobrenadante é descartado na Represa das Antas (FLORES, 2006).

Estes efluentes ácidos tratados provenientes da UDC/INB podem apresentar baixas concentrações mássicas de espécies radioativas, as quais, no entanto, apresentam elevadas concentrações de atividades (COSTA, 2003; FERRARI et al., 2017), podendo influenciar na composição das espécies que tem a região como habitat natural.

O retrato deste efeito foi visto por Ferrari et al. (2017) que encontraram toxicidade aguda para microcrustáceos (dafinídeos), mesmo após o tratamento do efluente, indicando que o processo utilizado para o tratamento químico dos efluentes radioativos procedentes da CM pela UDC/INB foi considerado inadequado e ineficiente, pois de acordo com a Resolução CONAMA 430 (2011) “o efluente não deverá causar ou possuir potencial para causar efeitos tóxicos aos organismos aquáticos no corpo receptor.”

O mesmo aconteceu no estudo de Herlory et al. (2013), ao analisarem o impacto do lançamento de efluentes tratados vindos de mineração de urânio em comunidades de diatomáceas (microalgas). Segundo estes autores, os agentes químicos utilizados para o tratamento do efluente, juntamente com os metais que são carregados com o próprio efluente, como U, Mn, Al e Ba, afetaram a comunidade de diatomáceas. Para estes autores, a concentração de U ($0,0169 \pm 0,004$ mg/L) apresentou grande influência na composição da comunidade de diatomáceas. No presente estudo, os dados obtidos em amostras de água do ponto 14 mostraram comparativamente concentração de U bem mais baixa ($0,006 - <0,01$ mg/L), estando abaixo do valor estipulado ($0,02$ mg/L) pela Resolução CONAMA 357 Classe II e Ofício CNEN SLC/50.

Além do tratamento químico convencional aplicado nestes efluentes, também podem ser utilizadas técnicas de biotratamento, com a utilização de organismos capazes de realizarem a bioadsorção, como mostrado por Marques (2006) ao isolar e caracterizar cianobactérias presentes em efluentes da UDC/INB. A autora tinha como objetivo avaliar a capacidade de bioadsorção da linhagem de cianobactéria predominante nos efluentes desta mina de urânio afetada por DAM em relação ao radionuclídeo ^{226}Ra . Para isso, utilizou biomassas secas de *Aphanothece* sp, e como resultado, verificou que sua capacidade de adsorção do Ra^{2+} foi dependente do pH: valores de pH mais próximos do neutro ou levemente alcalinos contribuíram melhor para a bioadsorção deste radionuclídeo.

No estudo de Coelho (2019), também foi possível observar o emprego de outro grupo de microrganismos com o intuito de remediação: os fungos. Em seu trabalho, também estudando efluentes da mina Osamu Utsumi, o autor verificou que *Penicillium* foi um gênero extremamente comum, encontrado tanto nas amostras de água quanto nas amostras de solo e sedimento, revelando uma alta resistência destes organismos ao urânio e um elevado potencial para biorremediação de ambientes contaminados com urânio.

O uso das microalgas destinadas a este fim será discutido no próximo subitem desta dissertação.

Com relação ao ponto P14, foram interpretados os dados contidos em Azevedo et al. (2010), mas somente referentes a um ponto isolado na Represa das Antas, o P14, o qual está localizado a jusante do ponto de lançamento dos efluentes tratados vindos da UDC/INB. Nesta situação, todas as variáveis físico-químicas mostradas na tabela 3 estão em concordância com os valores estipulados pelo CONAMA 357 (2005), exceto o manganês, o qual teve uma concentração média de 0,71 mg/L, estando bem acima do valor máximo (0,10 mg/L). Da mesma forma, Rodgher et al. (2013) encontraram valores médios de Mn (0,66 mg/L) e fluoreto (1,54 mg/L), também para este mesmo ponto no Reservatório das Antas, que estiveram próximas ou acima dos limites estabelecidos pela Resolução CONAMA 357, que correspondem a 0,10 mg/L e 1,4 mg/L, respectivamente. Ainda de acordo com o estudo de Rodgher et al. (2013), em um dos períodos de amostragem neste mesmo ponto, as concentrações de urânio estiveram no limite máximo permitido pelo CONAMA 357, correspondendo a 0,02mg/L. Portanto, estes autores viram que os efluentes da UDC/INB lançados no Reservatório das Antas, têm potencial de afetar a sua qualidade da água.

Com relação ao manganês, M. Nascimento (comunicação pessoal, 16 de fevereiro, 2022) refere que são gastas quantias elevadas para tratar as altas concentrações deste metal presentes no local. De acordo com Ereno (2013), a INB utiliza, todos os dias, um caminhão com 25 toneladas de cal para realizar o tratamento convencional, como já foi falado anteriormente neste trabalho, implicando em um gasto anual de R\$ 2 milhões.

Na UDC/INB já ocorre um processo alternativo de tratamento, com aplicação de ozônio. A empresa Brasil Ozônio, em parceria com a INB, BNDES, UNESCO e Fundação Pátria, instalou na mina da INB, três unidades de geração de ozônio que

são capazes de oxidar os metais dissolvidos contidos na DAM, de forma a permitir o seu descarte de maneira adequada (ERENO, 2013).

O estudo de Barolli et al. (2016) mostrou que a aplicação do tratamento com ozônio na INB foi capaz de permitir uma redução na concentração de manganês saindo de 20 – 89mg/L para abaixo de 1,0mg/L, limite estabelecido pelo CONAMA 430 (2011). Silva (2016) também mostrou que tratamentos com ozônio se mostraram uma solução ambientalmente adequada e que pode se estender às outras minas que também sofram com o impacto da DAM.

Assim como Rodgher et al. (2013), Ferrari et al. (2017) encontraram algumas variações sazonais para algumas variáveis físico-químicas medidas no Reservatório das Antas, como por exemplo o pH que apresentou valor médio significativamente maior no período seco do que no período chuvoso. Por outro lado, o maior valor médio de condutividade elétrica foi registrado no período chuvoso.

Alguns anos após a coleta das amostras analisadas no presente estudo, Ferrari et al. (2017) analisaram as variáveis físico-químicas no mesmo P14 em estações chuvosa e seca durante 2014 e 2015 e os resultados mostraram que não ocorreram grandes diferenças em relação aos valores encontrados anteriormente: novamente, todas as concentrações determinadas para o manganês estiveram acima do limite contido na Resolução CONAMA 357 (2005).

Os demais valores estiveram todos dentro dos limites estabelecidos pelas legislações vigentes. Porém, vale ressaltar que a análise de apenas um ponto não pode ser utilizada como representativa de toda a Represa. Estudos mais aprofundados e com mais pontos de amostragem na mesma Represa foram realizados por Rodgher et al. (2013), que encontraram variações sazonais na qualidade da água e contaminação por F^- , SO_4^{2-} e Mn, devido à descarga dos efluentes e por Ferrari et al. (2017), que também encontraram quantidades significativas de U, Zn e Al na água, além de todos os outros elementos já citados.

Dados relacionados ao monitoramento das águas situadas ao entorno da região da UDC mostraram que os níveis de U, Mn, Fe e Al estavam acima dos limites estabelecidos pelo Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA nº 357/05) alterada pelas Resoluções nº 393/2007, 397/2008, 410/2009 e 430/2011, resoluções que dispõem sobre a classificação de corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como dos padrões de lançamento de efluentes (CNEN, 2012; LADEIRA, GONÇALVES, 2007).

Sendo assim, os efluentes ácidos tratados provenientes da UDC/INB têm o potencial de deixar indícios de passivos ambientais no reservatório das Antas, o que pode alterar e comprometer a biota aquática local.

5.2 Dados obtidos dos pontos CM e P14 quanto às variáveis biológicas

A análise da comunidade fitoplanctônica, representada pela comunidade de microalgas, foi feita separadamente para os resultados obtidos em amostras de cada um dos pontos e depois foi feita uma comparação entre os pontos.

O termo fitoplâncton é utilizado para se referir a organismos microscópicos que habitam os corpos d'água, vivendo em suspensão, e são constituídos principalmente por microalgas como diatomáceas, clorofíceas, euglenofíceas, dinofíceas, crisofíceas e cianobactérias (CETESB, 2019).

5.2.1 Cava da mina – ponto CM

A comunidade de microalgas do ponto CM foi representada por 21 táxons pertencentes às Classes Chlorophyceae (6), Euglenophyceae (3), Bacillariophyceae (8), Zygnematophyceae (2), Dinophyceae (1) e Cryptophyceae (1), e 4 táxons pertencentes às cianobactérias, representadas pela classe Cyanophyceae, conforme mostrado na figura 8 que consolida os gráficos representando todas as classes. É importante dizer que, nesta parte, os organismos não foram medidos por densidade (ind.mL^{-1}) nem por quantos representantes de cada espécie foram registrados. Nesta etapa, os organismos foram relacionados somente quanto à sua presença correspondendo a cada mês analisado, sem considerar quantidades de indivíduos.

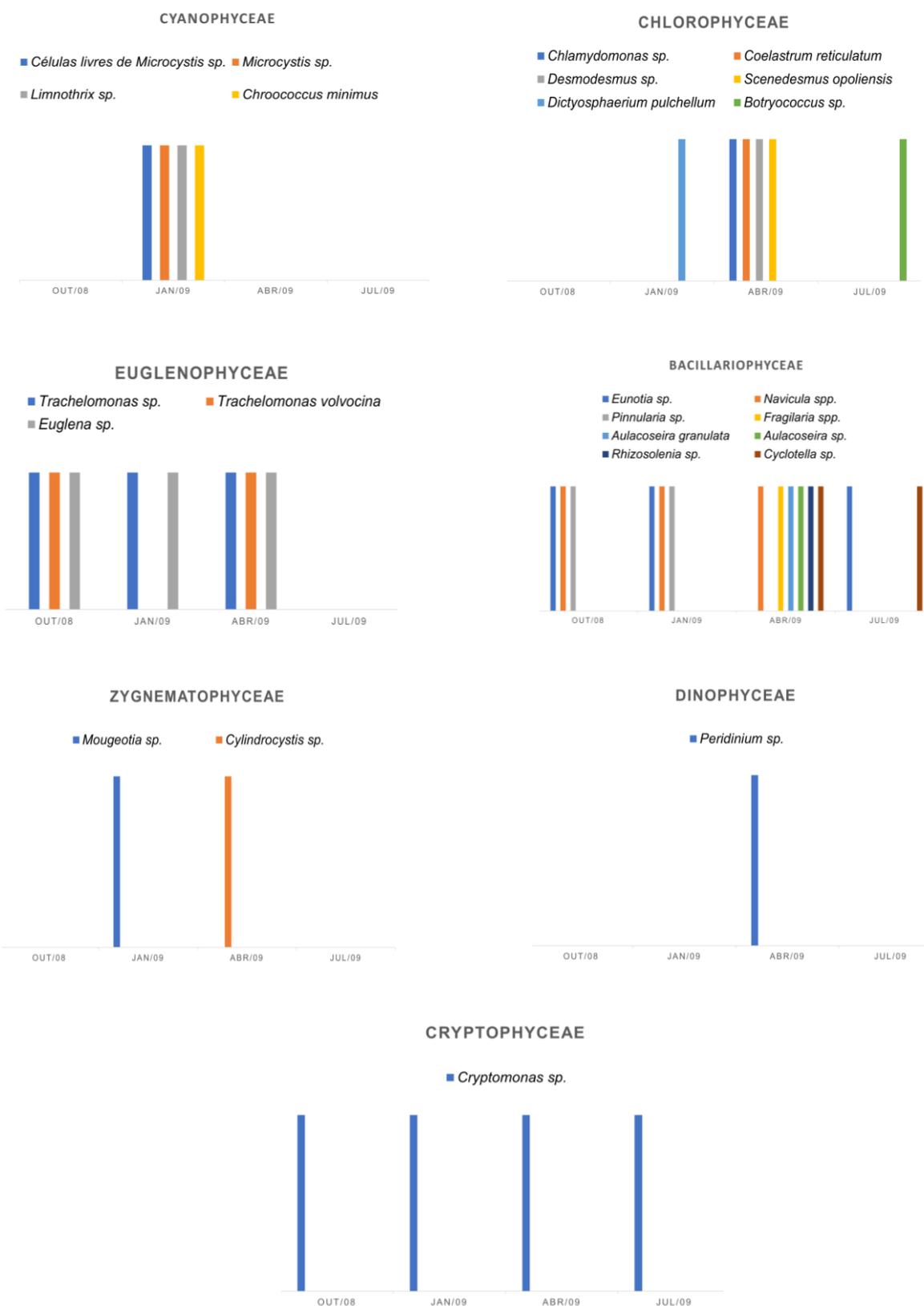
Como se pode observar na figura 8, o mês que contou com a maior diversidade de microalgas foi abril/09, sendo representado por mais táxons, seguido por janeiro/09, outubro/08 e por último julho/09.

Na região estudada, o clima é caracterizado por dois períodos bem marcantes: intensa pluviosidade e temperaturas brandas (de outubro a março) e intensa estiagem e temperaturas baixas (abril a setembro) (CIPRIANI, 2002).

Como pode ser observado nos gráficos consolidados na figura 8, a classe Cyanophyceae só apareceu no mês de janeiro/09, mês com a maior temperatura

registrada (24,9°C), dado também extraído de Azevedo et al. (2010). Cyanophyceae é a classe correspondente às cianobactérias ou algas azuis, microrganismos aeróbios fotoautotróficos e procariotos, assim como as bactérias, com capacidade de crescimento em meios diversos e desempenhando funções importantes como produtores primários (AZEVEDO, 1998). Acredita-se que as cianobactérias possuam crescimento máximo acima de 25°C, sendo favorecidas por temperaturas mais elevadas (SPERLING; JARDIM, 2009).

Figura 8 - Representação das classes de microalgas e cianobactérias registradas em CM.



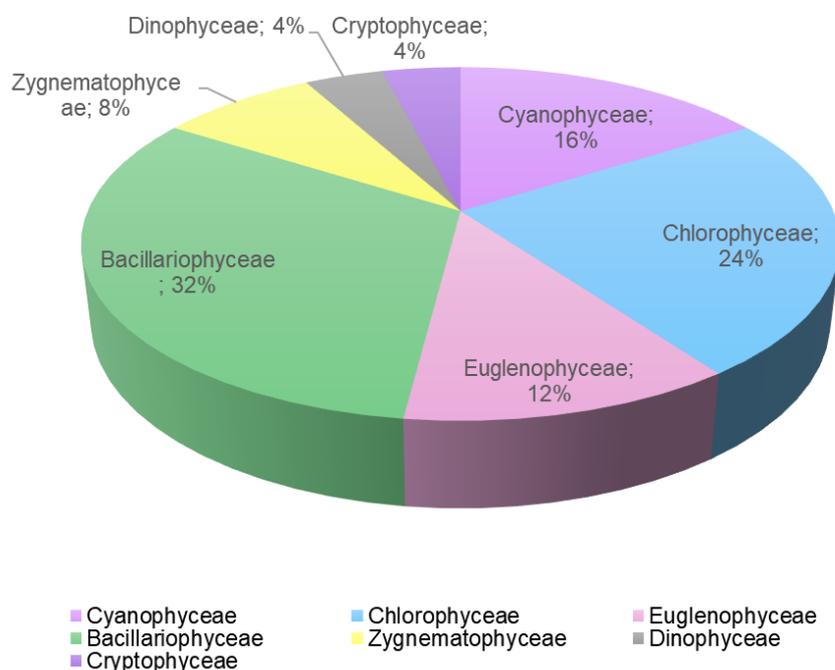
Fonte: Dados obtidos de Azevedo et al. (2010). Elaboração: Autora, 2022.

O favorecimento do crescimento das cianobactérias em temperaturas mais elevadas pode ser visto no trabalho de Jöhnk et al. (2008), quando compararam a taxa de crescimento de *Microcystis* com algas verdes e diatomáceas, e observaram que em temperaturas acima de 23°C, a cianobactéria *Microcystis* cresceu bem mais do que as outras algas, mostrando ser forte competidora em temperaturas elevadas. O mesmo aconteceu com Wojciechowski (2013) ao analisar o crescimento da cianobactéria *Cylindrospermopsis raciborskii*. A autora revelou que em temperatura de 27°C houve taxa de crescimento máxima de 0,5 µm/dia, enquanto que em temperatura de 16°C a taxa de crescimento não ultrapassou 0,2 µm/dia. Isso pode justificar, no presente estudo, o aparecimento das cianobactérias somente no mês de janeiro/09, visto que nos outros meses as temperaturas eram mais baixas, sendo 17,1°C a menor temperatura registrada, de acordo com Azevedo et al. (2010).

Embora o ponto CM seja correspondente ao efluente *in natura*, estando sob os efeitos diretos da DAM, foi encontrada uma flora de microalgas taxonomicamente diversa, sendo dominada pelas classes Bacillariophyceae, correspondendo a 32% de todos os táxons registrados, e Chlorophyceae com 24% dos táxons, as quais, juntas, representam mais da metade de todas as classes encontradas para este ponto, como pode ser visto na figura 9.

Entretanto, embora estas classes tenham sido dominantes em registro de táxons, Chlorophyceae só apareceu em abril/09. Por outro lado, as classes Bacillariophyceae, Euglenophyceae e Cryptophyceae foram as que se destacaram tendo representantes em quase todos os períodos amostrados, como pôde ser observado na figura 8. Consequentemente, a estas classes pertencem os organismos que foram registrados mais vezes nos períodos analisados, a saber: *Cryptomonas* sp, *Trachelomonas* sp, *Euglena* sp, *Eunotia* sp e *Navicula* spp.

Figura 9 - Classes de microalgas e cianobactérias, representadas em porcentagem, registradas em relação ao número de táxons na CM durante o período analisado (out/08 a jul/09).



Fonte: Dados obtidos de Azevedo et al. (2010). Elaboração: Autora, 2022.

Como não houve uma análise quantitativa de abundância dos gêneros e/ou espécies dentro de cada classe, por falta de dados, foi analisada somente a densidade total medida por classe, como pode ser visto na tabela 4.

Tabela 4 - Valores de densidade dos indivíduos pertencentes a comunidade de microalgas e cianobactérias representada por classes taxonômicas em amostras de água provenientes da CM nos diferentes meses.

	CYA	CHL	EUG	BAC	ZYG	DIN	CRYP
Out/08	0	0	9	220	2	0	2
Jan/09	250	25	57	33	1	0	8
Abr/09	0	13	57	86	0	6	115
Jul/09	0	205	0	4	0	0	4
TOTAL	250	243	123	343	3	6	129
MÉDIA	62	61	30	85	1	1	32

Unidade: ind.mL⁻¹; CYA: Cyanophyceae; CHL: Chlorophyceae; EUG: Euglenophyceae; BAC: Bacillariophyceae; ZYG: Zygnematophyceae; DIN: Dinophyceae; CRYP: Cryptophyceae.

Assim como englobou o maior registro de táxons em termos de porcentagem, Bacillariophyceae também apresentou o maior valor de densidade total de indivíduos, correspondendo a 343 ind.mL⁻¹. A Classe Cyanophyceae, embora tenha aparecido somente no mês de janeiro/09, apresentou uma densidade elevada de indivíduos, com 250 ind.mL⁻¹, seguida pela classe Chlorophyceae com 243 ind.mL⁻¹.

O que chama atenção é que no mês de julho/09 foi identificado somente um táxon que se destacou em densidade, ou seja, *Botryococcus* sp, apresentando comparativamente, densidade elevada de 205 ind.mL⁻¹. Como na região estudada, julho é um mês seco, a falta de chuva pode ter deixado os metais menos diluídos, e conseqüentemente afetado a composição do fitoplâncton local. O fato de *Botryococcus* ter se destacado é devido à sua capacidade de sobreviver em condições ácidas e com elevadas concentrações de metais, mesmo que suas taxas fotossintéticas e de respiração sejam afetadas (ARECO; HAUG; CURUTCHET, 2018).

