UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Programa de Pós-graduação em Toxicologia e Análises Toxicológicas

**Efeito da pré-cloração sobre a integridade celular e
remoção de toxinas de *Microcystis aeruginosa***

Kazumi Kinoshita

Dissertação para obtenção do Título de
MESTRE

Orientador: Prof. Dr. Ernani Pinto Junior

São Paulo

2015

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Programa de Pós-graduação em Toxicologia e Análises Toxicológicas

**Efeito da pré-cloração sobre a integridade celular e
remoção de toxinas de *Microcystis aeruginosa***

Versão corrigida da Dissertação/Tese conforme resolução CoPGr 6018.
O original encontra-se disponível no Serviço de Pós Graduação da FCF/USP.

Kazumi Kinoshita

Dissertação para obtenção do Título de
MESTRE

Orientador: Prof. Dr. Ernani Pinto Junior

São Paulo

2015

Ficha Catalográfica
Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

Kinoshita, Kazumi
K55e Efeito da pré-cloração sobre a integridade celular e remoção
de toxinas de *Microcystis aeruginosa* / Kazumi Kinoshita. -- São
Paulo, 2015.

104p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas
da Universidade de São Paulo. Departamento de Análises Clínicas
e Toxicológicas.

Orientador: Pinto Junior, Ernani

1. Toxicologia ambiental 2. Tratamento de água 3. Toxinas
I. T. II. Pinto Junior, Ernani, orientador.

615.9 CDD

Kazumi Kinoshita

Efeito da pré-cloração sobre a integridade celular e remoção de
toxinas de *Microcystis aeruginosa*

Versão Corrigida

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do Título de Mestre

Prof. Dr. Ernani Pinto Junior
orientador/presidente

Viviane Moschini Carlos
1o. examinador

João Carlos Monteiro de Carvalho
2o. examinador

São Paulo, 22 de Outubro de 2015.

Dedico este trabalho aos meus pais,
irmão e companheiro, meu orgulho e razão
de viver.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais e meu irmão pelo carinho e amor incondicional. Não seria nada sem vocês! Itsumo Arigatou!

Ao Teras, por ser simplesmente o pelé dos namorados! Obrigada por me fazer sentir a pessoa mais especial e amada desse mundo e por estar sempre ao meu lado, me incentivando e me apoiando em tudo. TE AMO!

Ao meu orientador Prof. Ernani, pela oportunidade e pelo voto de confiança. Obrigada por sempre acreditar no meu trabalho.

Aos colegas e amigos do LTPNA, por tornarem o dia-a-dia do trabalho mais divertido e agradável. Agradeço a todos, inclusive aos que já passaram por lá, por todos os ensinamentos, conselhos, ajudas, risadas e gordices.

Ao Prof. Sidney Seckler por ceder as instalações de seu laboratório para a realização dos experimentos de oxidação e ao Fábio Campos pela ajuda constante.

À Renata Albuquerque e Fabyana dos Anjos, por me auxiliarem nas análises de citometria de fluxo. Agradeço imensamente pela paciência e dedicação.

Aos amigos do “Bonde do Japão” e da UNIFESP, pela amizade e por todos os momentos de descontração.

Às minhas melhores amigas de sempre, Melissa, Priscilla e Karen, que, apesar de não vê-las com a frequência que gostaria, estão sempre comigo em meus pensamentos.

À todos os professores e funcionários do Departamento de Toxicologia e Análises Toxicológicas.

Ao CNPq, CAPES, FAPESP e FUSP pelo apoio financeiro.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho e que estiveram presentes na minha vida, Muito Obrigada!

RESUMO

KINOSHITA, K. **Efeito da pré-cloração sobre a integridade celular e remoção de toxinas de *Microcystis aeruginosa***. 2015. f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

O aumento da incidência de florações de cianobactérias potencialmente tóxicas nos mananciais de abastecimento, favorecidas pelo elevado aporte de nutrientes nos corpos d'água, compromete a qualidade da água de consumo e põe em risco a saúde humana e animal, além de elevar os custos do tratamento de água. A pré-cloração, tem se mostrado uma ótima opção tanto na inativação de cianobactérias como na remoção de cianotoxinas dissolvidas. No entanto, sob certas condições, pode causar lise celular causando a liberação das toxinas no meio. O objetivo deste trabalho foi avaliar em escala laboratorial, o efeito da pré-cloração, utilizando como agente oxidante o hipoclorito de sódio, sobre uma linhagem tóxica de *Microcystis aeruginosa* (LTPNA 08). A integridade celular foi avaliada por citometria de fluxo e a liberação e degradação das microcistinas (LR e RR) por LC-MS/MS. Diferentes dosagens de cloro (0,05, 0,5, 1, 1,5, 2, 2,5, 3, 4 e 8 mg.L⁻¹), tempos de contato (0, 15, 30 e 60 minutos) e densidade celular (1x10⁶ células.mL⁻¹ para os ensaios de jarros e 3,5 x10⁶ células.mL⁻¹ para o ensaio de viabilidade celular) foram utilizadas neste estudo. Os resultados obtidos nos ensaios de jarros mostraram remoções de microcistinas acima de 70% após 60 minutos de exposição ao oxidante, com 100% de remoção em doses de 2,5 e 3 mg Cl₂.L⁻¹. Valores de CT (concentração x tempo) acima de 40,66 mg.min.L⁻¹ foram necessários para degradar as microcistinas a concentrações abaixo de 1,0 µg.L⁻¹, exigidos pela organização mundial de saúde (WHO) e pela legislação brasileira de potabilidade da água (Portaria MS nº 2914/2011). Não foi possível verificar a lise celular por microscopia óptica, no entanto, na análise por HPLC-DAD verificou-se degradação de mais de 70% da clorofila-a em todas as dosagens testadas, após 60 minutos de exposição, com a completa degradação nas concentrações de 2,5 e 3 mg.L⁻¹ Cl₂, indicando dano celular. Nos ensaios por citometria de fluxo, foi verificada a perda da integridade celular com o aumento da dosagem de cloro aplicada, observando-se a permeabilidade celular máxima, sem a desintegração da célula, na concentração de 2,5 mg.L⁻¹ Cl₂. Concentrações de 4 e 8 mg.L⁻¹ Cl₂ promoveram a lise total das células, impossibilitando a permanência do marcador na célula. A perda dos pigmentos clorofila a e ficocianina ocorreram em concentrações de acima de 2,5 e acima de 1,5 mg.L⁻¹ Cl₂, respectivamente. O presente trabalho reforçou a eficiência da cloração na degradação das toxinas e os resultados obtidos podem ajudar as autoridades competentes a otimizar as práticas de cloração utilizadas no pré-tratamento da água.