5.2.2 Represa das Antas – Ponto 14

Para o P14, na Represa das Antas, a comunidade de microalgas e cianobactérias foi representada por 28 táxons divididos em 8 classes: Cyanophyceae (5), Chlorophyceae (9), Euglenophyceae (3), Bacillariophyceae (6), Zygnematophyceae (1), Chrysophyceae (2), Dinophyceae (1) e Cryptophyceae (1). A figura 10 retrata as classes e táxons encontrados ao longo do período do estudo.

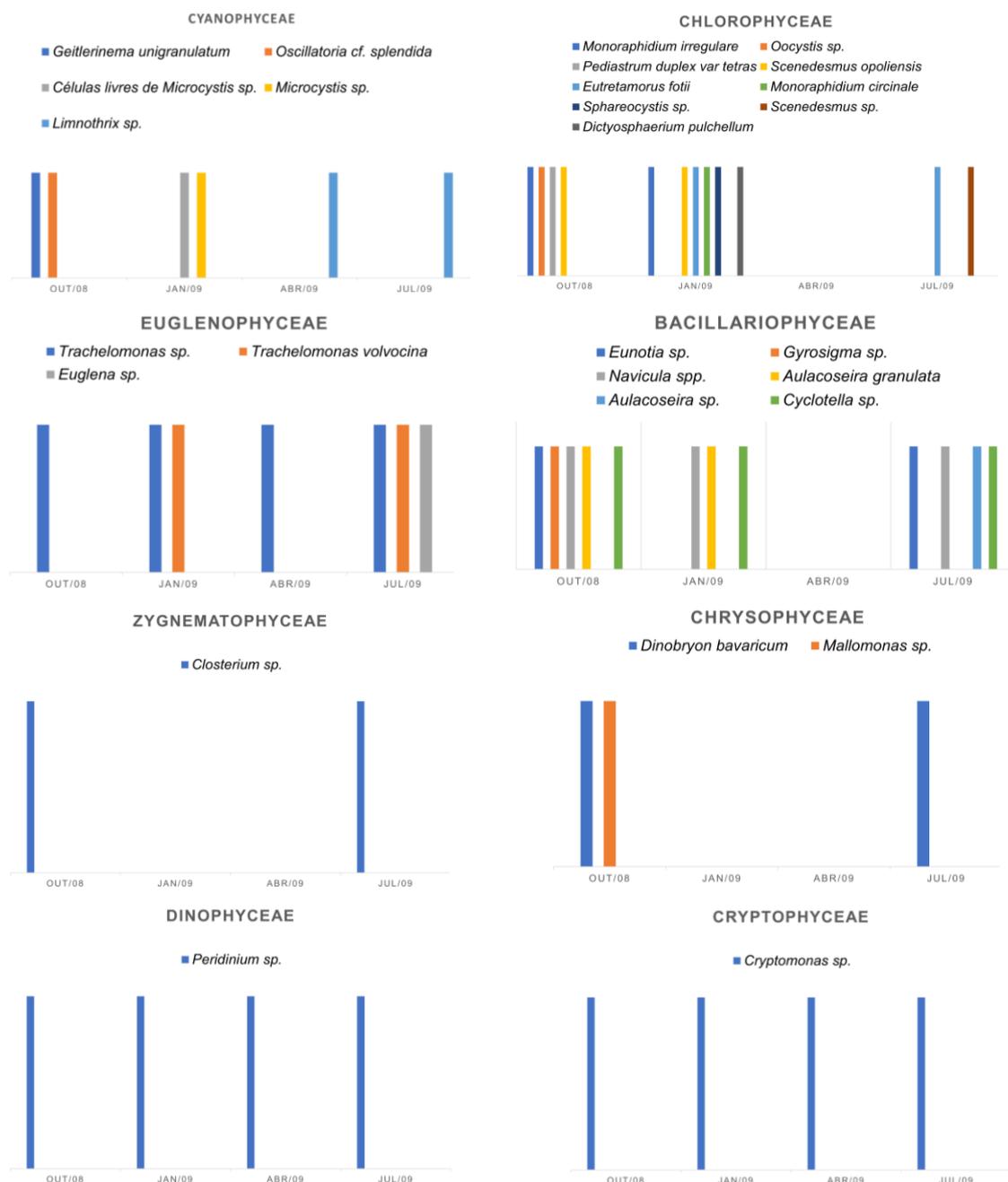
Novamente, é importante dizer que, nesta parte, os organismos não foram medidos por densidade (ind.mL⁻¹) nem por quantos representantes de cada espécie foram registrados. Nesta etapa, os organismos foram relacionados somente quanto à sua presença correspondendo a cada mês analisado. Sendo assim, como se observa na Figura 10, que consolida todos os gráficos representando as classes de microalgas que apareceram nos períodos analisados, é possível verificar que o mês no qual foram registrados mais representantes foi outubro/08, mês que corresponde ao início do período chuvoso, seguido por janeiro/09, mês também chuvoso na região.

Enquanto para o ponto CM, o mês de abril foi o mês com maiores representantes de gêneros e/ou espécies, para o P14, abril foi o mês com os menores registros, tendo sido observados poucos táxons, de acordo com Azevedo et al. (2010).

A relação englobando o maior registro de microalgas encontradas no período chuvoso também foi verificada por Zhang et al. (2020). Esses autores, ao estudarem o fitoplâncton encontrado em um dos lagos mais importantes da China, viram que a maior diversidade foi encontrada na estação chuvosa, quando comparada com a estação seca, e foram dominadas por Cyanophyta, seguido por Chlorophyta e Bacillariophyta (ZHANG et al., 2020).

Extraindo-se os dados da figura 10, é possível observar que os indivíduos constantes registrados em P14 foram: *Trachelomonas* sp, *Cryptomonas* sp, *Navicula* spp, *Peridinium* sp e *Cyclotella* sp.

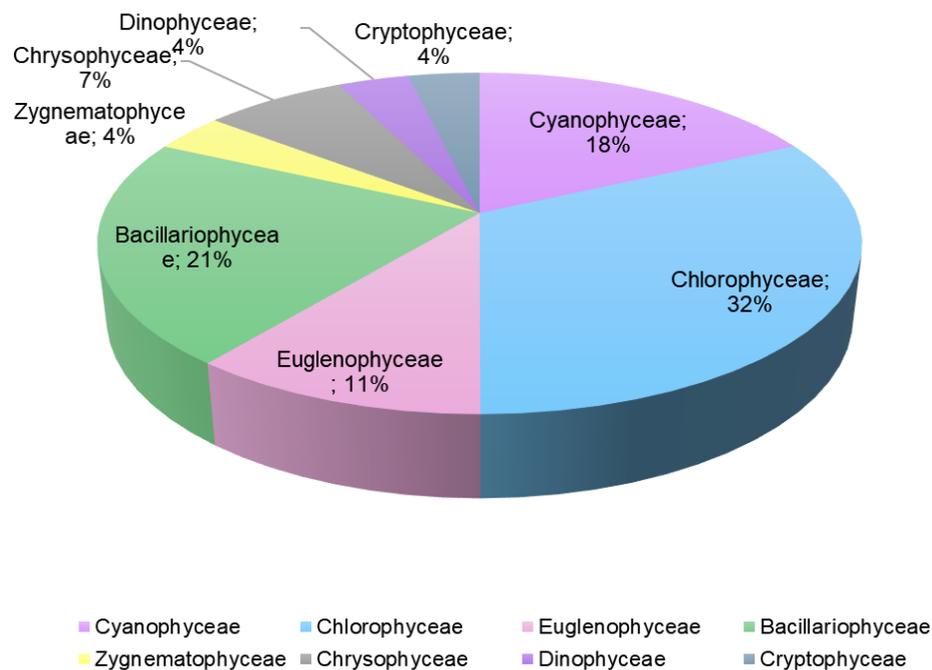
Figura 10 – Representação das classes de microalgas e cianobactérias registradas em P14.



Fonte: Dados obtidos de Azevedo et al. (2010). Elaboração: Autora, 2022.

Considerando os representantes de cada classe taxonômica, as classes que mais contribuíram na composição total da comunidade do fitoplâncton neste ponto da Represa das Antas nos períodos analisados foram muito semelhantes às classes predominantes no ponto CM, sendo elas Chlorophyceae com 32% e Bacillariophyceae com 21%, como pode ser visto na figura 11.

Figura 11 - Classes de microalgas e cianobactérias, representadas em porcentagem, registradas em relação ao número de táxons em P14 durante o período analisado.



Fonte: Dados obtidos de Azevedo et al. (2010). Elaboração: Autora, 2022.

Embora a classe Chlorophyceae tenha sido dominante com relação à porcentagem de representantes, a classe Dinophyceae se destacou com relação à densidade de indivíduos, com valor de 1017 ind.mL^{-1} , seguida por Bacillariophyceae com 317 ind.mL^{-1} e Euglenophyceae com 278 ind.mL^{-1} . A classe com menor densidade total de indivíduos foi Zygnematophyceae com apenas 17 ind.mL^{-1} , como pode ser visto na tabela 5.

Tabela 5 - Valores de densidade dos indivíduos pertencentes à comunidade de microalgas e cianobactérias representada por classes taxonômicas em amostras de água provenientes de P14 na Represa das Antas nos diferentes meses.

	CYA	CHL	EUG	BAC	ZYG	CHRY	DIN	CRYP
Out/08	5	8	50	34	10	10	33	23
Jan/09	107	96	124	242	0	0	34	11
Abr/09	30	0	30	0	0	0	932	30
Jul/09	2	5	74	41	7	9	18	2
TOTAL	144	109	278	317	17	19	1017	66
MÉDIA	36	27	69	79	4	5	254	16

Unidade: ind.mL⁻¹; CYA: Cyanophyceae; CHL: Chlorophyceae; EUG: Euglenophyceae; BAC: Bacillariophyceae; ZYG: Zygnematophyceae; CHRY: Chrysophyceae; DIN: Dinophyceae; CRYP: Cryptophyceae

Fonte: Dados obtidos de Azevedo et al. (2010). Elaboração: Autora, 2022.

5.2.3 Comparação entre os pontos CM e P14

Foi registrada ao longo do período do estudo, uma comunidade fitoplanctônica retratada por 25 representantes pertencentes a 7 classes no ponto CM e 28 representantes divididos em 8 classes para o ponto P14, como já foi mostrado anteriormente. A tabela 6 traz os indivíduos encontrados nos dois locais de amostragem, separadas por classes taxonômicas.

Tabela 6 - Representantes de microalgas e cianobactérias pertencentes às classes registradas no presente estudo.

Táxon	CM	P14
Cyanophyceae		
<i>Geitlerinema unigranulatum</i>		+
<i>Oscillatoria</i> cf. <i>splendida</i>		+
Células livres de <i>Microcystis</i> sp.	+	+
<i>Microcystis</i> sp.	+	+
<i>Limnothrix</i> sp.	+	+
<i>Chroococcus minimus</i>	+	
Chlorophyceae		
<i>Monoraphidium irregulare</i>		+
<i>Pediastrum duplex</i> var <i>tetras</i>		+
<i>Scenedesmus opoliensis</i>	+	+
<i>Eutetramorus fotii</i>		+
<i>Monoraphidium circinale</i>		+
<i>Spaerocystis</i> sp.		+
<i>Scenedesmus</i> sp.		+
<i>Chlamydomonas</i> sp.	+	
<i>Coelastrum reticulatum</i>	+	
<i>Desmodesmus</i> sp.	+	
<i>Dictyosphaerium pulchellum</i>	+	+
<i>Oocystis</i> sp.		+
<i>Botryococcus</i> sp.	+	
Euglenophyceae		
<i>Trachelomonas</i> sp.	+	+
<i>Trachelomonas volvocina</i>	+	+
<i>Euglena</i> sp.	+	+
Bacillariophyceae		
<i>Eunotia</i> sp.	+	+
<i>Gyrosigma</i> sp.		+
<i>Navicula</i> spp.	+	+
<i>Pinnularia</i> sp.	+	

Táxon	CM	P14
<i>Fragilaria</i> spp.	+	
<i>Aulacoseira granulata</i>	+	+
<i>Aulacoseira</i> sp.	+	+
<i>Rhizosolenia</i> sp.	+	
<i>Cyclotella</i> sp.	+	+
Zygnematophyceae		
<i>Cylindrocystis</i> sp.		
<i>Closterium</i> sp.		
<i>Mougeotia</i> sp.		
Crysophyceae		
<i>Dinobryon bavaricum</i>		+
<i>Mallomonas</i> sp.		+
Dinophyceae		
<i>Peridinium</i> sp.	+	+
Cryptophyceae		
<i>Cryptomonas</i> sp.	+	+

Fonte: Dados obtidos de Azevedo et al. (2010). Elaboração: Autora, 2022.

Como se observa pela tabela 6 acima, 15 representantes foram comuns aos dois locais amostrados, sendo eles: Células livres de *Microcystis* sp., *Microcystis* sp., *Limnothrix* sp., *Scenedesmus opoliensis*, *Dictyosphaerium pulchellum*, *Trachelomonas* sp., *Trachelomonas volvocina*, *Euglena* sp., *Eunotia* sp., *Navicula* spp., *Aulacoseira granulata*, *Aulacoseira* sp., *Cyclotella* sp., *Peridinium* sp. e *Cryptomonas* sp.

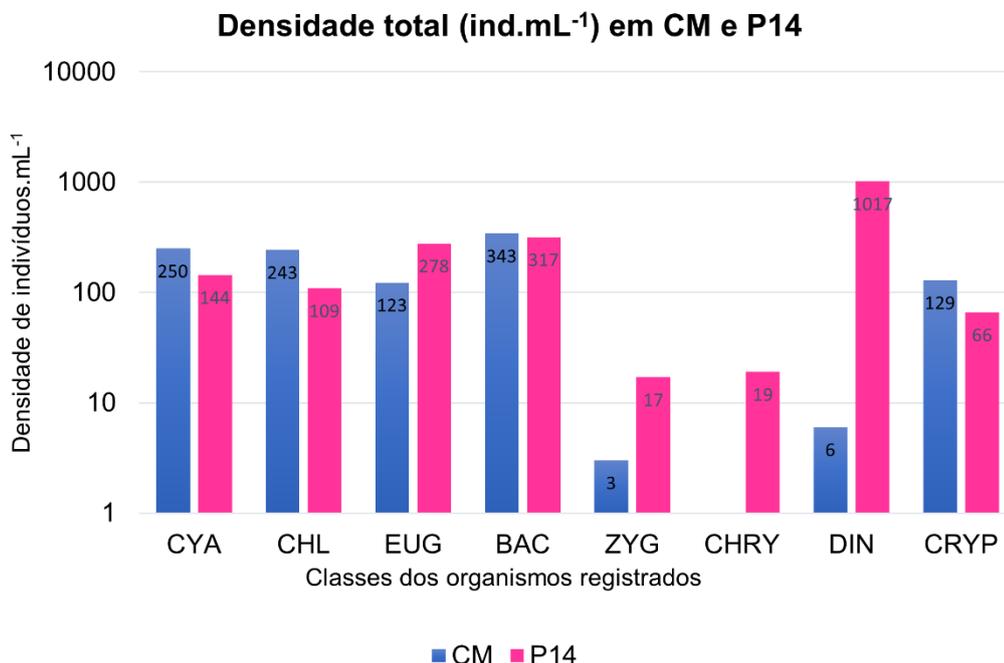
Do restante, 10 representantes apareceram somente em CM, sendo eles: *Chroococcus minimus*, *Coelastrum reticulatum*, *Desmodesmus* sp., *Botriococcus* sp., *Chlamydomonas* sp., *Pinnularia* sp., *Fragilaria* spp., *Rizosolenia* sp., *Cylindrocystis* sp. e *Mougeotia* sp.

Por fim, 13 representantes foram exclusivos de P14, sendo eles: *Geitlerinema unigranulatum*, *Oscillatoria* cf. *splendida*, *Monoraphidium irregulare*, *Pediastrum duplex* var *tetras*, *Eutetramorus fottii*, *Monoraphidium circinale*, *Sphareocystis* sp., *Scenedesmus* sp., *Oocystis* sp., *Gyrosigma* sp., *Closterium* sp., *Dinobryon bavaricum* e *Mallomonas* sp.

Os resultados apresentados neste estudo mostraram que, para as amostras de efluente não tratado provenientes da cava da mina na UDC/INB, afetadas pela DAM, com pH ácido e elevadas concentrações de contaminantes estáveis e radioativos (FERRARI et. al., 2015), foi encontrada uma biodiversidade de microalgas constituída por 25 representantes, número muito maior do que o encontrado por Baselga-Cervera et.al. (2020) ao analisarem amostras de um lago a céu aberto na mina de urânio Quinta do Bispo em Portugal, onde foram registradas apenas 5 espécies. Embora os valores de urânio (1016 ± 61 mg/L) e zinco (1,68 mg/L) registrados por estes autores tenham sido menores do que valores analisados no presente trabalho, com valores de urânio entre 0,1 – 4,2 mg/L e zinco entre 10,8 – 19,9 mg/L, estes autores sugerem que urânio, acidez, cobre e zinco podem ser considerados os principais fatores que influenciaram e moldaram a comunidade fitoplanctônica no local, marcada principalmente por Chlorophyta (*Chlorella* sp., *Oocystis* sp. e *Schroederia* sp.) e Bacillariophyceae (*Navicula* sp. e *Nitzshia* sp.). No presente estudo, mesmo com essas variáveis mais altas, a biodiversidade de microalgas foi maior, o que pode estar relacionado a uma possível adaptação a longo prazo destes organismos ao ambiente extremo aqui analisado.

Ao analisarmos as densidades totais, por classe, dos indivíduos encontrados nos dois locais amostrados, temos:

Figura 12: Densidade total (ind.mL⁻¹) de indivíduos pertencentes a diferentes classes encontradas em amostras de água dos pontos CM e P14 durante o período estudado.



Unidade: ind.mL⁻¹; CYA: Cyanophyceae; CHL: Chlorophyceae; EUG: Euglenophyceae; BAC: Bacillariophyceae; ZYG: Zygnematophyceae; CHRY: Chrysophyceae; DIN: Dinophyceae; CRYP: Cryptophyceae.

Fonte: Dados obtidos de Azevedo et al. (2010). Elaboração: Autora, 2022.

Como pode ser observado pelo gráfico acima, em relação à densidade total dos organismos ao longo do período de estudo, a classe Bacillariophyceae apresentou predominância muito semelhante para ambos os pontos. Já Cyanophyceae e Chlorophyceae apresentaram densidades maiores em CM, enquanto que em P14 a classe Dinophyceae foi a que mais se destacou.

Por outro lado, as classes Zygnematophyceae e Chrysophyceae apresentaram densidades pequenas para ambos os pontos.

5.2.3 Organismos encontrados somente em CM

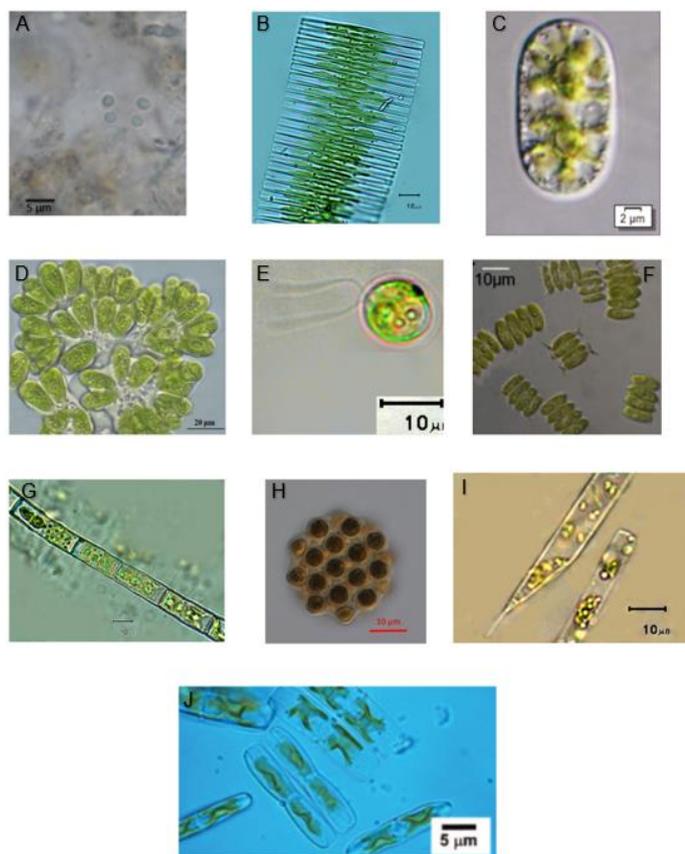
Alguns gêneros foram registrados somente em CM: é o caso de *Chroococcus minimus* (Cyanophyceae), *Chlamydomonas* sp., *Coelastrum reticulatum*, *Desmodesmus* sp., *Botryococcus* sp. (Chlorophyceae), *Pinnularia* sp., *Fragilaria* sp., *Rhizosolenia* sp. (Bacillariophyceae), *Cylindrocystis* sp. e *Mougeotia* sp.

(Zygnematophyceae), mostrando que mesmo sob os efeitos tóxicos do efluente *in natura*, foram encontrados representantes diversos e de diferentes classes taxonômicas, revelando uma ótima capacidade destes organismos de sobreviverem em condições adversas relacionadas a condições ácidas e presença de metais estáveis e radioativos em elevadas concentrações.

Quanto aos fatores que influenciam a composição da comunidade do fitoplâncton, a qualidade da água é um deles. Segundo Kalin et al. (2001), as mudanças pelas quais as comunidades fitoplanctônicas podem passar em um lago ácido estão principalmente associadas aos sólidos suspensos totais, P total, NO₃, As e Eh. Portanto, a química da água influencia a composição e diversidade do fitoplâncton, mas concentrações baixas de nutrientes limitam a sua biomassa (KALIN et al., 2001; KUMAR et al., 2016).

Na figura 13, é possível observar imagens de microscopia referentes a cada um dos representantes de microalgas e também de uma cianobactéria registradas em CM.

Figura 13 - Registros de micrografia ilustrando os representantes das microalgas e cianobactéria encontradas somente no ponto CM da UDC/INB.



A. Aspecto geral de colônias de *Chroococcus minimus*. Fonte: Brito (2011). **B.** *Fragilaria* sp. Fonte: Baker et al. (2012). **C.** Microscopia de luz de *Cylindrocystis* sp. Fonte: ROSEN; STAHLHUT e HALL, 2019. **D.** Células de *Botryococcus braunii*. Fonte: Ramaraj; Kawaree e Unpaprom (2016). **E.** *Chlamydomonas* sp de um lago nos EUA. Fonte: BAKER et al., 2012. Acesso em 11 jun 2021. **F.** *Desmodesmus* sp. Fonte: LORTOU e GKELIS, 2019. **G.** *Mougeotia* sp. Fonte: Baker et al. (2012). **H.** *Coelastrum reticulatum*. Fonte: GUIRY, 2021. **I.** *Rhizosolenia* sp. Fonte: Baker et al. (2012). **J.** Células de *Pinnularia* sp. Fonte: Jeffryes et al., 2008.

Prasanna et al. (2011), ao analisarem a comunidade de microalgas em águas sob efeitos da DAM, com pH entre 2,4 – 3,2, encontraram uma elevada diversidade, com representantes dos gêneros *Euglena*, *Cylindrocystis*, *Botryococcus* e *Navicula*, assim como registrado no presente estudo. Estes autores sugerem que a alta diversidade de microalgas encontrada pode estar relacionada à longa duração do fluxo da DAM, levando à adaptação destes organismos (PRASANNA et al., 2011). Logo, esta é uma justificativa que também pode ser utilizada para explicar os resultados obtidos no presente estudo.

Da mesma forma, Gomes et al. (2021) também encontraram uma comunidade de microalgas diversa ao analisarem amostras de DAM provenientes da mina de São Domingos em Portugal, correspondendo a 14 táxons divididos em 8 classes, com dominância de Bacillariophyceae, assim como no presente estudo.

Com relação às cianobactérias, ou algas azuis, foi registrado no presente estudo, *Chroococcus minimus* somente no ponto CM. Sabe-se que *Chroococcus* é um gênero cosmopolita de formas unicelulares ou coloniais (FRANCESCHINI et al., 2010). Além disso, as cianobactérias fazem parte de um grupo morfológicamente diverso de procariotos fotossintéticos que se adaptam à maioria das condições de estresse e são encontradas com frequência em ambientes contaminados por metais (ACHARYA; APTE, 2013). Isso pode explicar o fato de terem sido encontradas apenas em CM e não em P14 no presente estudo. Outro ponto é que as cianobactérias possuem mecanismos, como sequestro extracelular, compartimentação intracelular, transporte ativo, síntese de proteínas de ligação a metais, entre outros, que modificam a especiação de metais, levando à diminuição ou aumento da sua mobilidade (Acharya; Apte, 2013), o que pode estar intimamente relacionado com a sua capacidade de sobrevivência nestes ambientes.

Por outro lado, Abinandan et al. (2018) citam que ainda que as cianobactérias possam sobreviver em ambientes com DAM, estão mais propensas à morte celular do que as algas verdes, por exemplo. Uma das explicações para isso é o fato de as cianobactérias não conseguirem manter seu citoplasma com pH neutro quando crescem em ambiente com pH ácido, o que propicia danos a seu aparelho fotossintético (ABINANDAN et al., 2018).

Entretanto, já foi mostrado neste trabalho que, mesmo no efluente ácido *in natura*, houve um número diverso de microalgas e cianobactérias tendo-o como habitat. Há, inclusive, gêneros de organismos planctônicos que costumam ser bons indicadores de acidificação em determinado ambiente: lagos acidificados comumente contam com aumento de microalgas filamentosas pertencentes à Classe Zygnematophyceae, principalmente dos gêneros *Mougeotia*, *Spirogyra* e *Zygogonium*, os quais costumam ser bons indicadores de acidificação (KLUG e FISCHER, 2000; GREENWOOD; LOWE, 2006). Isso pode justificar que, no presente estudo, apenas no ponto mais ácido tenha ocorrido o registro de *Mougeotia*.

Alguns autores dizem que não é frequente *Mougeotia* ser encontrada em pH alto e estudos têm evidenciado que ela é comum apenas quando o pH é menor que 6 (FAIRCHILD; SHERMAN, 1993), como aconteceu no presente estudo, no qual este organismo só foi registrado no ponto CM, ponto com média de pH em 3,8, de acordo com Azevedo et al. (2010). Da mesma forma, Freitas, Schneider e Schwartzbold (2011) ao analisarem riachos afetados por DAM em uma região de mineração de cobre no sul do Brasil, também registraram a ocorrência de *Mougeotia* em pH de 2,9 a 3,2, ilustrando a preferência deste organismo por pH mais baixos.

Outro organismo da Classe Zygnematophyceae encontrado no presente estudo foi *Cylindrocystis* sp., algas unicelulares com formato cilíndrico ou elíptico, que possui ampla distribuição mundial, sendo comuns em ambientes extremos, tais como em águas ácidas, habitats subaéreos, geleiras e desertos (BARCYTE et al., 2020; FRANCESCHINI et al., 2010).

Já as microalgas pertencentes à classe Bacillariophyceae, também conhecidas como diatomáceas, são dominantes em todos ambientes aquáticos: oceanos, estuários, lagos e riachos. São cerca de 250 gêneros e de 10.000 a 12.000 espécies, todas unicelulares e desprovidas de flagelos. Uma característica morfológica interessante deste grupo é a presença da frústula, uma parede celular impregnada de sílica, envolvida por uma fina camada de matéria orgânica (FRANCESCHINI et al., 2010). Recentemente, tem aumentado o interesse pela modificação das frústulas das diatomáceas com o objetivo de aplicações tecnológicas (SOLEIMANI et al., 2020).

Além disso, é comum o uso de diatomáceas como indicadoras da qualidade das águas (FRANCESCHINI et al., 2010). Herlory et al. (2013) retrataram as mudanças na composição da comunidade de diatomáceas induzidas pela descarga de efluentes tratados de mineração de urânio na França: os gêneros *Aulacoseira*, *Eunotia*, *Gomphonema* e *Pinnularia* foram comuns aos locais de referência e impactados, mas algumas espécies pertencentes a estes gêneros, como *Pinnularia major* e *Gomphonema lagenula*, foram sensíveis à descarga dos efluentes e desapareceram ou foram substituídas por espécies tolerantes. No presente trabalho, *Aulacoseira granulata* e *Eunotia* sp. foram encontradas em ambos os pontos analisados, mas *Pinnularia* sp. foi encontrada somente no ponto mais ácido, o ponto CM. Como não foi feita uma identificação até o nível de espécie no relatório tido como base de Azevedo et.al (2010), não é possível comparar com o trabalho de Herlory et.al

(2013), para verificarmos se também existiriam algumas espécies de *Pinnularia* que seriam sensíveis a este efluente.

No entanto, sabe-se que o gênero *Pinnularia* é muito comum de ser encontrado como parte da comunidade fitoplanctônica de ambientes ácidos, onde a maioria das suas espécies conseguem tolerar baixos valores de pH, mesmo que sua ocorrência possa ser registrada em ambientes que apresentem valores de pH ácido a neutro. A identificação de espécies deste gênero é difícil pois há uma fraca variação morfológica entre as espécies e existem inconsistências na taxonomia infra-genérica deste táxon (CINIGLIA et al., 2007).

Além de ser comum em ambientes com DAM de origem antropogênica, *Pinnularia* sp. também costuma ser encontrada em águas doces com baixo valor de pH de origem natural, como o Rio Tinto na Espanha (AGUILERA et al., 2006).

Gomes et al. (2021), ao analisarem a comunidade de algas em ambiente com drenagem ácida de mina em Portugal, verificaram que a classe Bacillariophyceae foi a mais abundante, e *Pinnularia* sp. foi um dos organismos que mais apareceram. De forma semelhante, DeNicola (2000), em sua revisão trazendo espécies de diatomáceas capazes de sobreviverem em $\text{pH} \leq 3,5$, encontrou 124 táxons divididos em 24 gêneros, entre os quais *Pinnularia* apareceu com 21 espécies, mostrando que é comum de ser encontrada em ambientes ácidos, justificando sua existência no ponto CM analisado no presente estudo.

Showe, Harding e Broady (2012) analisaram a comunidade de diatomáceas em gradientes de DAM e viram que em locais severamente impactados, com pH em torno de 3,4, foram encontrados no máximo 5 táxons, com abundância de *Pinnularia cf. acidophila* e os autores sugerem que esta espécie pode ser uma ferramenta poderosa para a distinção entre fluxos severamente impactados por DAM e fluxos moderadamente contaminados. Estes resultados concordam com os resultados encontrados no presente estudo, visto que o organismo *Pinnularia* sp. foi registrado somente no efluente *in natura*, que corresponde a um fluxo severamente impactado.

Por outro lado, no estudo de Kalin et al. (2006) o gênero *Pinnularia* foi frequente em pH 5, mas depois diminuiu, sendo intolerante a valores de pH mais baixos e concentrações elevadas de metais.

Outro gênero abundante e ecologicamente importante de diatomáceas, é *Fragilaria*, sendo muito comum em ecossistemas de água doce, podendo ser encontrada em ampla faixa de condições ambientais (KAHLERT et al., 2019).

No estudo de McFarland, Hill e Willingham (1997), foi verificado que *Fragilaria* sp apresentou anormalidades quando analisada em amostras provenientes de locais com drenagem de mina nos EUA. Esse fato indica que as válvulas anormais de *Fragilaria* podem indicar concentrações elevadas de metais, como Cd, Cu, Fe e Zn. Conseqüentemente, a análise dessas características nesta microalga pode ser empregada como forma de biomonitoramento e bioindicação. No caso da UDC/INB, em fase de descomissionamento, a microalga *Fragilaria* sp. poderia ser utilizada como uma ferramenta de diagnóstico ambiental em auxiliar no monitoramento para o tratamento dos efluentes radioativos ácidos desta instalação nuclear.

Embora *Fragilaria* sp tenha sido registrada no presente estudo somente em CM, para Urrea-Clos e Sabater (2009), ao compararem diatomáceas provenientes de águas ácidas e alcalinas, *Fragilaria capucina* esteve presente somente em águas alcalinas, não estando presentes em águas de rios afetados pela drenagem ácida de mina.

Por outro lado, outros autores afirmam que valores de pH elevado, ou seja, entre 9,2 a 11, afetam negativamente a taxa de crescimento de *Fragilaria crotonensis*, tornando as células incapazes de sintetizarem suas frústulas nestes níveis de pH (ZEPERNICK et al., 2021).

Outro gênero que foi registrado no presente estudo foi *Rhizosolenia*, um gênero comum de diatomáceas planctônicas, sendo encontrado em águas doces ou marinhas. É reportado com frequência nos lagos do Canadá e costuma ter uma aparição sazonal, sendo comum em pelo menos uma parte do ano (YUNG, NICHOLLS, CHENG, 1988). Essa sazonalidade foi vista no presente estudo, já que este organismo apareceu somente no mês de abril, final do verão. Da mesma forma, no estudo de Rousseau et al. (2002), durante o verão a comunidade de diatomáceas foi dominada por *Rhizosolenia*, diferentemente do outono, por exemplo, que foi dominado por *Coscinodiscus* spp.

A ocorrência de *Rhizosolenia* pode estar relacionada com o nível de nutrientes: com o aumento da concentração do fósforo, há um aumento na abundância da

microalga. Além disso, *Rhizosolenia* já foi encontrada em altas densidades em lagos com histórico de contaminação e acidificação por metais pesados (YUNG; NICHOLLS; CHENG, 1988).

Por fim, as Chlorophyceae, também conhecidas como algas verdes, que possuem paredes de celulose e clorofilas *a* e *b*, e são consideradas ancestrais de todas as plantas (JOHN; WHITTON; BROOK, 2011). Alguns autores agrupam as Chlorophyceae junto com outras classes menores, como Trebouxiophyceae, na divisão Chlorophyta, indicando uma proximidade evolutiva (JOHN; WHITTON; BROOK, 2011). Dos organismos do filo Chlorophyta que, no presente estudo, foram encontrados somente no ponto CM, destacam-se *Desmodesmus* sp., *Coelastrum reticulatum*, *Chlamydomonas* sp. e *Botryococcus* sp.

Desmodesmus sp é uma microalga que possui a característica de ser tolerante a condições ácidas. Abinandan et al. (2019) quando cultivaram *Desmodesmus* sp. em pH 3,5, observaram que esta microalga tem potencial de remover metais pesados como Cu, Fe, Mn e Zn em soluções aquosas, através de acúmulo intracelular. Além disso, é muito comum o uso de *Desmodesmus* sp. na produção de biocombustíveis (ABINANDAN et al., 2019; RUGNINI et al., 2018).

Já *Botryococcus* é um gênero de organismos encontrados principalmente em água doce, crescem em lagos oligotróficos, mas preferem ambientes eutróficos com pH ligeiramente ácido (BAKER et al., 2012). De acordo com Ferrari et al. (2015) o lago ácido da CM foi classificado como oligotrófico. Os *Botryococcus* costumam formar colônias em forma de pirâmides, e possuem a capacidade de flutuar na superfície da água devido ao acúmulo de hidrocarbonetos e lipídeos em sua matriz extracelular. A espécie mais estudada é *Botryococcus braunii*, muito utilizada em biotecnologia para produção de óleos e biocombustíveis, como será discutido posteriormente (JÚNIOR et al., 2020).

Já foi demonstrado que *Botryococcus* também é capaz de remover metais pesados de águas residuais, como Zn, Fe, Cd e Mn (GANI et al., 2017). Areco, Haug e Curutchet (2018) mostraram que *Botryococcus braunii* consegue crescer e sobreviver em condições ácidas de ambientes contaminados com elevadas concentrações de Zn, mesmo que sua taxa de fotossíntese e respiração sejam afetadas.

A presença de *Botryococcus* na CM registra neste estudo de bioprospecção, outra possibilidade potencial para o desenvolvimento de bioprocessos a fim do tratamento dos efluentes radioativos da UDC/INB para a remoção de metais estáveis e radioativos, bem como produção concomitante de óleos e biocombustíveis, podendo baratear o custo do tratamento de efluentes com DAM.

Entretanto, no estudo de Kalin et al. (2006), *Botryococcus* foram raramente encontrados no lago afetado com DAM. Pode-se inferir que a ocorrência ou não de alguns grupos de microalgas ou cianobactérias está relacionado às características climáticas e de composição física e química do efluente com DAM a ser tratado e os resultados do presente estudo demonstraram que a caracterização dos efluentes com DAM da CM juntamente com o estudo de bioprospecção puderam identificar vários gêneros de organismos planctônicos com potencial para biotratamento destes efluentes.

Com relação à alga verde *Coelastrum reticulatum*, não foi encontrado nenhum registro na literatura da sua ocorrência em outros lagos ácidos. Isso pode ser explicado devido ao fato de *Coelastrum* ser um gênero que prefira ambientes eutróficos, com alta concentração de nutrientes (BAKER et al., 2012). Isso pode ser visto no estudo de Ray, Santhakumaran e Kookai (2021) que, analisando águas eutróficas da Índia, encontraram *Coelastrum microporum* como uma das espécies mais abundantes.

De todos estes organismos, *Chlamydomonas* sp. merece destaque especial, pois é um gênero comumente encontrado em águas ácidas, sendo tolerante a uma ampla gama de contaminantes (KALIN et al., 2001; KALIN et al., 2006; GARCÍA-BALBOA et al., 2013; KUMAR et al., 2016; BASELGA-CERVERA et al., 2018).

Apesar de não terem aparecido no presente estudo, *Ochromonas* sp, assim como *Chlamydomonas* sp, também são muito abundantes em águas ácidas (LESSMANN; FYSON; NIXDORF, 2000; BEULKER; LESSMANN; NIXDORF, 2003; GELLER et al., 2013; KUMAR et al., 2016).

Outras microalgas capazes de colonizarem e sobreviverem em águas altamente ácidas e ricas em metais são *Dunaliella acidophila*, *Euglena mutabilis*, *Eunotia* sp (NANCUCHEO; JOHNSON, 2012) e várias espécies de *Nitzschia* (DeNICOLA, 2000).

Além disso, Kalin et al. (2001) também relataram que o zooplâncton é outro fator que pode estar relacionado com a diminuição da biomassa do fitoplâncton, ou seja, quanto maior a densidade de zooplâncton, menor a densidade de fitoplâncton. Essa relação pode ser vista no trabalho de Ferrari et al. (2015), mas de forma inversa. No trabalho de Ferrari et al. (2015), os autores estudaram a comunidade zooplanctônica também na cava da mina no mesmo período do presente trabalho e observaram que houve uma densidade elevada de zooplâncton, mas a densidade do fitoplâncton aqui analisada foi maior. Isso pode estar relacionado com o fato de que no estudo de Ferrari et al. (2015) só foram registradas seis espécies de zooplâncton, indicando certa sensibilidade destes organismos ao efluente, enquanto para o fitoplâncton, representado pelas microalgas, foram registrados 25 táxons. Essa diferença com relação ao número de representantes de cada grupo pode estar relacionada com uma maior adaptabilidade e resistência do fitoplâncton a ambientes com DAM e com elevadas concentrações de metais, e também pelo fato de não serem suficientemente predados pelo zooplâncton existente no local.