Palavras-chave: Pré-cloração, *Microcystis aeruginosa*, Microcistinas, Viabilidade celular

ABSTRACT

KINOSHITA, K. **Effect of pre-chlorination on cell integrity and toxin removal of *Microcystis aeruginosa***. 2015. f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

The increased incidence of blooms of potentially toxic cyanobacteria in supply sources, favored by high input of nutrients in water bodies, compromises the quality of drinking water and affect human and animal health, besides increasing water treatment costs. The pre-chlorination, has proved a great choice both in the inactivation of cyanobacterial cells as in removing dissolved cyanotoxins. However, under certain conditions, can cause cell lysis and release toxins. The objective of this study was to evaluate in laboratory scale, the effect of pre-chlorination, using sodium hypochlorite, on cell integrity of toxic *Microcystis aeruginosa* (LTPNA 08) using flow cytometry, and the subsequent release and degradation of microcystins (LR and RR) by LC-MS / MS. Different chlorine doses (0.05, 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 4 and 8 mg.L⁻¹), contact times (0, 15, 30 and 60 minutes) and cell density (1x10⁶ células.mL⁻¹ for jar-test and 3.5 x10⁶ células.mL⁻¹ for cell viability assay) were used in this study. The results obtained in the jar- test showed degradations up to 70% after 60 minutes of exposure, with complete degradation at chlorine doses of 2,5 e 3 mg.L⁻¹. Chlorine exposure (CT) values over 40,66 mg.min.L⁻¹ were required for oxidation of microcystin LR and RR to concentrations below the World Health Organization (WHO) and Brazilian legislation for water potability (Portaria MS nº 2914/2011) guideline value of 1µg.L⁻¹. No differences in cell number was observed by microscopy, however, analysis by HPLC-DAD found chlorophyll-a reductions of more than 70% in all dosages tested after 60 minutes exposure, with values below the limit of quantification for concentrations of 2.5 and 3 mg.L⁻¹ Cl₂, indicating cell damage. In assays using flow cytometry, loss of cell integrity was observed with increasing chlorine concentration. The maximum cell permeability without cell disintegration was observed at a concentration of 2.5 mg.L⁻¹ Cl₂. Concentrations of 4 and 8 mg.L⁻¹ Cl₂ lead to complete cell lysis, making impossible the permanence of SYTOX Green in the cell. The loss of pigment chlorophyll a and phycocyanin occurred in concentrations above 2.5 and 1.5 mg.L⁻¹ Cl₂, respectively. This study reinforced the efficiency of chlorination in the toxins degradation and the results can help the water authorities to optimize the chlorination practices used in the pretreatment of water.

Keywords: Pre-chlorination, *Microcystis aeruginosa*, Microcystins, Cell viability

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Esquema do processo de eutrofização (natural e artificial) de um ambiente lacustre.....	20
Figura 2: Morfologia de cianobactérias, onde: 1 – <i>Aphanothece clathrata</i> . 2 – <i>Chroococcus minor</i> . 3 e 4— <i>C. minutus</i> . 5 — <i>Merismopedia tenuissima</i> . 6 — <i>Microcystis aeruginosa</i> f. <i>flos-aquae</i> . 7 — <i>M. incerta</i> . 8 — <i>Lyngbya limnetica</i> . 9 — <i>Microcystis robusta</i> . 10 — <i>Oscillatoria boryana</i> . 11 — <i>O. simplicissima</i> . 12 — <i>O. subtilissima</i> . Fig. 13 — <i>Raphidiopsis mediterranea</i> . 14 e 15 — <i>Synechocystis aquatilis</i> . (Escala = 10 µm.)	22
Figura 3: Exemplos de gêneros de cianobactérias produtoras de cianotoxinas (AlgaeBASE).	24
Figura 4: Estruturas químicas das principais cianotoxinas encontradas em corpos d'água com floração de cianobactérias.	27
Figura 5: Estrutura geral das microcistinas.	30
Figura 6: Fluxograma de execução do experimento de viabilidade celular, avaliado por citometria de fluxo, testando diferentes concentrações de Cl_2 e tempos de contato.	56
Figura 7: Representação de gráfico bidimensional da intensidade de fluorescência	57
Figura 8: Curva de crescimento da linhagem <i>Microcystis aeruginosa</i> (LTPNA 08) em meio ASM-1. As barras de erro indicam o desvio padrão das médias (n=3).....	59
Figura 9: Curvas de calibração construídas para quantificação das microcistinas LR e RR. (A) Curva de calibração da MC-LR. (B) Curva de calibração da MC-RR.....	60
Figura 10: Perfil de produção das microcistinas LR e RR ao longo de 30 dias de cultivo. As barras de erro indicam o desvio padrão das médias (n=3).	61
Figura 11: Medidas de cloro residual livre após 60 minutos de exposição ao oxidante em concentrações de 0,5, 1, 1,5, 2, 2,5 e 3 mg.L ⁻¹ Cl_2	62
Figura 12: Variação do número de células de <i>M. aeruginosa</i> LTPNA 08 ao longo do tempo de exposição a diferentes doses de cloro. As barras de erro indicam o desvio padrão das médias (n=5).	66
Figura 13: Cromatograma representativo do padrão analítico de clorofila-a (A) e espectro de absorção da clorofila-a (B) obtido por HPLC-DAD em 665nm.....	68
Figura 14: Curva de calibração da clorofila-a obtida por HPLC-DAD em 665nm.	68