Ademais, conforme mencionado acima, foram registrados 25 táxons para o efluente *in natura* da cava da mina, número relativamente alto quando comparado com o encontrado por outros autores, como por exemplo, Baselga-Cervera et al. (2020) e Kumar et al. (2016), que encontraram apenas 5 táxons em seus estudos em lagos ácidos de mineração. Isso pode estar relacionado com o pH, que não é extremamente ácido nos efluentes da cava da mina da UDC/INB, estando em torno de 3,8. Nos lagos ácidos da Lusatia, o número de táxons fica em torno de 7 e 9 quando o pH está entre 2,5 – 3, e quando o valor de pH se eleva para valor em torno de 4, o número de táxons se eleva para 17 – 25. Além disso, as espécies dominantes, nos lagos de mina da Lusatia, também sofrem alteração com o aumento do pH. Em $\text{pH} \leq 3$, foram comuns *Chlamydomonas* sp, *Ochromonas* sp, *Peridinium umbonatum* e *Scourfieldia cordiformes*. Já em pH 4, as espécies mais comuns foram *Peridinium umbonatum* e *Cryptomonas* spp (GELLER et al., 2013). No presente estudo, *Cryptomonas* esteve presente em todos os períodos de amostragem e também em P14, mostrando ser um organismo que tolera variações de pH e concentrações de metais.

Kalin et al. (2006) também descreveram algumas mudanças na comunidade fitoplanctônica em lago ácido de mina afetado por DAM no Canadá. Quando o pH diminuiu de 5 para 3, a diversidade do fitoplâncton caiu de 52 para 42 táxons.

Ochromonas e *Chlamydomonas* estiveram sempre presentes ao longo do período de estudo, tolerando uma ampla gama de contaminantes. *Euglena*, *Peridinium* e *Pinnularia* foram frequentes em pH 5 e depois diminuíram a frequência acompanhando redução em valor de pH, indicando menor tolerância a valores baixos de pH (KALIN et al., 2006). Da mesma forma, DeNicola (2000) revisando a ocorrência de espécies de diatomáceas em $\text{pH} \leq 3$ registrou menor número de táxons quando comparado àqueles observados em $\text{pH} 4,5 - 5$. Além disso, este mesmo autor verificou que muitas espécies de diatomáceas são eliminadas em faixa de pH entre 3,5 – 4,5, o que não foi ocorrido no presente estudo, já que em pH 3,8 as diatomáceas foram as que contaram com o maior número de representantes.

Por outro lado, alguns autores acreditam que o baixo pH, assim como concentrações elevadas de metais, não têm tanta influência na biodiversidade da comunidade fitoplanctônica, acreditando ser o principal fator a baixa concentração de nutrientes, como carbono inorgânico dissolvido e fósforo (KUMAR et al., 2016).

Sabe-se que a colonização do fitoplâncton em lagos ácidos é limitada por baixos teores de carbono inorgânico e fósforo, e as espécies que podem crescer em tais ambientes devem ter mecanismos para aquisição de fósforo e carbono para apoiar a fotossíntese e o crescimento. Entre essas adaptações estão a capacidade de viver por fagotrofia ou heterotrofia e a capacidade de migração para locais convenientes ricos em nutrientes, pois a maioria das espécies colonizadoras destes ambientes são fitoflageladas e conseguem se adaptar bem ao ambiente extremo (BEULKER; LESSMANN e NIXDORF, 2003; LESSMANN, FYSON e NIXDORF, 2000). A fagotrofia está relacionada a um tipo de nutrição no qual os organismos se alimentam de partículas ou de outros microrganismos, ingeridos por meio da fagocitose (FRANCESCHINI et al., 2010). Além dessas, também são importantes as adaptações fisiológicas relacionadas ao baixo pH, mixotrofia, motilidade e alto potencial de reprodução (GELLER et al., 2013).

5.2.4 Organismos encontrados em P14

Dos organismos que foram registrados somente em P14, tem-se *Geitlerinema unigranulatum*, *Oscillatoria* cf. *splendida* (Cyanophyceae), *Monoraphidium irregulare*,

Pediastrum duplex var *tetras* (Chlorophyceae), *Closterium* sp (Zygnematophyceae), *Dinobryon bavaricum*, *Mallomonas* sp (Crysophyceae).

O que chama a atenção é que em P14 foram encontrados representantes da classe Chrysophyceae, classe ausente em CM. Em geral, de acordo com Wehr, Sheath e Kociolek (2015), esta classe está associada a águas com pH entre 6 e 7, o que justifica o fato de não terem sido encontradas em CM. Entretanto, outros autores já reportaram a presença de Chrysophyceae em lagos ácidos (GOMES et al., 2021; LESSMANN, FYSON e NIXDORF, 2000), o que não foi verificado no presente estudo.

A classe que merece destaque para este ponto é Dinophyceae, com o organismo *Peridinium* sp, devido à alta densidade total apresentada ao longo do período de estudo, como já foi mostrado anteriormente. *Peridinium* também pode ser encontrado em águas ácidas (LESSMANN; FYSON; NIXDORF, 2000; KALIN et al., 2006) e esteve presente na CM, mas em densidades bem menores do que na Represa das Antas. Ronqui (2008) ao analisar amostras de água da Represa das Antas, também destacou a dominância de *Peridinium* sp em relação à biomassa e densidade, e seu número foi ainda mais elevado quando analisado no ponto onde havia melhor qualidade da água. Talvez essa preferência de *Peridinium* sp por locais com melhores qualidades da água possa justificar sua ocorrência em maior número em P14 do que em CM, considerando-o como um adequado indicador de qualidade de água.

Esses organismos da classe Dinophyceae, também chamados de dinoflagelados, são comumente encontrados em águas bem oxigenadas e podem tolerar uma ampla faixa de pH e condições de luminosidade, sendo considerados indicadores de ambientes oligotróficos (GOMES; IBAÑEZ; FREITAS, 2010), caracterizando mais um motivo que justifica a presença de *Peridinium* nos ambientes analisados no presente estudo.

Mesmo com a sua importância em água doce, pouco se sabe sobre os fatores que influenciam a ocorrência das Dinophyta nestes ambientes (GRIGORSZKY et al., 2003).

Abaixo, uma imagem mostrando *Peridinium* sp.

Figura 14 - Registros de micrografia ilustrando *Peridinium* sp, dinoflagelado registrado em elevadas densidades em P14.



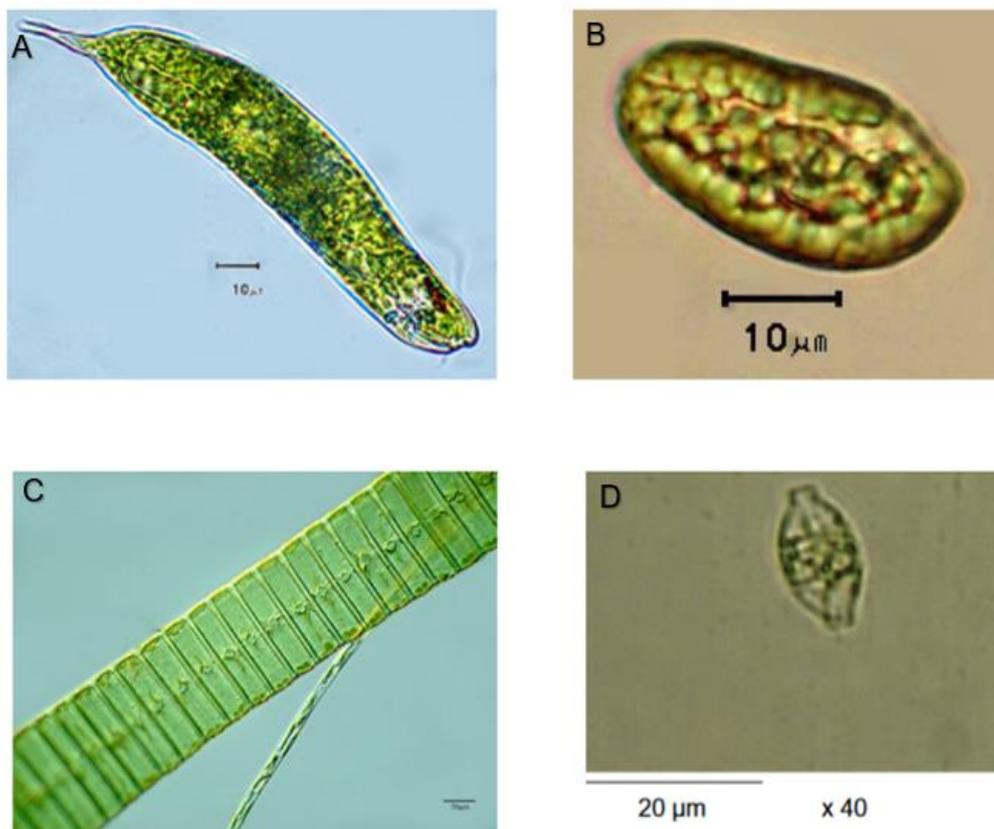
Fonte: Baker et al., 2012.

5.2.5 Organismos encontrados em ambos os pontos

Conforme visto mais acima, muitos organismos foram comuns aos dois locais analisados, como é o caso de *Microcystis* sp., Células livres de *Microcystis* sp., *Limnothrix* sp. (Cyanophyceae), *Dictyosphaerium pulchellum* (Chlorophyceae), *Trachelomonas* sp., *Trachelomonas volvocina*, *Euglena* sp. (Euglenophyceae), *Eunotia* sp., *Navicula* spp., *Aulacoseira granulata*, *Aulacoseira* sp., *Cyclotella* sp. (Bacillariophyceae), *Peridinium* sp. (Dinophyceae) e *Cryptomonas* sp. (Cryptophyceae).

Na figura 15, é possível observar imagens de microscopia referentes a alguns dos representantes de microalgas registrados em CM e P14.

Figura 15 - Registros de micrografia ilustrando alguns representantes das microalgas encontradas nos pontos CM e P14.



A. *Euglena* sp de um lago nos EUA. Fonte: BAKER et al. (2012). **B.** *Cryptomonas cf ovata*. Fonte: Baker et al. (2012). **C.** *Eunotia* sp. Fonte: Baker et al. (2012). **D.** Micrografia de *Navicula* sp. Fonte: Fimbres-Olivarria et al., 2018.

A adaptação destes organismos, por estarem presentes em ambos os locais, pode estar relacionada ao aparecimento de células resistentes que tenham surgido espontaneamente em populações em equilíbrio. Além disso, como foram registrados em ambos os pontos, podem ser classificados como organismos extremotolerantes e não, extremófilos obrigatórios (BASELGA-CERVERA et al., 2020).

Outro fator que pode justificar o aparecimento destes organismos em ambos os locais seriam seus mecanismos biológicos com capacidade de suportar uma ampla faixa de pH e elevadas concentrações de metais, como é o caso de *Euglena*, um gênero comumente relatado em águas naturais ou antropogênicas ácidas e ricas em metais, pois podem limitar o acesso de elementos tóxicos para o interior das células

através do processo de adsorção de metais à parede celular, de modo a permitir sua sobrevivência em condições de estresse (VALENTE; GOMES, 2007). É muito comum a ocorrência de *Euglena mutabilis* em águas impactadas de minas. Inclusive, este organismo muitas vezes é tido como uma “espécie indicadora” de ambientes com drenagem ácida de mina (NANCUCHEO e JOHSON, 2012; VALENTE; GOMES, 2007).

Dentro do gênero *Euglena*, a espécie *Euglena gracilis* é capaz de tolerar uma ampla faixa de contaminantes, crescendo sob condições ácidas e radiação ionizante, além da sua capacidade em sequestrar metais (GISSIBL et.al, 2019; MACIEL, et.al, 2020). Da mesma forma, *Euglena mutabilis* é uma espécie abundante em lagos ácidos (LESSMANN; FYSON; NIXDORF, 2000), mas também é bem distribuída em ambientes alcalinos, além de águas com alto ou baixo teor de minerais, indicando sua abundância e ótima distribuição em diversos ambientes (WEHR; SHEATH; KOCIOLEK, 2015), assim como foi visto no presente estudo.

O gênero *Eunotia*, por possuir grande variabilidade morfológica, tem a classificação taxonômica um pouco difícil a nível de espécie. É um gênero bem representado em águas ácidas e estes organismos preferem principalmente águas oligotróficas (GLUSHCHENKO; KULIKOVSKIY, 2017). *Eunotia exigua* é uma das espécies mais encontradas em lagos da América do Norte e da Europa e em riachos que recebem DAM (DeNICOLA, 2000).

O gênero *Navicula* também é com frequência reportado em lagos ácidos com influência de DAM (BASELGA-CERVERA et al., 2020; GOMES et al., 2021; KALIN et al., 2006; PRASANNA et al., 2011) e já foi encontrado em lagos próximos a antigas áreas de mineração (SALONEN; TUOVINEN; VALPOLA, 2006), assim como registrado no presente estudo ao ser encontrado em amostras dos dois locais de amostragem avaliados.

Um organismo que foi registrado em todos os períodos amostrados para os dois locais analisados foi *Cryptomonas* sp. Estas microalgas são comuns em uma variedade de ambientes aquáticos e sua identificação, quando provenientes de amostras de campo, é complicada, visto que há uma variedade morfológica muito grande e podem existir dois morfotipos distintos em certas espécies. Mas, de uma forma geral, as *Cryptomonas* conseguem tolerar grandes amplitudes de faixas de pH

e existem estudos que mostram que, quando isoladas, em laboratório, de diferentes regiões geográficas, elas exibem faixas ótimas de crescimento em pH correlacionados aos do ambiente do qual foram isoladas, mostrando uma excelente capacidade de adaptação (WEHR; SHEATH; KOCIOLOKE, 2015). Essa sua capacidade de adaptação, dependendo do pH em que se encontre, pode justificar seu aparecimento nos dois locais aqui analisados.

Outra característica interessante de *Cryptomonas* sp. é que possuem a capacidade de migração e fazem uso dela, principalmente quando há pouca intensidade de luz ou fatores que limitam seu crescimento, como fósforo e nitrogênio (KNAPP et al., 2003). Isso provavelmente faz com que tenham mais sucesso na colonização de diversos ambientes e sejam registradas com frequência.

Cryptomonas sp. também foi frequente no estudo de Kalin et al. (2006) ao analisarem a comunidade fitoplanctônica de um lago ácido no Canadá, apresentando frequência de 43,8%.

Herlory et al. (2013) encontraram espécies comuns a um local tido como referência e um local impactado a jusante da descarga do efluente da mina de urânio Fanay-Augeres na França, como *Aulacoseira*, *Eunotia*, *Gomphonema* e *Pinnularia*. Mas, ao analisarem as espécies sensíveis, que estavam presentes no local de referência e desapareceram ou foram substituídas por espécies tolerantes à DAM, encontraram *Eunotia pectinalis* var *undulata*, *Psammothidium rechtensis*, *Gomphonema lagenula* e *Pinnularia major*, concluindo que o lançamento dos efluentes de urânio tratados mudaram a comunidade de diatomáceas existente nos rios ao entorno. Segundo esses autores, das variáveis ambientais analisadas, cloro, urânio dissolvido, bário dissolvido e potencial de óxido-redução tiveram grande influência na composição da comunidade de diatomáceas (HERLORY et al., 2013). No presente estudo, a Classe Zygnematophyceae seguida por Chrysophyceae foi a que se mostrou mais sensível ao lançamento dos efluentes de urânio, pois raramente foram registradas em P14.

Vale destacar que a comunidade fitoplanctônica é fortemente influenciada pela química da água. Conseqüentemente, um grupo dominante em certo momento, pode não ser o grupo dominante em um outro momento. No estudo de Kalin et al. (2006), foi isso que se verificou com *Dictyosphaerium pulchellum*, que apresentou dominância

nos dois anos iniciais do estudo e depois foi substituído por *Chlamydomonas* sp. Assim, o monitoramento constante da qualidade da água juntamente com a comunidade fitoplanctônica é essencial para preservação do ambiente e da biota aquática.

5.3 Potencial biotecnológico do fitoplâncton em ambientes extremos

Alguns organismos são capazes de viver em ambientes extremos de pH, pressão, temperatura e salinidade, sejam eles de origem natural ou antropogênica. Esses organismos, em geral, precisam desenvolver mecanismos especiais que lhes permitam crescer e sobreviver em tais ambientes. No caso das microalgas, aquelas que são capazes de crescer na neve, apresentam estrutura de membrana que protege a célula dos efeitos danosos do congelamento; as microalgas que vivem em fontes termais, desenvolveram enzimas que são resistentes a altas temperaturas. Sendo assim, essas cepas potenciais precisam ser identificadas para que, através da Biotecnologia, possam ser cultivadas em massa visando o aproveitamento do seu potencial para diversos fins, entre eles o de remediação ambiental. Outra abordagem interessante para a Biotecnologia é identificar os genes que conferem esta resistência aos organismos extremófilos, e cloná-los em outros organismos que sejam mais fáceis de ser cultivados em massa (VARSHNEY et al., 2015).

Microalgas extremofílicas podem ter inúmeras aplicações biotecnológicas, seja no tratamento de águas residuais, biorremediação, produção de biocombustíveis, biopolímeros, aplicação nas indústrias de cosméticos, entre outros. Os pigmentos das microalgas têm um enorme potencial para sucesso comercial, como é o caso dos carotenoides, que possuem excelentes propriedades antioxidantes, protegendo os humanos de envelhecimento prematuro, certos tipos de câncer, doenças cardiovasculares e/ou artrite, reduzindo riscos de AIDS, diabetes, catarata, neurodegeneração (MALAVASI; SORU; CAO, 2020).

Além disso, já foi discutido anteriormente e evidenciado que o emprego de técnicas alternativas, como por meio de biotratamento, seria bastante promissor e interessante para ser aplicado na UDC/INB. Entre essas técnicas alternativas, pode-se citar o emprego das microalgas autóctones que auxiliam bastante no processo de

remoção do manganês, por se tratar de uma alternativa que é economicamente viável e não gera poluição secundária. No estudo de Cândido (2018), realizado em laboratório, com a microalga *Chlorella vulgaris*, a autora verificou que o crescimento da microalga e sua realização de fotossíntese, fez com que ocorresse um aumento do pH para ≥ 8 e isso ajudou na remoção do Mn (II), onde ocorreu a precipitação do Mn (II) na forma de óxido de manganês, mostrando que esta microalga pode ser utilizada para biorremediação de ambientes contendo Mn (II). Richardson, Aguilar e Neelson (1988) também verificaram que a remoção do Mn (II) solúvel por *Chlorella* sp é dependente do pH resultante da atividade fotossintética, onde a remoção ocorre principalmente em pH $> 9,0$. Então, uma sugestão seria o emprego desta microalga como parte do tratamento empregado pela UDC/INB para tentar solucionar esses problemas com as concentrações elevadas de manganês no ambiente aquático ao entorno.

Dentre as microalgas extremofílicas acidofílicas, aquelas que toleram baixos valores de pH, pode-se destacar os gêneros *Chlamydomonas*, *Euglena*, *Klebsormidium*, *Ochromonas*, *Pinnularia* e *Coccomyxa*, as quais podem ser facilmente isoladas de ambientes com DAM (MALAVASI; SORU; CAO, 2020). Destas, *Chlamydomonas*, *Euglena* e *Pinnularia* foram registradas no presente estudo.