- Figura 15:** Variação da concentração de clorofila-a ao longo da exposição de 60 minutos ao oxidante em concentrações de 0,5, 1,5, 2, 2,5 e 3 mg $\text{Cl}_2 \cdot \text{L}^{-1}$. As barras de erro indicam o desvio padrão das médias (n=5).69
- Figura 16:** Medidas de turbidez ao longo da exposição de 60 minutos ao oxidante em concentrações de 0,5, 1,5, 2, 2,5 e 3 mg $\text{Cl}_2 \cdot \text{L}^{-1}$. As barras de erro indicam o desvio padrão das médias (n=5).71
- Figura 17:** Medidas de cor aparente após 0, 15, 30 e 60 minutos de contato com o hipoclorito de sódio em concentrações de 0,5, 1,5, 2, 2,5 e 3 mg $\text{Cl}_2 \cdot \text{L}^{-1}$. As barras de erro indicam o desvio padrão das médias (n=5).72
- Figura 18:** Alteração na coloração das amostras de suspensão de *M. aeruginosa* em função da dose de cloro e do tempo de contato.....73
- Figura 19:** Variação da concentração de microcistinas intracelulares e extracelulares totais (MC-RR e MC-LR) ao longo da exposição a diferentes doses do oxidante. (A) 0,5 mg $\text{Cl}_2 \cdot \text{L}^{-1}$. (B) 1,5 mg $\text{Cl}_2 \cdot \text{L}^{-1}$. (C) 2 mg $\text{Cl}_2 \cdot \text{L}^{-1}$. (D) 2,5 mg $\text{Cl}_2 \cdot \text{L}^{-1}$. (E) 3 mg $\text{Cl}_2 \cdot \text{L}^{-1}$74
- Figura 20:** Representação da autofluorescência das células de *M. aeruginosa* (LTPNA 08). Os histogramas representam a intensidade da fluorescência dos diferentes pigmentos, avaliando nos canais de leitura de FITC, APC, PE e PerCP, com seus respectivos valores de mediana. (A) SYTOX® Green (FITC). (B) Ficocianina (APC). (C) Ficoeritrina (PE). (D) Clorofila (PerCP).....81
- Figura 21:** Gráficos do tipo countour plot mostrando os percentuais de morte basal das células de *M. aeruginosa* (LTPNA 08), através da marcação do SYTOX® Green e da autofluorescência dos pigmentos clorofila e ficocianina, após os tempos de contato de 0, 15, 30 e 60 minutos. (A) APCxFITC – 0 minutos; (B) APCxFITC – 15 minutos; (C) APCxFITC – 30 minutos; (D) APCxFITC – 60 minutos; (E) PerCPxFITC – 0 minutos; (F) PerCPxFITC – 15 minutos; (G) PerCPxFITC – 30 minutos; (H) PerCPxFITC – 60 minutos.....83
- Figura 22:** Gráficos do tipo countour plot mostrando a variação da intensidade de fluorescência das células de *M. aeruginosa* (LTPNA 08) marcadas com o SYTOX® Green em relação à fluorescência da clorofila, após o tempo de contato de 30 minutos com o agente oxidante em concentrações variando de 0,05 a 8 mg.L⁻¹ de Cl_2 . (A) 0,05 mg.L⁻¹ de Cl_2 . (B) 0,5 mg.L⁻¹ de Cl_2 . (C) 1 mg.L⁻¹ de Cl_2 . (D) 1,5 mg.L⁻¹

de Cl_2 . (E) 2 mg.L^{-1} de Cl_2 . (F) $2,5 \text{ mg.L}^{-1}$ de Cl_2 . (G) 4 mg.L^{-1} de Cl_2 . (H) 8 mg.L^{-1} de Cl_286

Figura 23: Gráficos do tipo countour plot mostrando a variação da intensidade de fluorescência das células de *M. aeruginosa* (LTPNA 08) marcadas com o SYTOX® Green em relação à fluorescência da ficocianina, após o tempo de contato de 30 minutos com o agente oxidante em concentrações variando de $0,05$ a 8 mg.L^{-1} de Cl_2 . (A) $0,05 \text{ mg.L}^{-1}$ de Cl_2 . (B) $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ de Cl_2 . (C) 1 mg.L^{-1} de Cl_2 . (D) $1,5 \text{ mg.L}^{-1}$ de Cl_2 . (E) 2 mg.L^{-1} de Cl_2 . (F) $2,5 \text{ mg.L}^{-1}$ de Cl_2 . (G) 4 mg.L^{-1} de Cl_2 . (H) 8 mg.L^{-1} de Cl_287

Figura 24: Gráfico representativo das percentagens de permeabilidade celular e de clorofila-a após exposição às diferentes concentrações de Cl_2 em tempos de contato de 0, 15, 30 e 60 minutos.88

Figura 25: Gráfico representativo das percentagens de permeabilidade celular e de liberação da ficocianina para o meio extracelular após exposição às diferentes concentrações de Cl_2 em tempos de contato de 0, 15, 30 e 60 minutos.....89

Figura 26: Registro fotográfico da suspensão de células de *M. aeruginosa* LTPNA 08 expostas à diferentes doses do oxidante.91