No presente estudo, o ponto CM pode ser considerado como um ambiente extremo de origem antropogênica devido aos baixos valores de pH e concentrações elevadas de metais estáveis e radioativas, e mesmo assim, muitas microalgas foram registradas no local, como já foi discutido anteriormente. Entre esses organismos que foram registrados em CM, podemos destacar *Chlamydomonas* sp., *Desmodesmus* sp. e *Botryococcus* sp., os quais desempenham importantes papéis relacionados à biotecnologia e remediação ambiental, assim como *Euglena* sp., que também foi registrada em P14.

5.3.1 *Chlamydomonas* sp.

Dean et.al (2019) estudaram os mecanismos de adaptação de uma cepa de *Chlamydomonas acidophila*, capaz de sobreviver em pontos mais ácidos e com maior concentração de metais em locais impactados por uma mina de cobre desativada no

Reino Unido. Este organismo foi capaz de crescer em uma ampla faixa de pH, tendo sua faixa ótima de crescimento em pH 3 – 5, sendo também capaz de crescer em concentrações altas de Cd, Cu e Zn, com bioacumulação dentro da célula, mostrando tolerância a estes metais devido a uma adaptação metabólica. Ao compararem a tolerância aos metais desta cepa isolada de *C. acidophila* com outras cepas isoladas de diferentes ambientes ácidos, foi verificado que esta cepa de *C. acidophila* apresentou tolerância muito maior ao Cu, sugerindo uma adaptação ao excesso de Cu, indicando, dessa forma, que essas cepas de *C. acidophila* podem ser úteis na biorremediação.

Tal resultado acima destaca a importância de estudos de bioprospecção em locais de interesse para aplicação potencial de processos de biotratamentos, uma vez que as espécies locais podem estar adaptadas as características do efluente a ser tratado.

Chlamydomonas sp também se destaca em relação à remediação de ambientes contaminados com urânio. García-Balboa et al. (2013) estudaram a adaptação de microalgas em pontos extremamente poluídos de águas residuais vindas de área de mineração de urânio em Salamanca, Espanha. Como resultado, encontraram espécies de Chlorophyta, principalmente *Chlamydomonas* sp., capazes de se adaptarem rapidamente a essas águas residuais da mineração de urânio e isso foi possível graças à recombinação genética conseguida por reprodução sexuada, por meio da qual células resistentes foram surgindo a partir de mutações espontâneas raras. Segundo estes mesmos autores, a mutação de um único gene foi suficiente para permitir adaptação de *C. reinhardtii* e *Dictyosphaerium chlorelloides* ao ambiente hostil analisado.

Da mesma forma, no estudo de Baselga-Cervera et al. (2018), em que analisaram efluentes de mina de urânio na região de Salamanca, Espanha, as espécies do gênero *Chlamydomonas* também foram predominantes. Os autores escolheram este gênero de microalga com o objetivo de verificar a absorção de urânio por células decantadas ou solubilizadas na amostra dos efluentes da mina de urânio. Como resultado, encontraram que as células decantadas em amostras do efluente da mina de urânio, tiveram sua capacidade de absorver urânio aumentada em aproximadamente 1,5 vezes. Esses resultados abrem novas perspectivas promissoras para biorremediação em efluentes e ambientes contendo urânio.

Além disso, quando cultivadas em meio ácido (pH 3,5 – 4,5), *Chlamydomonas acidophila* se mostrou uma ótima produtora de lipídeos, com ácidos graxos adequados para produção de biodiesel (SOUZA et al., 2017). É muito comum o uso de microalgas para produção de biocombustíveis (Ganesan et al., 2020; Peng et al., 2020; Suparmaniam et al., 2019) e isso pode ser feito basicamente de duas formas, fisiologicamente aplicáveis: bioprospecção de cepas que contenham alto teor de lipídeos e/ou estimulação de lipídeos através do aprimoramento das cepas (AHMAD et al., 2022).

O lipídeo, depois de extraído, é convertido em ácido graxo e através do processo de transesterificação, o ácido graxo é convertido em ésteres metílicos de ácidos graxos (FAME), denominado como biodiesel. Cerca de 80% do volume de óleo extraído das microalgas pode ser usado para produzir biodiesel (AHMAD et al., 2022).

Embora as microalgas sejam promissoras, além de serem uma alternativa sustentável para a produção de biocombustíveis, a produtividade gerada por estes organismos costuma ser baixa, fazendo com que esta não seja uma alternativa economicamente viável. Para resolver esta limitação, pode ser obtido aumento da produtividade por engenharia genética, através da manipulação de múltiplas vias metabólicas, com o objetivo de induzir a biossíntese de compostos bioquímicos na célula (RANJBAR, MALCATA, 2022).

Uma alternativa, no caso do tratamento de efluentes radioativos ácidos, o custo-benefício da aplicação de biotratamentos pode ser equalizado com princípio de economia circular: tratar o efluente com a produção concomitante de biodiesel. De acordo com o Comitê Técnico da Organização Internacional de Normalização (ISO/TC 323, 2018), economia circular é um conceito que associa desenvolvimento econômico a um melhor uso de recursos naturais, por meio de novos modelos de negócios e da otimização nos processos de fabricação com menor dependência de matéria-prima virgem, priorizando insumos mais duráveis, recicláveis e renováveis.

A espécie *Chlamydomonas reinhardtii* tem se destacado em diversos estudos de biotecnologia devido à sua fisiologia e genoma bem compreendidos. Dessa forma, pesquisadores relatam que o teor de óleo desta microalga pode ser aumentado pela superposição de enzimas-chave responsáveis por catalisar a biossíntese de lipídeos (KONG et al., 2019). Graças aos atuais avanços na genômica e transcriptômica de

microalgas, está ficando mais fácil identificar as sequências genéticas que codificam enzimas de interesse nas aplicações biotecnológicas (VINGIANI et al., 2019).

Além disso, *C. reinhardtii* tem sido usada como organismo modelo para estudos visando a produção de biohidrogênio comercialmente viável. Atualmente, o hidrogênio é produzido principalmente a partir de carvão e gás natural. Por conseguinte, surge a necessidade de desenvolver outros métodos que não utilizem combustíveis fósseis para sua produção. Neste contexto, o emprego de métodos biológicos se destaca e parece bastante promissor, incluindo vários estudos com *C. reinhardtii*, pois é uma espécie que possui a enzima hidrogenase, que é utilizada na produção de biohidrogênio, considerado uma possível fonte de combustível (IQBAL et al., 2022; KING et al., 2022).

A enzima hidrogenase também pode ser encontrada em microalgas pertencentes aos gêneros *Synechocystis*, *Nostoc*, *Anabaena*, *Botryococcus*, *Scenedesmus*, *Chlorella*, entre outros (EROGLU e MELIS, 2011).

Ademais, um ponto interessante relacionado à produção de biohidrogênio é que co-culturas de microalgas juntamente com bactérias, são capazes de gerar mais biohidrogênio do que culturas individuais de cada organismo (IQBAL et al., 2022). Um exemplo dessa associação é entre a bactéria *Methylobacterium oryzae* e a microalga *Chlamydomonas reinhardtii* que, quando consideradas no contexto de bioremediação de águas residuais, são capazes de gerar biohidrogênio como subproduto de reações, e ainda remover nitrogênio inorgânico do meio (IQBAL et al., 2022; TORRES et al., 2022).

De um modo geral, *Chlamydomonas* é um organismo modelo de microalga que vem sendo utilizada em inúmeras pesquisas com fins biotecnológicos, todas com intuito de produção de bioprodutos de alto valor, tais como, biocombustíveis, pigmentos, medicamentos, entre outros. Recentemente, técnicas de edição genética vêm sendo empregadas para o melhoramento de características de interesse de *Chlamydomonas*, destacando-se a técnica CRISPR-Cas9 com adaptações (GHRIBI et al., 2020).

No que diz respeito ao uso de microalgas para tratamento de águas residuais, devem ser levantadas questões como taxa de crescimento rápido, elevada taxa de remoção de nutrientes, boa adaptabilidade e alta produtividade de biomassa, para

serem escolhidos os melhores grupos para estes fins (AHMAD et al., 2022). Novamente, é possível observar que *Chlamydomonas* se destaca. *Chlamydomonas* sp também mostrou ter um potencial promissor para o tratamento de águas residuais urbanas, sendo capaz de remover 100% de N_{total} , 94% de P_{total} , 56% de DQO e 41% de DBO, e apresentar boas taxas de crescimento, o que fez com que a biomassa cultivada nestas águas residuais, fosse transformada em produtos como carotenóides, lipídeos, microproteínas e enzimas industriais, com a ajuda também da fermentação fúngica (MALIK et al., 2022).

Recentemente, pela primeira vez na literatura, Senhorinho, Laamanen e Scott (2018), ao analisarem microalgas verdes de ambientes extremos antropogênicos, descobriram nestes organismos fontes potenciais de ação antibacteriana. Dos gêneros de microalgas testadas, destacaram-se *Chlamydomonas*, *Scenedesmus* e *Coccomyxa*, todas tendo proporcionado atividade antibacteriana contra *Staphylococcus aureus*. Um ponto interessante é que *Chlamydomonas* e *Coccomyxa* vieram de amostras de água exibindo pH muito baixo, em torno de 2,9. Esses resultados evidenciam um potencial biotecnológico promissor de microalgas verdes que podem ser isoladas de ambientes ácidos, incluindo os que estiverem sob estresse antropogênico.

5.3.2 *Desmodesmus* sp.

Com relação à remediação de ambientes contaminados, já foi dito anteriormente que as microalgas possuem um imenso destaque e importância. Atividades de mineração, mesmo quando encerradas, exigem tecnologias sustentáveis, eficientes, duradouras e econômicas que possam reduzir os níveis de toxicidade de metais pesados nos fluxos de água. A microalga *Desmodesmus* sp. é uma ótima solução para remediação de ambientes afetados por atividades de mineração, pois tem uma ótima capacidade de sequestrar metais pesados em soluções aquosas (DIALE, 2015), assim como várias outras espécies de microalgas.

No caso de ambientes com DAM, como é o caso do ponto CM da UDC/INB, a identificação de microrganismos adequados para remoção de metais e produção de biodiesel é muito promissora e necessária na remediação de tais ambientes extremos,

e *Desmodesmus* sp., encontrada no presente estudo pode ser utilizada, pois uma de suas características é a de crescer bem em ambientes com elevadas concentrações de metais, como por exemplo, ferro. Abinandan et al. (2020) realizaram o primeiro estudo que mostrou o potencial de microalgas tolerantes a ácido, como *Desmodesmus* sp., na remoção de ferro e na produção de biodiesel quando cultivadas em condições extremas. Neste trabalho mencionado, os autores cultivaram *Desmodesmus* sp em meio sintético com concentração de ferro em 200mg/L, simulando ambientes com DAM, e a microalga foi capaz de apresentar um bom crescimento neste meio, podendo remover quantidades significativas do metal. Essa remoção esteve relacionada à alteração na granularidade celular, gerando um acúmulo extracelular e aumento da produção de exopolissacarídeos em condições de estresse originadas pelos metais. Além disso, a transesterificação, processo pelo qual é produzido o biodiesel, *in situ* da biomassa enriquecida com metal, rendeu de 12% a 20% de biodiesel (ABINANDAN et al., 2020).

Além da remoção do ferro, *Desmodesmus* sp. também pode ser útil na remoção do fósforo e metais como cobre e níquel de águas residuais. Quando cultivada em meio contendo concentrações de P de 4,55 mg/L, esta microalga foi capaz de realizar remoção de P em mais de 90%. Da mesma forma, após dois dias de exposição ao Cu e Ni, removeu 94% de Cu e 85% de Ni, mostrando sua ótima capacidade para biorremediação de tais ambientes contaminados (RUGNINI et al., 2018).

Outra aplicação interessante e muito importante de *Desmodesmus* sp. Está relacionado ao potencial de oxidação do manganês, uma vez que este metal é encontrado em concentrações altíssimas no ponto CM e, mesmo após o tratamento do efluente, este elemento ainda foi encontrado em concentrações superiores ao permitido pela legislação vigente, quando analisado no P14. Wang et al. (2017), estudando a aplicação de *Desmodesmus* sp. na remoção do Mn, viram que esta microalga tem a capacidade de oxidar Mn (II), formando óxidos de manganês biogênicos que têm o potencial de remover bisfenol A (BPA) do ambiente. Dessa forma, esses óxidos de manganês biogênicos gerados por algas podem ser úteis na degradação de poluentes orgânicos contidos na água ou sedimentos, contribuindo para remediação ambiental.

Abinandan et al. (2019) ao investigarem o potencial de *Desmodesmus* sp. na remoção de Mn, Zn e Fe, viram que em concentrações de 10 – 20 mg/L destes metais

e em pH de 3,5, o crescimento desta microalga foi satisfatório, principalmente através de acúmulo intracelular, levando à remoção de 40-80% para o Fe e de 40-60% para o Mn. Além disso, estes autores também viram que esta microalga foi útil na produção de biodiesel, indicando ser uma candidata adequada para biorremediação e produção sustentável de biomassa e biodiesel (ABINANDAN et al., 2019).

Frente ao potencial biotecnológico citada por Abinandan et al. (2019), a ocorrência de *Desmodesmus* sp. em amostras da CM vem corroborar que esta microalga tem potencial para aplicação no tratamento de efluentes da CM, contaminado com concentrações expressivas de Fe, Mn e Zn, em ambiente com DAM.

5.3.3 *Botryococcus* sp.

Outro organismo registrado em CM, que apresenta ótimas capacidades de remoção de metais foi *Botryococcus* sp. Os autores Areco, Haug e Curutchet (2018) registraram que a espécie *Botryococcus braunii* foi capaz de remover Zn de soluções aquosas por longos períodos de tempo através dos processos de adsorção e principalmente por precipitação, graças à sua notável capacidade de reverter condições ácidas do meio. Sendo assim, é um ótimo candidato para biorremediação, pois além do Zn, consegue remover metais como Ni e Cu, sendo uma excelente opção para utilização em medidas de remediação ambiental nos corpos aquáticos ao redor da UDC/INB.

B. braunii também é considerada uma fonte alternativa de biodiesel, pois consegue armazenar altas quantidades de lipídeos, gerando grandes quantidades de óleo. Além disso, seus hidrocarbonetos possuem eficiência que se assemelha em 90% com o petróleo (MACIEL et al., 2020).

Vishwakarma et al. (2019) estudaram a extração de lipídeos através de biomassa seca de *Botryococcus* sp. por meio da técnica de transesterificação por microondas, e obtiveram uma eficiência elevada na extração lipídica (63,03% em peso seco), com a vantagem de ser um método ambientalmente e economicamente amigável. Por outro lado, estes autores registraram como desvantagens do processo a baixa eficiência das micro-ondas quando os compostos alvo ou os solventes não

são polares ou voláteis. De qualquer forma, os autores mostraram que esta microalga é uma boa opção para produção de biodiesel.

Botryococcus também é cultivada com sucesso em águas residuais domésticas, gerando altas concentrações de biomassa e altas taxas de remoção de poluentes (DO et al., 2022).

5.3.4 *Euglena* sp.

Euglena é outro gênero reportado com frequência em ambientes extremos e com diversas aplicações em biotecnologia. Como exemplo, tem-se *Euglena gracilis*, microalga com inúmeras aplicações biotecnológicas, entre elas: produção de cosmecêuticos e nutracêuticos, suplemento nutricional na aquicultura e alimentação animal, biomateriais, biorremediação de metais pesados, águas residuais e avaliação de risco ecotoxicológico (KRAJCOVIC; VESTEG; SCHWARTZBACH, 2015). Além da produção de metabólitos, ela também é útil na produção de biocombustíveis e biogás (KHATIWADA; SUNNA; NEVALAINEN, 2020) e é um dos poucos organismos capazes de produzir, simultaneamente, antioxidantes junto com ésteres de cera, fitotoxinas e ácidos graxos poliinsaturados. Os lipídios de *Euglena* são ricos nesses ácidos graxos poliinsaturados, os quais têm inúmeras aplicações médicas: prevenção e tratamento de câncer, controle do colesterol e da pressão arterial, prevenção de doenças cardiovasculares, auxiliam no desenvolvimento cerebral e são essenciais na nutrição infantil (KOTTUPARAMBIL; THANKAMONY; AGUSTI, 2019).

Euglena gracilis também é capaz de tolerar uma ampla faixa de concentração de contaminantes, crescendo sob condições ácidas e radiação ionizante, além da sua capacidade em sequestrar metais pesados. Todas essas características tornam *E. gracilis* útil na biorremediação de água poluída contendo níveis elevados de fosfatos, carbono orgânico, nitrogênio, cádmio, cromo, mercúrio, chumbo, urânio e zinco (GISSIBL et al., 2019).

5.4 Prospecção tecnológica – busca de patentes

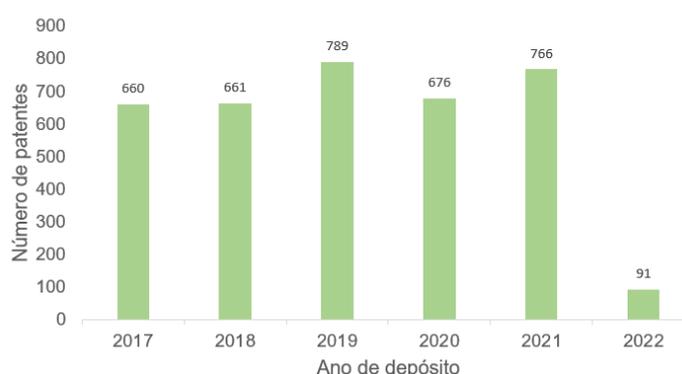
A realização de um levantamento de patentes é importante e interessante pois, segundo Kupfer e Tigre (2004):

A prospecção tecnológica pode ser definida como um meio sistemático de mapear os desenvolvimentos científicos e tecnológicos capazes de influenciar de forma significativa uma indústria, a economia ou a sociedade como um todo (KUFPER e TIGRE, 2004).

Dessa forma, a busca de patentes, que também é conhecida como prospecção tecnológica, pode identificar as mais novas tecnologias emergentes e o quanto elas podem ser benéficas para a sociedade e o meio ambiente, de uma forma geral. Além disso, também permitem ampliar o conhecimento nas universidades e a inovação nas empresas.

Neste trabalho, a busca de patentes foi realizada na base de dados WIPO, conforme descrito em metodologia. Colocando-se o termo de busca “*microalgae*” foram identificadas 3643 (três mil seiscentas e quarenta e três) patentes, no período de 2017 a 2022. O gráfico abaixo, representado pela figura 16, ilustra a evolução das patentes durante estes anos.

Figura 16 - Quantidades de patentes depositadas no período de 2017 a 2022, colocando-se o termo de busca “*microalgae*” na plataforma WIPO.



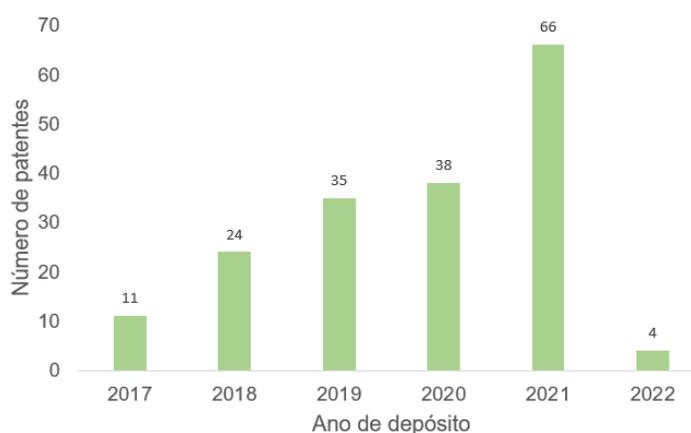
Fonte: Autora, 2022.