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Principais grupos de cianotoxinas classificadas pelo mecanismo de ação, valores de DL ₅₀ e os seus respectivos gêneros produtores.	26
Tabela 2: Padrão de cianotoxinas da água para consumo humano, segundo a Portaria nº 2914/2011.....	33
Tabela 3: Frequência de monitoramento de cianobactérias no manancial de abastecimento de água de acordo com sua densidade celular, segundo a Portaria nº 2914/2011.	33
Tabela 4: Valores limítrofes de alguns parâmetros de qualidade de água definidos para as diferentes classes de água doce, exigidos pela Resolução CONAMA Nº 357 (BRASIL, 2005).	34
Tabela 5: Características dos subprodutos resultantes da cloração de Microcistina-LR e Cilindrospermopsina.	40
Tabela 6: Composição do meio ASM-1 (Gorhan <i>et al.</i> , 1964).	46
Tabela 7: Gradiente utilizado para a análise de clorofila- <i>a</i> por HPLC-DAD.....	51
Tabela 8: Gradiente utilizado para a análise de MC-LR e RR por LC-MS/MS.	53
Tabela 9: Parâmetros otimizados para as transições monitoradas (<i>m/z</i> 135 e 213) no modo MRM.....	54
Tabela 10: Canais de leitura dos fluorocromos analisados e seus respectivos comprimentos de onda de excitação e emissão.....	55
Tabela 11: Valores de CT e as constantes de primeira ordem obtidos nos ensaios de decaimento de Cl ₂ para as células de <i>M. aeruginosa</i> LTPNA 08, considerando as diferentes doses aplicadas.....	65

LISTA DE ABREVIATURAS

ANTX-a – anatoxina-a
ANTX-a (s) – anatoxina-a (s)
Adda – ácido 3-amino-9-metoxi-2,6,8-trimetil-10-fenil-deca-4,6-dienoico
C – C toxinas
C₁₈ – octadecil-silano
CE – collision energy / energia de colisão
Chla-a – clorofila-a
CONAMA – Conselho Nacional do Meio Ambiente
CO₂ – dióxido de carbono
CT – concentração x tempo de contato
CYL – cilindropermopsina
DL₅₀ – dose letal a 50% dos organismos testados
DMSO – dimetilsulfóxido
DNA – *deoxyribonucleic acid* / ácido desoxirribonucleico
DOU – Diário Oficial da União
DP – desvio padrão
DPD – N,N-dietil-p-fenilenediamina
dcSTX – decarbamoil saxitoxina
dcneoSTX - decarbamoil neosaxitoxina
dcGTX – decarbamoilgoniautoxina
doSTX – desoxicarbamoil saxitoxina
doneoSTX - desoxicarbamoil neosaxitoxina
doGTX – desoxicarbamoil gonიაutoxina
EDTA – ácido etilenodiaminotetracético
ELISA – enzyme-linked immuno sorbent assay / ensaio imunoenzimático
ESI – ionização por *electrospray*
ETA – estação de tratamento de água
FDA – diacetato de fluoresceína
GTX - gonიაutoxina
HAA – ácido haloacético
HOCl – ácido hipocloroso
HPLC – Cromatografia em fase líquida de alta eficiência
HPLC-DAD – Cromatografia em fase líquida de alta eficiência com detector de arranjo de diodos
i.p – intraperitoneal
LC-MS – Cromatografia em fase líquida acoplada à espectrometria de massas
LC-MS/MS – Cromatografia em fase líquida acoplada à espectrometria de massas *in tandem*
LTPNA – Laboratório de Toxinas e Produtos Naturais de Algas
MC – microcistina
Mdha – N-metildehidroalanina
MRM – Monitoramento de Reações Múltiplas
MS – Ministério da Saúde
m/z – razão massa carga
NaClO – Hipoclorito de sódio
NOD – nodularina

NTU/UNT – *nephelometric turbidity unit* / unidade nefelométrica de turbidez
OCI⁻ - íon hipoclorito
PBS - *phosphate buffered saline*
PP1 – proteína fosfatase 1
PP2 – proteína fosfatase 2
PSP – *paralytic shellfish poisoning*
ppm – partes por milhão
Pt/Co – platina-cobalto
rpm – rotação por minuto
SEM - *scanning electron microscopy* / microscopia eletrônica de varredura
SPE – *solid phase extraction* / extração em fase sólida
STX – saxitoxina
NeoSTX – neosaxitoxina
THM – tri-halometanos
uC – unidade de cor
uT – unidade de turbidez
VMP – valor máximo permitido
WHO – World Health Organization

SUMÁRIO

2. REVISÃO DA LITERATURA	19
2.1. Eutrofização e Florações de Cianobactérias.....	19
2.2. Cianobactérias	21
2.3. Cianotoxinas (Toxinas Produzidas por Cianobactérias).....	25
2.3.1. Microcistinas.....	28
2.4. Casos de intoxicação por cianotoxinas no Brasil	31
2.5. Legislação que rege o monitoramento de cianobactérias e cianotoxinas	32
2.6.1. Oxidação química aplicada à remoção de cianotoxinas – Cloração	38
2.7. Métodos de Detecção e Quantificação de Microcistinas	41
2.8. Estudo de viabilidade celular de cianobactérias.....	42
3. OBJETIVOS	44
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	45
4.1. Manutenção e Cultivo de Cianobactérias.....	45
4.2. Avaliação do crescimento celular de <i>M. aeruginosa</i> LTPNA 08.....	46
4.3. Ensaio de oxidação	47
4.3.1. Preparo do inóculo de <i>M.aeruginosa</i>	47
4.3.2. Preparo das soluções estoque de cloro	47
4.3.3. Preparo da água de estudo	48
4.3.5. Parâmetros analisados.....	49
4.3.5.1. Turbidez	49
4.3.5.2. Cor Aparente.....	49
4.3.5.3. Cloro Residual Livre	50
4.3.5.4. Contagem Celular	50
4.3.5.5. Pigmento fotossintético (Clorofila-a)	50
4.3.5.6. Microcistinas	51
4.3.5.7. Viabilidade celular	54
4.7. Análise estatística	58
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	59
5.1. Avaliação do crescimento celular e perfil de produção de cianotoxinas produzidas por <i>M. aeruginosa</i> (LTPNA 08).....	59
5.2. Ensaio de Cloração com Cultivos Laboratoriais de <i>M. aeruginosa</i>	62
5.4.1. Decaimento do cloro.....	62