Pelo gráfico acima, é possível observar que o ano de 2019 se destacou, contabilizando 789 patentes depositadas, seguido de 2021 com 766. O ano de 2022 é o que apresenta, ainda, o menor número de depósitos, mas estes dados foram

obtidos somente até a data de 05/06/2022, sendo provável que até o final do ano, este número tenha aumentado.

Dessas 3643 patentes depositadas no período de 2017 até metade de 2022, foram analisadas as que mais condiziam com os assuntos abordados no presente estudo, ou seja, patentes referentes ao uso de microalgas relacionadas à biorremediação de áreas contaminadas. Com relação a este assunto, o número de patentes depositadas cai para 178, considerando o mesmo período. O gráfico abaixo mostra esses resultados (Figura 17).

Figura 17 - Quantidades de patentes de interesse depositadas no período de 2017 a 2022, utilizando o termo de busca “*microalgae*” na plataforma WIPO. Essas patentes de interesse correspondem à aplicação de microalgas em processos de biorremediação.



Fonte: Autora, 2022.

Excluindo-se o ano de 2022, pois os dados se referem às patentes analisadas somente até metade do ano, nota-se uma evolução crescente com o passar dos anos acerca da quantidade de depósitos de patentes no assunto de interesse. Logo, o ano de 2021 foi o que mais apresentou registros de patentes, correspondendo a 66 depósitos. Entretanto, quando analisamos em termos de porcentagem, considerando as quantidades de patentes de interesse que foram depositadas em relação à quantidade total de patentes no mesmo período, essa visualização não é tão evidente, como pode ser visto nos gráficos abaixo. Isso mostra que, embora estejam ocorrendo, com o passar dos anos, mais depósitos de patentes usando microalgas, quando analisamos a área de biorremediação, esse número ainda é muito pequeno,

correspondendo a uma pequena porcentagem do total, como pode ser visto na figura 18.

Figura 18 - Representação da quantidade de patentes envolvendo microalgas que foram depositadas entre 2017 e 2022, relacionando a quantidade de patentes na área de interesse e a quantidade total, em termos de porcentagem.

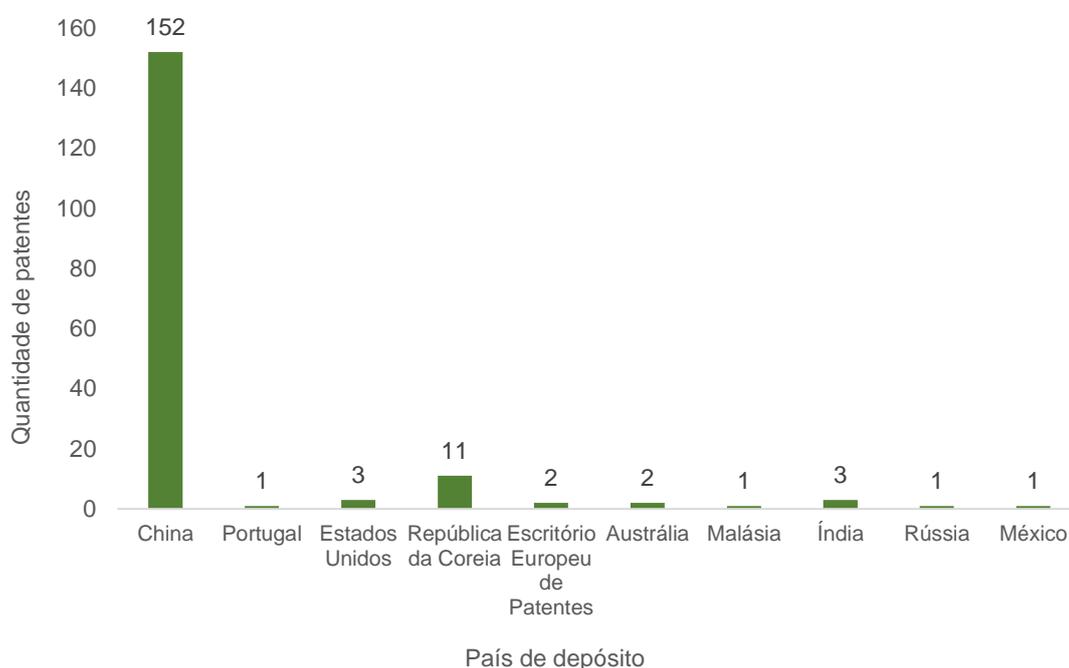


Fonte: Autora, 2022.

Novamente, em termos de porcentagem, podemos notar que o ano de 2021 foi o que se destacou, até o momento, com relação às patentes da área de interesse.

Nos demais anos, percebe-se uma certa evolução, mas ainda muito pequena, sendo que as patentes abordando o uso de microalgas para biorremediação de águas e/ou áreas contaminadas correspondem somente a cerca de 4% do total de patentes depositadas que empregam o uso de microalgas.

Com relação aos países que mais depositaram, a China se destaca, como pode ser visto na figura 19.

Figura 19 - Países nos quais as patentes de interesse foram depositadas.

Fonte: Autora, 2022.

Conforme mostrado no gráfico acima, somente a China detém 152 depósitos dentre os 178 aqui analisados. Em segundo lugar aparece a República da Coreia com 11 patentes, seguida de Estados Unidos e Índia com 3 patentes cada um. Os demais países contam com apenas 1 e 2 registros no período de 2017-2022 com relação ao uso de microalgas em processos de biorremediação.

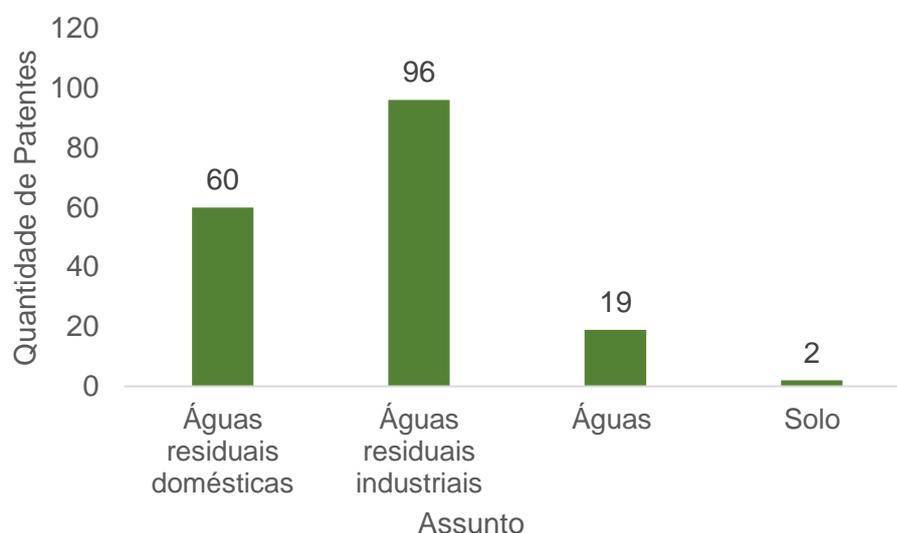
Alba, Sugimoto e Morioka (2021), ao analisarem patentes envolvendo microalgas, também verificaram que o continente asiático se destacou com relação ao número de patentes depositadas e a China liderou o ranking, com 45% dos depósitos.

Da mesma forma, Pessôa et al. (2021), ao realizarem uma busca de patentes sobre o uso de microalgas para tratamento de efluentes viram que, do total de documentos analisados, o maior número também pertenceu à China, correspondendo a 65%, seguido pela Coreia do Sul com 15%. Entretanto, embora o desenvolvimento tecnológico de patentes seja principalmente oriundo da China, ela não se destaca tão evidentemente assim em publicações científicas, mostrando que suas patentes são mais focadas em aplicações de mercado (GARRIDO-CARDENAS et al., 2018).

O que pode justificar o destaque da China em relação ao número de patentes são as leis de patentes do país, que passaram por algumas mudanças nos últimos anos, incluindo medidas para fomentar a biotecnologia local. O Estado passou a apoiar fortemente a ciência e tecnologia e, assim, foram emergindo diversas inovações e, conseqüentemente, o patenteamento também foi crescendo significativamente (ZUCOLOTO, 2013).

Quando analisamos as patentes relacionadas aos assuntos abordados dentro da área de interesse, temos o resultado mostrado na imagem abaixo, figura 20.

Figura 20 - Quantidade de patentes com os principais assuntos abordados dentro da área de interesse.



Fonte: Autora, 2022.

Como pode ser visto na Figura 20, patentes envolvendo o uso de microalgas para biorremediação de águas residuais industriais se destaca, seguido da aplicação no tratamento de águas residuais domésticas, tratamento de águas e por fim, no de solos.

Nesse caso, foram classificadas como águas residuais industriais aquelas resultantes de processos industriais, quer sejam relacionadas à mineração, ao tratamento de efluentes, a processos de aquacultura, à refinação de petróleo, entre outros.

Foram classificadas como águas residuais domésticas, aquelas provenientes de esgotos, banhos, cozinhas, entre outros.

Como tratamento de água, foram englobadas remediação *in situ* de rios e lagos, monitoramento da qualidade da água, biorremediação de corpos d'água, entre outros.

Os principais gêneros de microalgas empregados nestes estudos que originaram as patentes pertencem a *Spirulina* e *Chlorella*, nenhum registrado no presente estudo. Na patente registrada por Qiang e Weixian (2019), os autores utilizaram a cepa de *Chlorella* W4 capaz de remover metais pesados em corpos d'água, removendo altas taxas de Zn, Ni e Cr, mostrando que seu uso é adequado para remoção de metais pesados em águas poluídas.

Xiaodong et al. (2021) também registraram patente com o uso de *Chlorella* para remoção de metais pesados em água, dessa vez utilizando *Chlorella vulgaris*. O objetivo desta patente foi fornecer uma partícula desta microalga a base de biocarvão com alta capacidade de adsorção, longa vida útil e alta eficiência de remoção de metais pesados. Como resultado, viram que essas partículas de microalgas a base de biocarvão têm fortes efeitos de adsorção em íons de Pb, Cu, Zn, Fe, Cd, Bário, Al, Cr e Ni.

Considerando o número total de patentes depositadas, ainda é muito baixo o número de patentes relacionadas à área de biorremediação. Dos produtos originados de microalgas, aquele que mais se destaca com relação ao número de patentes, é o dos biocombustíveis, seguidos de lipídeos e pigmentos. Com relação à aplicação destes produtos originados das microalgas, os principais focos são saúde, energia e nutrição humana (WIPO, 2016).

De uma forma geral, a aplicação de microalgas em processos de biorremediação ainda é recente e necessita de mais pesquisas e estudos para que, em um futuro não muito distante, possamos ver suas aplicações em escala industrial, tornando os processos mais sustentáveis, contribuindo para o avanço da tecnologia verde.

5.5 Aplicações industriais das microalgas

Já foi discutido nos tópicos anteriores sobre as diversas aplicações que as microalgas podem ter, com base em informações obtidas a partir de artigos científicos ou patentes.

Como forma de complementar estas informações, neste item serão mostradas algumas aplicações industriais em andamento hoje em dia que fazem uso de microalgas.

Atualmente, mais de 200 espécies de microalgas são cultivadas industrialmente, seja com fins para dieta humana, produção de biocombustíveis, produtos farmacêuticos, biorremediação, ingredientes ativos de cosméticos, entre outros. Os principais gêneros são *Spirulina* e *Chlorella* (WIPO, 2016).

No Brasil, pesquisadores do Centro de Pesquisas da Petrobrás (Cenpe), em colaboração com a Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN), a Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ) e a Universidade Federal de Viçosa (UFV) desenvolvem um estudo pioneiro no Brasil: a produção de biocombustíveis a partir de microalgas, para serem aplicados em escala comercial, tanto o biodiesel quanto o bioquerosene de aviação – BioQAV (ABREU, 2021). As microalgas são cultivadas, crescem, geram biomassa que é usada para se extrair o óleo, e este óleo serve como matéria-prima para a produção do biocombustível. Além disto, pesquisadores da Petrobrás também estão estudando a possibilidade de serem cultivadas microalgas nas águas oriundas do processo de produção de petróleo, como uma forma de biotratamento (OLIVEIRA, 2018).

Na Flórida, a empresa Algenol, se destaca na área de Biotecnologia, pois faz uso de tecnologia de ponta para converter microalgas em produtos de alto valor e que sejam ambientalmente sustentáveis. De acordo com informações retiradas do site da empresa, extratos de microalgas são fornecidos com ingredientes que exercem funções em cuidados pessoais, na alimentação, na produção de biocombustíveis, biofertilizantes e biorremediação, mas não citam quais espécies são utilizadas (ALGENOL, 2022).

Em Israel, a empresa Seambiotic também utiliza microalgas para geração de biocombustíveis e, inclusive, desenvolve uma pesquisa em parceria com a NASA, com o objetivo de desenvolver uma variedade de biocombustível, a partir de microalgas, que seja comercialmente viável e que tenha um ponto de congelamento mais alto que os demais biocombustíveis à base de plantas (KLOOSTERMAN, 2011).

Viridos, anteriormente denominada Synthetic Genomics, na Califórnia, é outra empresa que se destaca no estudo da genômica de microalgas com o objetivo de produzir biocombustíveis de baixa intensidade de carbono, que poderão ser usados em aviação, caminhões comerciais e transporte marítimo, onde visam reduzir em até

70% as emissões dos gases do efeito estufa. As ações da empresa buscam desenvolver novas ferramentas e conhecimentos em bioengenharia, de modo a criar novos produtos e/ou processos que apoiarão uma bioeconomia sustentável (VIRIDOS, 2022).

Além disso, as microalgas também podem ser usadas na indústria alimentícia, pois apresentam altos níveis de proteínas, aminoácidos, pigmentos, ácidos graxos, enzimas e vitaminas. A empresa australiana Young Henrys utiliza microalgas em uma etapa da produção de cerveja, através do incrível “The Algae Project”. Este projeto tem o objetivo de fazer com que o CO₂, um subproduto gerado pelas leveduras no processo de fabricação da cerveja, seja levado através de tubulações até biorreatores nos quais acontece o cultivo das microalgas e, assim, estas possam consumir CO₂ e liberar O₂ pelo processo da fotossíntese, reduzindo assim as emissões de CO₂ para a atmosfera. Além disso, as microalgas que serão cultivadas captando o CO₂, terão sua biomassa transformada em suplemento alimentar para gado e também conseguirão reduzir as emissões de metano geradas pelo animal, sem prejudicá-lo (YOUNG HENRYS, 2022).

A empresa espanhola Neoalgae, utiliza microalgas em três ramos: bioestimulantes para promover uma agricultura ecológica, cosméticos dermatológicos e produtos alimentícios (NEOALGAE, 2022).

Diversas microalgas também são utilizadas para o desenvolvimento de produtos com propriedades terapêuticas, pois possuem a extraordinária capacidade de sintetizar compostos nutracêuticos, como ácido docosahexaenoico – DHA, ácido araquidônico – ARA e ácido eicosapentaenoico – EPA, além de pigmentos carotenoides como astaxantina, betacaroteno, entre outros (DERNER et al., 2006).

No Brasil, a empresa Pura Vida, com sede em São Paulo, comercializa Astaxantina produzida pela microalga *Haematococcus pluvialis*, como um medicamento natural com forte efeito antioxidante (PURA VIDA, 2022).

Com relação às microalgas usadas para remediação, foram mencionadas algumas patentes no item anterior, mas não foram encontradas empresas que já utilizem em escala industrial as microalgas com o intuito de aplicá-las em processos de biorremediação de efluentes. O que se sabe, através de pesquisas científicas, é que elas são capazes de realizar o processo de remoção de contaminantes, como metais pesados, com eficiência, principalmente organismos do gênero *Chlorella*.

No Brasil, estudos realizados na Embrapa mostraram que a microalga *Chlamydomonas biconvex* Embrapa LBA40 quando empregada no tratamento de efluente da indústria da vinhaça, mostrou-se eficiente. Também está sendo estudado seu potencial para uso no tratamento de material inorgânico no processamento do dendê, ou óleo de palma, para posteriormente, ser empregada em escala industrial (MEDEIROS, 2021).

6 CONCLUSÃO

Os resultados de bioprospeção mostraram ampla variedade de organismos planctônicos com potencial de aplicação biotecnológica para o tratamento dos efluentes radioativos ácidos da UDC/INB que podem ser utilizados dentro do conceito de economia circular. Assim, podem despertar o interesse da UDC/INB no desenvolvimento de tais biotecnologias, uma vez que esta instalação nuclear está em fase de descomissionamento; sendo o operador (UDC/INB) responsável por ações que permitam o tratamento dos efluentes gerados, dentro dos limites permitidos na legislação.

No presente estudo, foi encontrada uma flora de microalgas taxonomicamente diversa em ambos os pontos analisados. Para o ponto CM, considerado um ponto antropogênico extremo devido à ocorrência de DAM e altas concentrações de metais, foram registrados 25 táxons pertencentes a 7 classes, número maior do que o registrado por outros autores em ambientes com as mesmas características. Para o ponto P14, foram registrados 28 táxons pertencentes a 8 classes, número bem próximo ao encontrado em CM. As classes que mais se destacaram para ambos os pontos foram Bacillariophyceae e Chlorophyceae.

Esperava-se que o registro de táxons em CM fosse bem inferior ao de P14 devido às características físico-químicas de CM: pH ácido, elevadas concentrações de metais, como U, Mn, Zn, Al. No entanto, foram registradas quantidades de táxons semelhantes para ambos os pontos. Isso pode estar relacionado com uma possível adaptação de certas microalgas ao ambiente extremo no qual foram expostas, em relação ao CM. Com relação a P14, já era esperado encontrar uma comunidade diversa de microalgas, por ser um ponto no qual a qualidade da água é melhor.

Das microalgas que foram registradas somente em CM, *Chlamydomonas* sp, *Desmodesmus* sp e *Botryococcus* sp se destacam com relação à biotecnologia, pois em busca na literatura, foi identificado que estas microalgas são muito usadas em processos biotecnológicos de remediação ambiental, remoção de contaminantes de águas residuais, produção de biocombustíveis, pigmentos, medicamentos, entre outros, assim como *Euglena* sp, que também foi registrada em P14.

Com relação à busca de patentes realizadas neste trabalho, ainda existem poucos registros sobre o uso de microalgas com fins exclusivos de biorremediação ambiental, indicando ser uma área que ainda está em crescimento, mas que se mostra bastante promissora para um futuro próximo. Dos estudos que originaram as patentes, os gêneros de microalgas que se destacaram foram *Spirulina* e *Chlorella*, nenhum registrado no presente estudo.

Por fim, no que diz respeito às atuais aplicações industriais que fazem uso das microalgas em seus processos com o objetivo de gerar produtos de alto valor, pode-se afirmar que ainda é um mercado com obstáculos, principalmente na questão de escalabilidade para serem aplicadas comercialmente. Entretanto, já existem empresas consolidadas no mercado de biocombustíveis, nutrição, produção de cosméticos, mostrando ser uma área com inúmeros desafios, mas com perspectivas promissoras e o mais importante: ambientalmente sustentáveis.

Uma vez que a comunidade de organismos planctônicos pode ser substituída ao longo do tempo, uma sugestão para continuidade deste estudo de bioprospecção fosse o isolamento e cultivo destes organismos constituindo-se uma coleção para posterior avaliação de bioensaios, a fim do desenvolvimento de biotecnologia aplicada ao tratamento de drenagem ácida em minas de urânio.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABINANDAN, S. et al., 2018. Microalgal-bacterial biofilms: a sustainable synergistic approach in remediation of acid mine drainage. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.102, p.1131 – 1144, dez, 2018.
- ABINANDAN, S. et al., 2019. Potential of acid-tolerant microalgae, *Desmodesmus* sp. MAS1 and *Heterochlorella* sp MAS3, in heavy metal removal and biodiesel production at acidic pH. **Bio resource Technology**, v.278, p. 9-16, abr, 2019.
- ABINANDAN, S. et al., 2020. Sustainable iron recovery and biodiesel yield by acid-adapted microalgae, *Desmodesmus* sp MAS1 and *Heterochlorella* sp MAS3, grow in synthetic acid mine drainage. **ACS Omega**, v.5, p. 6888 – 6894, março, 2020.
- ABREU, F.C.P. A versatilidade das microalgas nas aplicações biotecnológicas. **Revista Blog do Profissão Biotec.** v.8, 2021. Disponível em: <<https://profissaobiotec.com.br/a-versatilidade-das-microalgas-nas-aplicacoes-biotecnologicas/>>. Acesso em 30 jun 2022.
- ACHARYA, C.; APTE, S.K. Insights into the interactions of cyanobacteria with uranium. **Photosynth Res.** v. 118, p. 83-94, set, 2013.
- AGUILERA, A. et al., 2006. A molecular approach to the characterization of the eukaryotic communities of an extreme acidic environment: methods for DNA extraction and denaturing gradient gel electrophoresis analysis. **Syst. Appl. Microbiol.**, v.29, p. 593-605, nov, 2006.
- AHALYA, N.; RAMACHANDRA, T. V.; KANAMADI, R. D. Biosorption of heavy metals. **Res. J. Chem. Environ.**, v. 7, p. 71-78, dez, 2003.
- AHMAD, S. et al., 2022. A critical overview of upstream cultivation and downstream processing of algae-based biofuels: opportunity, technological barriers and future perspective. **Journal of Biotechnology**, v. 351, p. 74-98, jun, 2022.
- ALBA, C.F.; SUGUIMOTO, H.H.; MORIOKA, L.R.I. Prospecção tecnológica de patentes sobre compostos bioativos de microalgas. **Brazilian Journal of Development.** v.7, n.8, p. 81223-81236, ago, 2021.
- ALGENOL. Using fundamental science and cutting edge technology algae product development and manufacturing. Disponível em: <<https://www.algenol.com/>>. Acesso em 08 de ago. 2022.
- ANAGOSTIDIS, K.; KOMÁREK, J. Modern approach to the classification system of Cyanophytes: 3 – Oscillatoriales. **Archiv fur Hydrobiologie.** Supplement, 80, 1-4, Stuttgart, p.327-472, jan, 1988.
- ANTUNES, S.C.; PEREIRA, R.; GONÇALVES, F. Acute and chronic toxicity of effluent water from an abandoned uranium mine. **Arch. Environ. Contam. Toxicol.** v.53, n. 2, p.207 – 213, jan 2007.
- ANTUNES, S. C. et al., 2007. Evaluation of water column and sediment toxicity from an abandoned uranium mine using a battery of bioassays. **Sci. Total Environm.**, v. 374, p. 252-259, março, 2007b.

AMARAL, E.C.S.; AZEVEDO, H.L.P.; MENDONÇA, A.H. Pre-operational environmental survey at the uranium mine and mill site, Poços de Caldas, Minas Gerais, Brazil. **The Science of The Total Environment**. v. 42, p. 257-266, abril, 1985.

ARAÚJO, E.R.; FERNANDES, F.R.C. Mineração no Brasil: crescimento econômico e conflitos ambientais. Mineração no Brasil, 2016.

ARECO, M.M.; HAUG, E.; CURUTCHET, G. Studies on bioremediation of Zn and acid Waters using *Botryococcus braunii*. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 6, p. 3849-3859, ago, 2018.

AZEVEDO, H. et al., 2010. **Diagnóstico ambiental da sub-bacia hidrográfica do Ribeirão das Antas – MG visando o gerenciamento integrado, o uso racional e sustentável dos recursos hídricos**. Relatório final FAPEMIG, processo APQ7807-5.04/07, 2010.

AZEVEDO, S.M.F.O. Toxinas de Cianobactérias: causas e consequências para a saúde pública. **Medicina Online – Revista Virtual de Medicina**. v. 1, n. 3, jul.ago.set, 1998.

BARCYTE, D. et al., 2020. The arctic *Cylindrocystis* (Zygnematophyceae, Streptophyta) green algae are genetically and morphologically diverse and exhibit effective accumulation of polyphosphate. **J. Phycol.**, v. 56, p. 217-232, fev, 2020.

BASELGA-CERVERA, B. et al., 2018. Improvement of the uranium sequestration ability of a *Chlamydomonas* sp (ChISP Strain) isolated from extreme uranium mine tailings through selection for potential bioremediation application. **Frontiers in Microbiology** 9:53, março, 2018.

BASELGA-CERVERA, B. et al., 2020. Rapid colonization of uranium mining impacted waters, the biodiversity of successful lineages of phytoplankton extremophiles. **Microbial Ecology**. v. 79: p. 576-587, ago 2020.

BAIRD, D.J. et al., 1991. A comparative study of genotype sensitive to acute toxic stress using clones of *Daphnia magna* Straus. **Ecotoxicology Environmental Safety**, v. 21, p. 257-265, jun, 1991.

BAKER, A.L. et al., 2012. Phycokey -- an image based key to Algae (OS Protista), Cyanobacteria, and other aquatic objects. University of New Hampshire Center for Freshwater Biology. Disponível em: <http://cfb.unh.edu/phycokey/phycokey.htm>. Acesso em 10 Jun 2021.

BAROLLI, J.P. et al., 2016. Aplicação de ozônio para remoção de manganês em águas de drenagem ácida de mina da INB/Caldas. **Tecnol. Metal. Mater. Miner.**, São Paulo, v.13, n.2, p.136-140, abr./jun. 2016.

BEULKER, C.; LESSMANN, D.; NIXDORF, B. Aspects of phytoplankton succession and spatial distribution in an acidic mining lake (Plessa 117, Germany). **Acta Oecologica**, v.24, p. 525 – 531, maio, 2003.

BLEISE, A.; DANESI, P.R.; BURKART, W. Properties, use and health effects of depleted uranium (DU): a general overview. **Journal of Environmental Radioactivity**. v. 64, p. 93–112, 2003.

BRAY, J.P. **The ecology of algal assemblages across a gradient of acid mine drainage stress on the West Coast, South Island, New Zeland.** 107f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Biologia) - University of Canterbury, Christchurch, Nova Zelândia, jun 2007.

BRITO, R.G.M. **Diversidade de cianobactérias na Lagoa das Custódias, Tramandaí, Rio Grande do Sul, Brasil, no verão de 2010-2011.** Trabalho de Conclusão de Curso (Ciências Biológicas com ênfase em Biologia Marinha e Costeira) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Imbé e Cidreira, 2011.

CÂNDIDO, G.C. **Remoção de íons manganês (Mn(II)) utilizando a microalga *Chlorella vulgaris*.** 2018. 72f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2018.

CINIGLIA, C. et al., 2007. *Pinnularia obscura* Krasske (Bacillariophyceae, Bacillariophyta) from acidic environments: characterization and comparison with other acid-tolerant *Pinnularia* species. **Fundamental and Applied Limnology**, v. 170/1, p. 29-47, nov, 2007.

CIPRIANI, Moacir. **Mitigação dos impactos sociais e ambientais decorrentes do fechamento definitivo de minas de urânio.** 332 f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Engenharia, Universidade de Campinas, Campinas, 2002.

CETESB, 2019. Relatório de Qualidade das Águas Interiores no Estado de São Paulo. São Paulo, 2019. Disponível em: <https://cetesb.sp.gov.br/aguas-interiores/publicacoes-e-relatorios/>. Acesso em 13 de junho de 2022.

CNEN Comissão Nacional de Energia Nuclear. 1997. Limites derivados para os pontos de lançamento de efluentes líquidos do Complexo Industrial de Poços de Caldas da Unidade de Tratamento de Minérios das Indústrias Nucleares do Brasil (UTM/INB). Rio de Janeiro, Ofício no 050/SLC.

CNEN Comissão Nacional de Energia Nuclear. Avaliação da qualidade das águas e sedimentos das microbacias do ribeirão das antas e do ribeirão de caldas no planalto de poços de caldas. **Relatório técnico da comissão das águas.** CNEN, 52 p. Poços de Caldas, 2012.

COELHO, E, A.A. **Isolamento de fungos com potencial para biorremediação na mina de urânio Osamu Utsumi.** 90f. Tese (Doutorado em: Microbiologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

Conama Resolução nº 357 de 17 de março de 2005. Resolução do Conselho Nacional de Meio Ambiente – CONAMA para a classificação de águas de acordo com sua composição e os teores máximos de substâncias potencialmente prejudiciais. Diário Oficial da União, Brasília, DF (2005).

Conama Resolução 430, de 13 de maio de 2011. Resolução do Conselho Nacional de Meio Ambiente – CONAMA para condições e padrões de lançamento de efluentes, complementa e altera a Resolução nº 357, de 17 de março de 2005. Diário Oficial da União, Brasília, DF (2011).

COSTA, G.B. et al., 2019. The effects of mining tailings in the physiology of benthic algae: Understanding the relation between mud's inductive acidification and the heavy metal's toxicity. **Environmental and Experimental Botany**. v.167, nov, 2019.

COSTA, W.C. **Seleção de biomassas para o estudo de biossorção dos radionuclídeos ^{226}Ra e ^{137}Cs** . Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Araraquara, 2003.

DEAN, A.P. et al., 2019. Metabolic adaptation of a *Chlamydomonas acidophila* strains isolated from acid mine drainage ponds with low eukaryotic diversity. **Science of the Total Environment**. v.647, p.75-87, jan, 2019.

DeNICOLA, D.M. A review of diatoms found in highly acidic environments. **Hydrobiologia**, v. 433, p. 111 -122, ago, 2000.

DERNER, R.B. et al., 2006. Microalgas, produtos e aplicações. **Ciência Rural, Santa Maria**, v.36, n.6, p. 1959-1967, nov-dez, 2006.

DIALE, P.P. **The biosorption of heavy metals by immobilized green microalgae *Desmodesmus* sp biomass**.176f. Tese (Doutorado). Faculty of Engineering and the Built Environment, Univeristy of the Witwatersrand, Johannesburg, 2015.

DO, C.V.T. et al., 2022. Microalgae and bioremediation of domestic wastewater. **Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry**. V 34, abril, 2022.

ERENO, Dinorah. Ozônio trata resíduos de mineração. Pesquisa FAPESP, 2013. Disponível em: < <https://revistapesquisa.fapesp.br/ozonio-trata-residuos-de-mineracao/>>. Acesso em 19 de junho de 2022.

EROGLU, E.; MELIS, A. Photobiological hydrogen production: recent advances and state of the art. **Bioresource Technology**. v.102, p.8403-8413, set, 2011.

FAIRCHILD, G.W.; SHERMAN, J.W. Algal periphyton response to acidity and nutrientes in softwater lakes: lake comparison vs. Nutriente enrichment approaches. **J. North. Am. Benthol. Soc.**, v.12. p. 157-167, jun, 1993.

FAVAS, P.J.C. et al., 2019. Remediation of uranium-contaminated sites by phytoremediation and natural attenuation. **Phytomanagement of Polluted Sites**, p.277-300, 2019.

FERNANDES, H.M., FRANKLIN, M.R.; VEIGA, L.H. Acid rock drainage and radiological environmental impacts. A study case of the Uranium mining and milling facilities at Poços de Caldas. **Waste Management**, v. 18, p.169-181, 1998.

FERRARI, C. R. et al., 2017. Effects of the discharge of uranium mining effluents on water quality in the reservoir: a chemical and ecotoxicological integrative assessment, **Nature/ScientificReports**, volume 7, open, Article number: 13919, out, 2017.

FERRARI, C. et al., 2015. An overview of an acidic uranium mine pit lake (Caldas, Brazil): composition of the zooplankton Community and limnochemical aspects. **Mine Water Environ**. v. 34, p. 343 – 351, março, 2015.

FERRARI, C.R. **Avaliação de efeitos ambientais de efluentes radioativos de mineração de urânio sobre as caracte2wrísticas físicas, químicas e diversidade da Comunidade Zooplanctônica na Unidade de Tratamento de Minérios, Represa das Antas e Represa Bortolan, Poços de Caldas (MG)**. 2010. 132f. Dissertação

(Mestrado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo. 2010.

FIMBRES-OLIVARRIA et al., 2018. Chemical characterization and antioxidante activity of sulfated polysaccharides from *Navicula* sp. **Food Hydrocolloids**, p.229-236, fev, 2018.

FLORES, J.C.C. **Fechamento de mina: aspectos técnicos, jurídicos e socioambientais**. Tese (Doutorado) – Instituto de Geociências, Universidade Estadual de Campinas. Campinas, 2006.

FRANCESCHINI, I.M. et al., 2010. **Algas: uma abordagem filogenética, taxonômica e ecológica**. Porto Alegre: Artmed, 2010.

FRANKLIN, M.R. **Modelagem numérica do escoamento hidrológico e dos processos geoquímicos aplicados à previsão da drenagem ácida em uma pilha de estéril da mina de urânio de Poços de Caldas – MG**. 337f. Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2007.

FREITAS, A.P.P.; SCHNEIDER, I.A.H.; SCHWARTZBOLD, A. Biosorption of heavy metals by algal communities in water streams affected by the acid mine drainage in the coal-mining region of Santa Catarina state, Brazil. **Minerals engineering**, v. 24, p. 1215 – 1218, set, 2011.

GANESAN, R. et al., 2020. A review on prospective production of biofuel from microalgae. **Biotechnology Research**. v.27, set, 2020.

GANI, P. et al., 2017. Green approach in the bio-removal of heavy metals from wastewaters, MATEC WEB of Conferences, **EDP Sciences**, p.6007, 2017.

GARCÍA-BALBOA, C. et al., 2013. Rapid adaptation of microalgae to bodies of water with extreme pollution from uranium mining: an explanation of how mesophilic organisms can rapidly colonize extremely toxic environments. **Aquatic Toxicology**, v.144-145, p. 116-123, nov, 2013.

GARLAND, R. Acid mine drainage – can it affect human health? **Quest 7**. v. 4, p. 46-47, 2011.

GARRIDO-CARDENAS, J.A. et.al. Microalgae research worldwide. **Algal Research**. v. 35, p. 50-60, nov, 2018.

GELLER, W. et al, 2013. Acidic pit lakes. **Environmental Science and Engineering**, 2013.

GUIRY, M.D. in Guiry, M.D. & Guiry, G.M. 14 November 2020. **AlgaeBase**. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Disponível em: <https://www.algaebase.org>; Acesso em on 11 ago 2021

GHRIBI, M. et al., 2020. Genome editing by CRISPR-Cas: a game change in the genetic manipulation of *Chlamydomonas*. **Life**, v.10, n.295, nov, 2020.

GISSIBL, A. et al., 2019. Bioproducts from *Euglena gracilis*: synthesis and applications. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v.7, maio, 2019.

GLUSHCHENKO, A.M.; KULIKOVSKIY, M.S. Taxonomy and distribution of the genus *Eunotia* Ehrenberg in aquatic ecosystems of Vietnam. **Inland Water Biology**, v.10, n.2, p. 130-139, jun, 2017.

GOMES, P. et al., 2021. Algae in acid mine drainage and relationships with pollutants in a degraded mining ecosystem. **Minerals**, v.11, n.110, jan, 2021.

GOMES, P.P.; IBANEZ, M.S.R.; FREITAS, J.S. Spatial and temporal variation of *Peridinium umbonatum* F. Stein, 1883 (Dinophyceae) and its relationship with total phytoplankton of a shallow, oligotrophic lake in central Brazil (Lagoon Bonita, Distrito Federal). **Acta Limnologica Brasiliensia**, v. 22, n.3, p. 317-324, set, 2010.

GRAHAM, J.M.; ARANCIBIA-AVILA, P.; GRAHAM, L.E. Effects of pH and selected metals on growth of the filamentous green alga *Mougeotia* under acidic conditions. **Limnol. Oceanogr.**, v. 41, n.2, p.263-270, março, 1996.

GREENWOOD, J.L.; LOWE, R.L. The effects of pH on a periphyton Community in an acidic wetland, USA. **Hydrobiologia**, v.561, p. 71-82, maio, 2006.

GRIGORSZKY, I. et al., 2003. Factors controlling the occurrence of Dinophyta species in Hungary. **Hidrobiologia**, v. 506-509, p. 203-207, nov, 2003.

HARFORD, A.J.; HOGAN, A.C.; JONES, D.R.; VANDAM, R.A. Ecotoxicology of highly treated mine waters: lessons from an Australian Mine. **Mine Water Environ.** v. 34, p. 75-86, nov, 2015.

HERLORY, O. et al., 2013. Use of diatom assemblages as biomonitor of the impact of treated uranium mining effluent discharge on a stream: case study of the River watershed (Center-West France). **Ecotoxicology**. p.22, p.1186 – 1199, ago, 2013.

HINTON, T.G. et al., 2013. An invitation to contribute to strategic research agenda in radioecology. **Journal Environmental Radioactivity**, 115: 73-82, jan, 2013.

IBRAM. Indústria e mineração para o desenvolvimento do Brasil e a promoção da qualidade de vida do brasileiro. **Instituto Brasileiro de Mineração**. Brasília, DF: dez, 2014. Disponível em: <http://www.ibram.org.br/sites/1300/1382/00005649.pdf>. Acesso em: 29 nov. 2019.

INB – INDÚSTRIAS NUCLEARES DO BRASIL S.A. RELATÓRIO INTEGRADO 2020, Brasil. Disponível em: <http://www.inb.gov.br/Portals/0/Conteudo/Images/ce2db0ec-cb59-495f-aeb7-8a2eda888bf4.pdf>. Acesso em 28 jan 2022.

INTERNATIONAL COMMISSION ON RADIOLOGICAL PROTECTION. ICRP-91. A framework for assessing the impact of ionizing radiation on non-human species. **Annals of ICRP**. Elsevier, Great Britain, 2003.

INTERNATIONAL COMMISSION ON RADIOLOGICAL PROTECTION. ICRP-108. Environmental Protection: the Concept and Use of Reference Animals and Plants. **Annals of ICRP**. Elsevier, Great Britain, 2008.

INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY (IAEA). Radiation Protection and Safety of Radiation Sources. **Safety Standards**. GSR part 3. Viena, 2014.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. ISO/TC 323. **Circular Economy**. 2018.

IQBAL, K. et al., 2022. Microalgae-bacterial granular consortium: striding towards sustainable production of biohydrogen coupled with wastewater treatment. **Bioresource Technology**. v. 354, jun, 2022.

JAVANBAKHT, V.; ALAVI, S.A.; ZILOUEI, H. Mechanisms of heavy metal removal using microorganisms as biosorbent. **Water Science & Technology**, v. 69.9, out, 2014.

JEFFRYES, C.; GUTU, T.; JIAO, J.; RORRER, G.L. Metabolic insertion of nanostructured TiO₂ into the patterned biosilica of the diatom *Pinnularia* sp. By a two-stage bioreactor cultivation process. **American Chemical Society**. v.2, n.10, p. 2103-2112, out, 2008.

JIWAN, S.; KALAMDHAD, A.S. Effects of heavy metals on soil, plants, human health and aquatic life. **International Journal of Research in Chemistry and Environment**. v. 1, n. 2, p. 15-21, out. 2011.

JOHN, D.M.; WHITTON, B.A.; BROOK, A.J. The freshwater algal flora of the British Isles. Cambridge Press, 878p, 2011.

JOHNK, K.D. et al., 2008. Summer heatwaves promote blooms of harmful cyanobacteria. **Global Change Biology**, v.14, p. 495-512, nov, 2008.

JUNIOR, W.G.M. et al., 2020. Microalgae for biotechnological applications: cultivation, harvesting and biomass processing. **Aquaculture**, v. 528, nov, 2020.