5.4.2. Efeito da pré-cloração sobre as células de <i>M. aeruginosa</i>	66
5.4.3. Efeito da pré-cloração sobre a turbidez e cor da água de estudo	71
5.4.4. Efeito da pré-cloração sobre a liberação e oxidação das microcistinas de <i>M. aeruginosa</i> LTPNA 08	74
5.4.5. Efeito da pré-cloração sobre a viabilidade celular de <i>M. aeruginosa</i> LTPNA 08.....	80
6. CONCLUSÕES	93
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	95
ANEXOS	104

1. INTRODUÇÃO

A diversidade de resíduos urbanos, industriais e agrícolas, gerados pelas atividades humanas, que, não tratada ou disposta de forma inadequada, pode levar a contaminação dos diversos compartimentos ambientais. Sendo a água um recurso vital para a manutenção da vida na Terra, a sua contaminação é altamente preocupante. O lançamento indiscriminado desses efluentes nos corpos d'água tem levado a uma carga excessiva de nutrientes, acentuando o processo de eutrofização. Esse fenômeno altera a qualidade da água em vários aspectos, incluindo o aumento da incidência de florações de microalgas e cianobactérias (AZEVEDO E BRANDÃO, 2003).

As cianobactérias são microrganismos procariontes fotossintetizantes encontrados nos mais diversos ambientes. São importantes produtores primários e desempenham um papel essencial na oxigenação da atmosfera e na ciclagem de nutrientes. Seu crescimento é favorecido em ambientes aquáticos eutrofizados com grande disponibilidade de nutrientes e temperaturas mais elevadas (TANDEAU DE MARSAC e HOUMARD, 1993).

A elevada presença de cianobactérias nos mananciais de abastecimento público provoca diversos problemas operacionais nas estações de tratamento de água, que incluem a dificuldade de coagulação e floculação, aumento nas dosagens de coagulante e produtos de desinfecção, colmatação dos filtros, sabor e odor na água tratada e formação de subprodutos da desinfecção. Todos esses problemas comprometem a eficiência e aumentam o custo do tratamento pela necessidade de monitoramento da qualidade da água em diversos pontos do sistema de abastecimento e com maior frequência (DI BERNARDO, 1995; DE JULIO *et al.*, 2010).

Entretanto, a maior preocupação em relação a essas florações está no fato de algumas espécies de cianobactérias produzirem metabólitos secundários tóxicos para humanos e animais, denominados cianotoxinas. Esses compostos, em sua maioria, são produzidos e mantidos no interior de células viáveis de cianobactérias durante a fase exponencial de crescimento, sendo liberadas durante a fase de senescência, morte ou lise celular (MEREL *et al.*, 2013). Trata-se de moléculas altamente solúveis em água e de difícil remoção por processos convencionais de

tratamento (CHORUS & BARTRAM, 1999).

O tratamento de água convencional baseado nos processos de coagulação, floculação, sedimentação e filtração se mostram eficientes na remoção de células de cianobactérias (fração intracelular das cianotoxinas), mas pouco eficientes para a remoção dos compostos dissolvidos (fração extracelular das cianotoxinas). Esse fato tem estimulado o desenvolvimento e implementação de barreiras mais eficientes e seguras para a remoção desses compostos (CHOW *et al.*, 1999; HO *et al.*, 2006) e adoção de métodos analíticos padronizados para detectar pequenas concentrações desses compostos na água.

Uma série de estudos na literatura tem avaliado a efetividade dos processos oxidativos na liberação e degradação de cianotoxinas produzidas por espécies tóxicas de cianobactérias (RODRIGUEZ *et al.*, 2008; DING *et al.*, 2010; ZAMYADI *et al.*, 2012; MA *et al.*, 2012; CORAL *et al.*, 2013; FAN *et al.*, 2013; FAN *et al.*, 2014). Dentre os agentes oxidantes, o cloro é o mais utilizado nas estações de tratamento de água, devido ao seu baixo custo, fácil aplicação e efetividade de desinfecção. A cloração é o método de desinfecção mais comum e sua aplicação pode ser feita antes, durante ou após o tratamento convencional. O processo de pré-oxidação pode aumentar a eficiência na remoção de cianobactérias e cianotoxinas dissolvidas. No entanto, sob certas condições, pode causar lise celular, e, consequentemente, promover a liberação das toxinas no meio. Além disso, durante o processo de desinfecção, podem ser formados subprodutos potencialmente tóxicos, decorrentes da reação do cloro com a matéria orgânica presente na água. A própria toxina pode reagir com o cloro e formar subprodutos que ainda são escassos de informações acerca de sua toxicidade, mas que merecem atenção.

O uso da citometria de fluxo em combinação com marcadores moleculares fluorescentes permitem a avaliação física e fisiológica de células individuais dentro de uma população e é uma ferramenta ainda pouco explorada nos estudos de oxidação de cianobactérias. O diacetato de fluoresceína (FDA) e o SYTOX são marcadores que podem ser utilizados para quantificar a atividade metabólica da célula e a viabilidade celular, respectivamente. Estudos recentes avaliaram sistematicamente os impactos dos tratamentos com sulfato de cobre, peróxido de hidrogênio, cloro, permanganato de potássio e ozônio sobre a integridade da membrana celular de cianobactérias e verificaram que todos eles podem induzir a

perda da integridade celular (*LIN et al.*, 2009; *WERT et al.*, 2013; *FAN et al.*, 2013; *FAN et al.*, 2014).