JÚNIOR, H.M.C.; LUNAS, D.A.L. O Estado e o (re)surgimento da mineração no Brasil. **Revista Interdisciplinar do IFMT**. ISSN 2448-0665. Ano 4. 6° edição, v. 1 n. 6. Janeiro – Junho de 2018.

KAHLERT, M. et al., 2019. Connecting the morphological and molecular species concepts to facilitate species identification within the genus *Fragilaria* (Bacillariophyta). **J. Phycol.** v.55, p. 948 – 970, maio, 2019.

KALIN, M. et al., 2001. Development of the phytoplankton Community in a pit-lakes in relation to water quality changes. **Wat. Res.** v.35, n. 13, p. 3215 – 3225, out, 2001.

KALIN, M; WHEELER, W.N.; MEINRATH, G. The removal of uranium from mining waste water using algal/microbial biomass. **Journal of Environmental Radioactivity** 78,151–177, 2005.

KALIN, M.; WHEELER, W.N.; OLAVESON, M.M. Response of phytoplankton to ecological engineering remediation of a Canadian Shield Lake affected by acid mine drainage. **Ecological Engineering**, v.28, p.296-310, dez, 2006.

KHATIWADA, B.; SUNNA, A.; NEVALAINEN, H. Molecular tools and applications of *Euglena gracilis*: from biorefineries to bioremediation. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 117, p. 3952-3967, jul, 2020.

KHAYATZADEH, J.; ABBASI, E. The effects oh heavy metals on aquatic animals. **The 1 st International Applied Geological Congress**, Department of Geology, Islamic Azad University - Mashad Branch, Iran, 26-28, abr, 2010.

KING, S.J. et al., 2022. Synthetic biology for improved hydrogen production in *Chlamydomonas reinhardtii*. **Microbial Biotechnology**, v.0, n.0, p. 1 -20, março, 2022.

KLOOSTERMAN, K. Food and fuel from greenhouse gas? **ISRAEL 21C**. 22 set 2011. Disponível em:< <https://www.israel21c.org/food-and-fuel-from-greenhouse-gas/>>. Acesso em 30 jun 2022.

KLUG, J.L.; FISCHER, J.M. Factors influencing the growth of *Mougeotia* in experimentally acidified mesocosms. **Can. J. Fish. Aquat. Sci.**, v.57, p.538-547, março, 2000.

KOMÁREK, J.; ANAGNOSTIDIS, K. Süßwasserflora Von mitteleuropa band 19/1: Cyanoprocaryota 1. Teil: Chroococcales. Gustav Fisher. Stuttgart, 1999.

KONG, F. et al., 2019. Moleçular genetic tools and emerging synthetic biology strategies to increase cellular oil content in *Chlamydomonas reinhardtii*. **Plant Cell Physiol.** v.60, n.6, p. 1184-1196, jun 2019.

KOTUPARAMBIL, S.; THANKAMONY, R.L.; AGUSTI, S. *Euglena* as a potential natural source of value-added metabolites. A review. **Algal Research**, v. 37, p. 154-159, jan, 2019.

KRAJCOVI, J. VESTEG, M. SCHAWARTZBACH, S.D. Euglenoid flagellates: a multifaceted biotechnology platform. **Journal of Biotechnology**, v. 202, p. 135-145, maio, 2015.

KUMAR, R.N. et al., 2016. Assessment of factors limiting algal growth in acidic pit lakes – a case study from Western Australia, Australia. **Environ Sci Pollut Res**, v.23, p. 5915 – 5924, nov, 2016.

KUPFER, D.; TIGRE, P. B. **Prospecção tecnológica**. In: CARUSO, L. A.; TIGRE, P. B. (Org.). Modelo SENAI de prospecção: documento metodológico. Montevideo: OIT/CINTERFOR, 2004.

LADEIRA, A. C. Q.; GONÇALVES, C. R. Influence of anionic species on uranium separation from acid mine water using strong base resins. **Journal of hazardous materials**, v. 148, n. 3, p. 499–504, 30 set. 2007.

LEMOS, J.L.S. et al, 2008. Revisão acerca da utilização de microrganismos na biorremediação de rejeitos industriais contendo metais pesados. Rio de Janeiro: **CETEM/MCT**, 2008. 65p. (Série Tecnologia Ambiental, 43)

LEONG, Y.K.; CHANG, J.S. Bioremediation of heavy metals using microalgae: recente advances and mechanisms. **Bioresource Technology**, v. 303, maio, 2020.

LESSMANN, D.; FYSON, A.; NIXDORF, B. Phytoplankton of the extremely acidic mining lakes of Lusatia (Germany) with pH ≤ 3. **Hydrobiologia**, v.433, p. 123 – 128, ago, 2000.

LORTOU, U.; GKELIS, S. Polyphasic taxonomy of green algae strains isolated from Mediterranean freshwaters. **Journal of Biological Research-Thessaloniki**. v.26, n.11, out, 2019.

- LOZANO, J.C. et al, 1997. Radiological characterization of a uranium mine with no mining activity. **Applied Radiation and Isotopes**. v.53, p. 333-343, 2000.
- McFARLAND, B.H.; HILL, B.H.; WILLINGHAM, W.T. Abnormal *Fragilaria* spp (Bacillariophyceae) ins streams impacted by mine drainage. **Journal of Freshwater Ecology**., v. 12, n.1, p.141-149, jul, 1997.
- MACIEL, F.L. et al, 2020. **Microrganismos com potencial biotecnológico**. Universidade Estadual do Rio Grande do Sul, 2020.
- MADIGAN, M. T. et al., 2016. **Microbiologia de Brock**. 14 ed. Porto Alegre: Artmed, 2016.
- MAJDALANI, S.A.; TAVARES, A. M. **Status of uranium in Brazil**. In: Assessment of uranium deposit types and resources —a worldwide perspective. Proceedings of a Technical Committee Meeting organized by the International Atomic Energy Agency and the OECD Nuclear Energy Agency and held in V, 2001.
- MALAVASI, V.; SORU, S.; CAO, G. Extremophile microalgae: the potential for biotechnology application. **J. Phycol.** 56, 559-573, jan, 2020.
- MALIK, S. et al., 2022. A novel wastewater-derived cascading algal biorefinery route for complete valorization of the biomass to biodiesel and value-added bioproducts. **Energy Conversion and Management**. v. 256, março, 2022.
- MARQUES, K.N. **Análise morfológica e molecular de cianobactérias isoladas de efluentes de uma mina de urânio desativada em ênfase em *Aphanothece* e sua capacidade de biossorção do ²²⁶Ra**. 118f. Dissertação (Mestrado) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2006.
- MEDEIROS, M. Microalga brasileira é capaz de tratar efluentes do processamento do dendê. **EMBRAPA**. 13 abril. 2021. Disponível em:< <https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/60585500/microalga-brasileira-e-capaz-de-tratar-efluentes-do-processamento-do-dende>>. Acesso em 30 jun 2022.
- MKANDAWIRE, M. Biogeochemical behaviour and bioremediation of uranium in waters of abandoned mines. **Environ Sci Pollut Res**, v.20, P. 7740-7767, jan, 2013.
- MUNIZ, D.H.F.; OLIVEIRA-FILHO, E.C. Metais pesados provenientes de rejeitos de mineração e seus efeitos sobre a saúde e o meio ambiente. **Universitas: Ciências da Saúde**, v. 4, n. 1 / 2, p. 83-100, 2006.
- NANCUCHEO, I.; JOHNSON, D.B. Acidophilic algae isolated from mine-impacted environments and their roles in sustaining heterotrophic acidophiles. **Front Microbiol**. v.3, set 2012.
- NASCIMENTO, M. R. L. Projeto Itataia – Controle de processo na produção de ácidos fosfórico e urânio. Poços de Caldas: INB (1988). (Manual de Métodos e Análises Químicas). 143p.
- NEOALGAE. Disponível em: < <https://neoalgae.es/>>. Acesso em 08 de ago. 2022.
- OLIVEIRA, N. Petrobras estuda produzir biodiesel a partir de microalgas. **Agência Brasil**, Brasília, 07 fev. 2018. Disponível em: <

<https://agenciabrasil.ebc.com.br/pesquisa-e-inovacao/noticia/2018-02/petrobras-estuda-produzir-biodiesel-partir-de-microalgas>>. Acesso em 30 jun 2022.

ORGANIZATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT, NUCLEAR ENERGY AGENCY (OECD-NEA). Environmental Radiological Protection NEA No. 6167. **Scientific Issues and Emerging Challenges for Radiological Protection. Report of the Expert Group on the Implications of Radiological Protection Science**, Paris, ISBN 978-92-64-99032-6, 2007. <http://www.nea.fr/html/rp/reports/2007/nea6167-egis.pdf>

PESSÔA, L.C. et al., 2021. Technological prospection of microalgae-based biorefinery approach for effluen treatment. **Algal Research**. V 60, dez, 2021.

PRASANNA, R. et al., 2011. Algal diversity in flowing Waters at an acidic mine drainage “barrens” in central Pennsylvania, USA. **Folia Microbiol**, v.56, p.491 – 496, out, 2011.

PENG, L. et al., 2020. Biofuel production from microalgae: a review. **Environmental Chemistry Letters**, v. 18, p. 185-197, out, 2020.

PURA VIDA. Disponível em:< <https://www.puravida.com.br/>>. Acesso em 08 de ago. 2022.

QIANG, W.; WEIXIAN, C. **Chlorella W4 capable of removing heavy metal from water body with high heavy-metal content and application of chlorella W4**. Depositante: Wang Qiang e Chen Weixian. CN n. 109576159. Depósito: 29 set. 2017. Concessão: 05 abril.2019. Disponível em: <https://patentscope.wipo.int/search/en/detail.jsf?docId=CN241293993&cid=P22-L506GX-28976-1>. Acesso em 31 maio 2022.

RAMARAJ, R.; KAWAREE, R.; UNPAPROM, Y. Direct transesterification of microalgae *Botryococcus braunii* biomass for biodiesel production. **Emer Life Sci Res**. v.2, n.2, p.1-7, jul 2016.

RANJBAR, S.; MALCATA, X. Challenges and prospects for sustainable microalga-based oil: a comprehensive review, with a focus on metabolic and genetic engineering. **Fuel** 324, set, 2022.

RAY, J.G.; SANTHAKUMARAN, P.; KOOKAL, S. Phytoplankton communities of eutrophic freshwater bodies (Kerala, India) in relation to the physicochemical water quality parameters. **Environment, Development and Sustainability**, v. 23, p.259-290, jan, 2021.

RICHARDSON, L.L.; AGUILAR, C.; NEALSON, K.H. Manganese oxidation in pH and O₂ microenvironments produced by phytoplankton. **Limnol. Oceanogr.**, v. 33, n. 3, p. 352-363, maio, 1988.

RODGHER, S. et al., 2013. Evaluation of surface water quality in aquatic bodies under the influence of uranium mining (MG, Brazil). **Environ. Monit. Assess.** 185, p 2395 – 2406, março, 2013.

RONQUI, L. B. **Caracterização Limnológica e Avaliação dos efeitos ambientais causados por Efluentes de Mina de Urânio sobre populações microbianas planctônicas da Represa das Antas, Caldas (M.G.)**. 2008. 136 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

ROSEN, B.H.; STAHLHUT, K.N.; HALL, J.D. Catalog of microscopic organisms of the everglades, part 2 - The desmids of the Arthur R. Marshall Loxahatchee National Wildlife Refuge: Geological Survey Scientific Investigations Report. **Science for a changing world**. 277p, 2019. <https://doi.org/10.3133/sir20195074>

ROUSSEAU, V. et al., 2002. Diatom succession, silification and silic acid availability in Belgian coastal Waters (Southern North Sea). **Marine Ecology Progress Series**, v. 236, p. 61-73, jul, 2002.

RUGNINI, L. et al., 2018. Phosphorus and metal removal combined with lipid production by the green microalga *Desmodesmus* sp: an integrated approach. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.125, p. 45-51, abr, 2018.

SALAMA, E.S. et al., 2019. Algae as a green technology for heavy metals removal from various wastewater. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, 35:75, maio, 2019.

SALONEN, V.P.; TUOVINEN, N.; VALPOLA, S. History of mine drainage impact on Lake Orijarvi algal communities, SW Finland. **Journal of Paleolimnology**, v.35, p.289 – 303, fev, 2006.

SENHORINHO, G.N.A; LAAMANEN, C.A.; SCOTT, J.A. Bioprospecting freshwater microalgae for antibacterial activity from water bodies associated with abandoned mine sites. **Phycologia**, v.57, n.4, p. 432 – 439, fev, 2018.

SHARMA, R.K.; AGRAWAL, M. Biological effects of heavy metals: an overview. **Journal of Environmental Biology**. v. 26, n. 2, p. 301-313, jul, 2005.

SHOWE, K.A.; HARDING, J.S.; BROADY, P.A. Diatom Community response to an acid mine drainage gradient. **Hydrobiologia**. nov 2012.

SIDDIQUEE, S. et al., 2015. Heavy metal contaminants removal from wastewater using the potential filamentous fungi biomass: a review. **Journal of Microbial & Biochemical Technology**. v. 7, n. 6, p. 384-393, 2015.

SILVA, P.R.B. et al., 2019. The environmental quality of sediments of rivers near prospecting areas of semiprecious rocks. **Environ Monit Assess**, 191: 364, maio, 2019.

SILVA, M.M.S. **Processo oxidativo avançado com ozônio de efluentes contaminados por Mn e outros metais pesados originados na drenagem ácida em mina de urânio**. Dissertação (Mestrado) em Ciências na área de Tecnologia Nuclear – Materiais. Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares. Autarquia associada à Universidade de São Paulo. São Paulo, 2016.

SIMATE, G.S.; NDVOLU, S. Acid mine drainage: challenges and opportunities. **Journal of Environmental Chemical Engineering**. v. 2, p.1785 – 1803, set, 2014.

- SOLEIMANI, M. et al., 2020. Modifying the thickness, pore size and composition of diatom frustule in *Pinnularia* sp with Al³⁺ ions. **Scientific Reports**, nov, 2020.
- SOUZA, L.S. et al., 2017. Morphological and ultrastructural characterization of the acidophilic and lipid-producer strains *Chlamydomonas acidophila* LAFIC-004 (Chlorophyta) under different culture conditions. **Protoplasma**, v. 254, p.1385-1398, maio, 2017.
- SOUZA, A. M.; SILVEIRA, C. S.; PEREIRA, R. M. Contribuições dos metais provenientes das pilhas de rejeito da mina Osamu Utsumi a drenagens do Complexo Alcalino de Poços de Caldas, Minas Gerais. **Geochimica Brasiliensis**, v. 27, n. 1, p. 63 – 76, set, 2013.
- SPERLING, E.V.; JARDIM, F.A. Influence of climatic conditions on cyanobacteria blooms in a tropical water supply river. In: 34 WEDC CONFERENCE, ADDIS ABABA, Ethiopia. LOUGH BOROUGH Proceedings Loughborough University, v.1, p. 838-836, 2009.
- SUPARMANIAM, U. et al., 2019. Insights into the microalgae cultivation technology and harvesting process for biofuel production: a review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 115, nov, 2019.
- TORRES, M.J. et al., 2022. Chlamydomonas – Methylobacterium oryzae cooperation leads to increased biomass, nitrogen removal and hydrogen production. **Bioresource Technology**. v. 352, maio, 2022.
- UBANDO, A.T. Microalgal biosorption of heavy metals: a comprehensive bibliometric review. **Journal of Hazardous Materials**., v.402, jan, 2021.
- URREA-CLOS, G.; SABATER, S. Comparative study of algal communities in acid and alkaline Waters from Tinto, Odiel and Piedras river basins (SW Spain). **Limnetica**, v. 28, n.2, p. 261-272, dez, 2009.
- UTERMÖHL, H. **Zur vervollkommung der quantitativen phytoplankton methodik**. Mitt Int Verien Limno 9, 1-38, 1958.
- VALENTE, T.M.; GOMES, C.L. The role of two acidophilic algae as ecological indicators of acid mine drainage sites. **Journal of Iberian Geology**, v.33, n. 2, p.283-294, maio 2007.
- VARSHNEY, P. et al., 2015. Extremophilic microalgae and their potential contribution in biotechnology. **Bioresource Technology**, v. 184, p. 363-372, maio, 2015.
- VINGIANI, G.M. et al., 2019. Microalgal enzymes with biotechnological applications. **Mar. Drugs**, v. 17, ago, 2019.
- VIRIDOS. Disponível em: < <https://www.viridos.com/>>. Acesso em 08 de ago. 2022.
- VISHWAKARMA, R., Dhar, D.W., Saxena, S. Influence of nutrient formulations on growth, lipid yield, carbon partitioning and biodiesel quality potential of Botryococcus sp. and Chlorella sp. **Environ. Sci. Pollut. Res.** v. 26, n. 8, p. 7589-7600, jan, 2019.
- WANG, R. et al., 2017. Biogenic manganese oxides generated by green algae *Desmodesmus* sp. WR1 to improve bisphenol A removal. **Journal of Hazardous Materials**, v. 339, p. 310 – 319, out, 2017.

WEHR, J.D.; SHEATH, R.G.; KOCIOLEK, P. Freshwater algae of North America: ecology and classification. Academic Press, San Diego, 2^a ed, 2015.

WIPO. **Patent Landscape Report: Microalgae-related Technologies**. WORLD INTELLECTUAL PROPERTY ORGANIZATION in cooperation with the MOROCCAN OFFICE OF INDUSTRIAL AND COMMERCIAL PROPERTY – OMPIC and the MOROCCAN FOUNDATION FOR ADVANCED SCIENCE, INNOVATION AND RESEARCH – MASCIR, 2016.

WOJCIECHOWSKI, J. Efeitos da temperatura, fósforo e luz no crescimento da cianobactéria *Cylindrospermopsis raciborskii* (Woloszynska) Seenayya et Subba Raju do reservatório de Alagados, Paraná. Dissertação (Mestrado) Programa de Pós-Graduação em Botânica, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2013.

XIAODONG, Z. et al., 2020. **Method for removing heavy metals in water by utilizing marine microalgae**. Depositante: Zhao Xiaodong, Han Ruifang, Rong Husong, Fan Weijie e Qiu Shengyao. CN n. 112707509. Depósito: 10 nov. 2020. Concessão: 27 abril.2021. Disponível em:<
https://patentscope.wipo.int/search/en/detail.jsf?docId=CN323578527&_cid=P22-L506XR-35355-1>. Acesso em 31 maio 2022.

YOUNG HENRYS. The Algae Project. Disponível em:<
<https://younghenrys.com/algae>>. Acesso em 08 de ago. 2022.

YUNG, Y.K.; NICHOLLS, K.H.; CHENG, A.G. The detection of *Rhizosolenia* (Bacillariophyceae) in sediment of Ontario lakes and implications for paleoecology. **Journal of Paleolimnology**, v.1, p.61 -69, jul, 1988.

ZHANG, Y. et al., 2020. Phytoplankton distribution characteristics and its relationship with bacterioplankton in Dianchi Lake. **Environmental Science and Pollution Research**, v.27, p.40592-40603, jul, 2020.

ZEPPERLICK, B.N. et al., 2021. Elevated pH conditions associated with *Microcystis* spp blooms decrease biability of the cultured diatom *Fragilaria crotonensis* and natural diatoms in Lake Erie. **Frontiers in Microbiology**, v.12, fev, 2021.

ZUCOLOTO, G.F. **Patenteamento em Biotecnologias: a experiência chinesa**. Instituto de Pesquisa Econômica e Aplicada – IPEA, 2013.

ZUQUETTE, L.V. et al., 2009. Environmental degradation related to mining, urbanization and pollutant sources: Poços de Caldas, Brazil. **Bull Eng Geol Environ**, v.68, p. 317-329, fev, 2009.