Embora haja o risco de lise celular e liberação das toxinas no meio, a aplicação de oxidantes diretamente na água bruta é ainda uma prática muito comum nas estações de tratamento de água. A pré-oxidação também pode constituir uma opção de tratamento temporário se for provado ser eficaz contra ambas as frações de toxinas (intra e extracelulares) (*FAN et al.*, 2013). Otimizando o tempo de contato e a concentração de oxidante, é possível reduzir os impactos negativos da pré-oxidação. Portanto, é muito importante considerar os efeitos do tratamento sobre a integridade da membrana celular de cianobactérias e o destino das cianotoxinas durante o tratamento oxidativo.

Diante do exposto, o principal objetivo deste trabalho foi verificar em escala laboratorial, a eficiência da cloração, utilizando como agente oxidante o hipoclorito de sódio, na viabilidade celular e remoção de toxinas de cianobactérias.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Eutrofização e Florações de Cianobactérias

O aumento das atividades urbanas e industriais, assim como a descarga de seus efluentes, principalmente por fontes pontuais, acarretam o acúmulo de nutrientes nos corpos d'água, acelerando o processo de eutrofização. Esse processo de enriquecimento, principalmente por compostos nitrogenados e fosfatados, pode ocorrer de forma natural ou artificial (Figura 1). A eutrofização natural é caracterizada como um processo lento e contínuo, em que os nutrientes presentes no solo e rochas são naturalmente lixiviados e escoados aos corpos d'água pelas chuvas e águas superficiais, ao longo de vários anos. A eutrofização artificial, também denominada eutrofização antrópica, por outro lado, é induzida pela ação do homem e caracteriza-se como um processo dinâmico e acelerado. O aporte de nutrientes é mais intenso e provém principalmente da descarga de efluentes (agrícolas, domésticos e industriais) e da remoção da mata ciliar. O resultado é a transição de um ambiente aquático de estado oligotrófico (baixa produtividade biológica) para eutrófico (alta produtividade biológica), em poucos anos (ESTEVES, 1998).

O enriquecimento artificial dos ecossistemas aquáticos produz diversas alterações na qualidade da água, podendo comprometer o seu uso para o abastecimento, geração de energia e como área recreativa (pesca, natação, esportes náuticos). Dentre as alterações, podem ser citados o aumento da turbidez, a redução de oxigênio dissolvido, a perda das qualidades cênicas, a redução da biodiversidade aquática, a morte extensiva de peixes e o aumento da incidência de florações de microalgas e cianobactérias (AZEVEDO, 2002).

Em resposta à eutrofização, a comunidade fitoplanctônica passa por mudanças em sua composição, com redução na diversidade de espécies, porém, com um aumento considerável da biomassa das espécies presentes (AZEVEDO & BRANDÃO, 2003). Nesses ambientes, geralmente observa-se uma dominância de espécies de cianobactérias potencialmente tóxicas, devido à sua vantagem competitiva em relação a outras espécies do fitoplâncton. O surgimento de algumas espécies pode ocorrer em detrimento do desaparecimento de outras. O crescimento acelerado desses organismos nos meses mais quentes do ano forma uma densa camada de células na superfície de reservatórios de água, caracterizando uma

floração ou “*bloom*” (AZEVEDO, 2002). Carmichael (1994) descreveu uma floração ou *bloom* como uma explosão de crescimento que ocorre quando a luz, temperatura e nutrientes favorecem uma espécie, resultando em densidades celulares de vários milhões por litro.

As florações de microalgas e cianobactérias podem causar alterações nas características organolépticas da água, modificando a sua cor e conferindo odor e sabor desagradáveis. Em florações tóxicas de cianobactérias, as cianotoxinas podem atingir concentrações elevadas no corpo d’água, representando risco à saúde humana e animal.

Figura 1: Esquema do processo de eutrofização (natural e artificial) de um ambiente lacustre.

Fonte: Adaptada de <http://www.dern.ufes.br/limnol/main.html>

2.2. Cianobactérias

As cianobactérias são microrganismos procariontes (ausência de membrana delimitando o material genético do citoplasma e outras organelas), gram-negativos, autotróficos (assimilam CO₂ em presença de energia solar) ou mixotróficos (assimilam compostos orgânicos), aeróbios e fotossintetizantes, pertencentes ao domínio *Bacteria* (*Eubacteria*) (CARMICHAEL, 1992).

De acordo com registros fósseis, estima-se que esses organismos tenham surgido no planeta há cerca de 3,5 bilhões de anos. São importantes produtores primários de matéria orgânica, capazes de fixar grandes quantidades de dióxido de carbono e liberar oxigênio, desempenhando um importante papel na oxigenação da atmosfera terrestre. Algumas espécies são capazes ainda de fixar nitrogênio atmosférico, através de células diferenciadas denominadas heterocistos (YOO, *et al.*, 1995; BERMAN-FRANK, 2003 e HAGEMANN, 2011).

A divisão *Cyanobacteria*, classe *Cyanophyceae*, é composta por 4 subclasses: *Gloeobacteriophycidae*, *Synechococcophycidae*, *Oscillatoriohyphyidae* e *Nostochophycidae* (HOFFMANN *et al.*, 2005). Ainda, segundo o novo sistema de classificação taxonômica das cianobactérias, proposto por Komárek *et al.* (2014), o grupo *Cyanobacteria* é composto por 8 ordens: *Gloeobacterales*, *Synechococcales*, *Spirulinales*, *Pleurocapsales*, *Chroococcidiopsidales*, *Chroococcales*, *Oscillatoriales*, *Nostocales*. Os organismos representantes das ordens *Gloeobacterales*, *Synechococcales*, *Spirulinales*, *Pleurocapsales*, *Chroococcidiopsidales*, *Chroococcales*, *Oscillatoriales* possuem apenas células vegetativas em sua estrutura, enquanto os da ordem *Nostocales* apresentam além das células vegetativas, células diferenciadas, como o heterocisto e o acineto. O heterocisto consiste em uma célula vegetativa com parede espessada, cuja função é a fixação de nitrogênio atmosférico, de forma anaeróbica, através de complexos enzimáticos (enzimas nitrogenases), e o acineto é uma célula de resistência que se desenvolve quando as condições ambientais não são favoráveis (BICUDO & MENEZES, 2005).

Em relação à morfologia, as formas unicelulares podem ser encontradas em formatos esféricos, ovóides, fusiformes ou cilíndricos e podem se agregar formando colônias, que são envoltas por uma bainha de mucilagem. As formas pluricelulares são encontradas na forma de filamentos (retos ou espiralados), compostos por uma

cadeia de células denominadas tricomas (CHORUS & BARTRAM, 1999). Alguns exemplos estão representados na Figura 2.

Figura 2: Morfologia de cianobactérias, onde: 1 – *Aphanothece clathrata*. 2 – *Chroococcus minor*. 3 e 4 – *C. minutus*. 5 – *Merismopedia tenuissima*. 6 – *Microcystis aeruginosa* f. *flos-aquae*. 7 – *M. incerta*. 8 – *Lyngbya limnetica*. 9 – *Microcystis robusta*. 10 – *Oscillatoria boryana*. 11 – *O. simplicissima*. 12 – *O. subtilissima*. Fig. 13 – *Raphidiopsis mediterranea*. 14 e 15 – *Synechocystis aquatilis*. (Escala = 10 µm.)

Fonte: adaptado de SILVA (1999).

As cianobactérias necessitam somente de luz, água, dióxido de carbono e substâncias inorgânicas para manter seu metabolismo (AZEVEDO & BRANDÃO,

2003). Seu processo fotossintético é similar ao dos vegetais superiores e algas verdes, tendo como principal pigmento de captação de luz a clorofila-a. Além da clorofila-a, as cianobactérias sintetizam pigmentos acessórios, como as ficobilinas (ficocianina e ficoeritrina) e alguns carotenóides, que auxiliam tanto na captação de luz, como na proteção contra a foto-oxidação da clorofila-a (YOO *et al.*, 1995). A ficocianina, juntamente com os demais pigmentos, confere às cianobactérias coloração azul-esverdeada característica deste grupo. Em resposta a mudanças ambientais, ou outros interferentes, a síntese de alguns desses pigmentos pode variar, alterando, assim, todo o metabolismo da cianobactéria.

As cianobactérias lacustres planctônicas são dotadas ainda de vacúolos gasosos, permeáveis somente aos gases, que regulam a sua flutuabilidade na coluna d'água. Esses vacúolos controlam a sua movimentação em direção à superfície ou em direção às zonas mais profundas de acordo com a necessidade (disponibilidade de luz, nutrientes e concentração de oxigênio) (RIVIERS, 2006). A incapacidade das cianobactérias de regular os seus vacúolos adequadamente – por exemplo, devido a variações extremas de temperatura ou de suprimento de oxigênio – pode levar a sua migração até a superfície da água e formar aglomerados de células (RAVEN *et al.*, 1996).

Uma das características mais marcantes desses microrganismos é a capacidade de crescerem nas mais variadas condições ambientais, que incluem ambientes aquáticos (água doce, marinha ou salobra) e terrestres, sendo seu crescimento influenciado, principalmente, pelas condições de temperatura, pH, luz e concentração de nutrientes do meio (GIBSON & SMITH, 1982; TANDEAU DE MARSAC e HOUMARD, 1993). São um dos poucos organismos que estão aptos a se desenvolverem em ambientes extremos tais como desertos, fontes termais, geleiras, água de alta salinidade, entre outros. Entretanto, ambientes de água doce são os mais favoráveis para o seu crescimento, em razão da maior adaptação das espécies em águas neutroalcalinas (pH 6 a 9), temperaturas entre 15°C a 30°C e alta concentração de nutrientes (AZEVEDO & BRANDÃO, 2003).

As cianobactérias compõem um grupo bastante heterogêneo de organismos unicelulares e pluricelulares, com 267 gêneros e aproximadamente 2.700 espécies já descritas (KOMÁREK & HAUER, 2013; NABOUT *et al.*, 2013). Segundo Riviers (2006) e Van Apeldoorn *et al.* (2007), em 1971 eram conhecidas cerca de 2.000

espécies de cianobactérias. Em 2006, Azevedo e Sant'Anna estimaram em torno de 2.400 espécies e, mais recentemente, segundo o levantamento de Nabout *et al.* (2013), já são caracterizadas cerca de 2.700 espécies. As estimativas para a riqueza de espécies, por outro lado, vão muito além desses números, reforçando assim, a importância e o aumento evidente do número de estudos de biodiversidade desse grupo.

Segundo o levantamento realizado por Sant'Anna *et al.* (2012), já foi referenciada em território brasileiro a ocorrência de 460 espécies de cianobactérias, com maior biodiversidade em regiões subtropicais. Dessas, de acordo com Sant'Anna *et al.* (2008), cerca de 32 são potencialmente tóxicas, sendo 12 da ordem Chroococcales, 10 Oscillatoriales e 10 Nostocales. Os gêneros *Microcystis* e *Anabaena* são compostos com o maior número de espécies tóxicas. A *Microcystis aeruginosa* é considerada a espécie com maior distribuição no Brasil e é amplamente estudada em todo o mundo, assim como as microcistinas, consideradas as cianotoxinas de maior prevalência. A Figura 3 mostra alguns gêneros de cianobactérias produtoras de cianotoxinas.

Figura 3: Exemplos de gêneros de cianobactérias produtoras de cianotoxinas (AlgaeBASE).

Fonte: imagens retiradas do site <http://www.algaebase.org/>.

2.3. Cianotoxinas (Toxinas Produzidas por Cianobactérias)

As cianobactérias, em razão de sua diversificada composição bioquímica, são capazes de produzir uma ampla variedade de metabólitos secundários, dentre eles as cianotoxinas. Essas toxinas causam efeitos prejudiciais aos tecidos, células e organismos, podendo atingir muito além da comunidade aquática, representando um perigo para a saúde humana e animal. Embora não se saiba ao certo o significado ecológico e ou ecofisiológico da produção destas toxinas, têm-se assumido que esses compostos tenham função protetora contra a predação pelo zooplâncton e para a eliminação de organismos competidores (CARMICHAEL, 1992; AZEVEDO & BRANDÃO, 2003).

As toxinas são predominantemente encontradas no interior de células viáveis das cianobactérias tóxicas (fração intracelular das cianotoxinas), com pequenas concentrações sendo liberadas naturalmente para o meio (fração extracelular das cianotoxinas) (HART *et al.*, 1998; SENOGLES *et al.* 2000). No entanto, quando as células atingem a fase de senescência ou quando sofrem algum tipo de estresse que causem danos à parede celular, sofrem lise liberando quantidades significativas da toxina intracelular para a coluna d'água (YOO *et al.*, 1995; HART *et al.*, 1998; AZEVEDO & BRANDÃO, 2003). Algumas retêm as toxinas dentro das células durante a maior parte do ciclo de vida, enquanto outras as liberam no meio circundante à medida que são produzidas. A produção de cianotoxinas também pode variar, com produção constante ao longo de todo o crescimento, ou ainda, concentrando a produção em um determinado estágio do crescimento (exponencial ou estacionária).

A exposição a essas toxinas podem causar desde irritações na pele, até danos no funcionamento do sistema nervoso, danos às células hepáticas, renais, pulmonares e cardíacas, tumores e podem levar o indivíduo à morte, em poucos minutos, horas ou dias. A principal via de intoxicação é oral, através do consumo de água ou ingestão de peixes e frutos do mar contaminados com as toxinas, mas pode ocorrer via contato dérmico (natação), inalação (aerossóis) ou intravenoso (hemodiálise) (AZEVEDO & BRANDÃO, 2003).

São classificadas de acordo com suas estruturas químicas em peptídeos cíclicos, alcaloides ou lipopolissacarídeos, e ainda, classificadas farmacologicamente em neurotoxinas (saxitoxina (STX), neosaxitoxina (neoSTX), anatoxina-a (ANTX-a) e anatoxina-a(s) (ANTX-a(s)), hepatotoxinas (microcistina (MC) e nodularina (NOD)), citotoxinas (cilindrospermopsina (CYL)), dermatotoxinas (lungbiatoxina-a, debromoafisiatoxina e afisiatoxina) e toxinas irritantes ao contato (lipopolissacarídeos) (AZEVEDO & BRANDÃO, 2003; HUDNELL, 2008). As principais cianotoxinas e suas respectivas estruturas químicas podem ser vistas na Figura 4. Na Tabela 1 são apresentadas as principais cianotoxinas, classificadas pelo seus mecanismos de ação, valores de toxicidade e os principais gêneros produtores.

Tabela 1: Principais grupos de cianotoxinas classificadas pelo mecanismo de ação, valores de DL₅₀ e os seus respectivos gêneros produtores.

	Cianotoxina	LD ₅₀ (i.p. rato) de toxina pura (µg/kg)	Gênero produtor da toxina	Mecanismo de toxicidade
Hepatotoxinas	Microcistinas em geral (~80 tipos conhecidos, heptapeptídeo cíclico)	45 – 1000	<i>Microcystis</i> , <i>Planktothrix</i> , <i>Oscillatoria</i> , <i>Nostoc</i> ,	Bloqueiam fosfatases protéicas por ligação covalente e causam hemorragia do fígado; podem causar danos acumulativos.
	Microcistina-LR	60 (25 – 125)	<i>Anabaena</i> ,	
	Microcistina-YR	70	<i>Anabaenopsis</i> ,	
	Microcistina-RR	300 – 600	<i>Hapalosiphon</i>	
	Nodularina	30 – 50	<i>Nodularia spumigena</i>	
Neurotoxinas	Anatoxina-a (alcaloide)	250	<i>Anabaena</i> , <i>Oscillatoria</i> , <i>Aphanizomenon</i> , <i>Cylindrospermum</i>	Bloqueia a despolarização pós-sináptica.
	Anatoxina-a(s) (alcaloide)	20	<i>Anabaena</i>	Bloqueia a acetilcolinesterase
	Saxitoxinas (alcaloides)	10 – 30	<i>Aphanizomenon</i>	Bloqueia canais de sódio
Citotoxinas	Cilindrospermopsina (alcalóide)	2100 em 1 dia 200 em 5-6 dias	<i>Cylindrospermopsis raciborskii</i>	Bloqueia a síntese protéica; toxicidade cumulativa

Fonte: Adaptada de CHORUS & BARTRAM, 1999.

Assim como os pigmentos, a produção de cianotoxinas pode variar em resposta às mudanças ambientais ou outros interferentes. Uma espécie de cianobactéria pode produzir mais de um tipo de toxina e dentro de uma mesma espécie podem existir cepas produtoras e não produtoras de cianotoxinas.

Figura 4: Estruturas químicas das principais cianotoxinas encontradas em corpos d'água com floração de cianobactérias.

Fonte: Adaptada de CARDOZO, 2007.

2.3.1. Microcistinas

Microcistinas (MC) (Figura 5) são toxinas hepatotóxicas, frequentemente encontrada em florações de água doce, produzidas por espécies de vários gêneros de cianobactérias, incluindo *Microcystis*, *Oscillatoria* (*Planktothrix*), *Anabaena*, *Nostoc*, *Anabaenopsis* e *Hapalosiphon*.

Tratam-se de peptídeos cíclicos com peso molecular que variam de 800 a 1.100Da, constituídos por 7 aminoácidos ligados, 5 aminoácidos praticamente invariáveis e 2 variáveis, os quais são normalmente L-aminoácidos (X e Z); D-alanina¹ – X² – ácido D-metilaspártico – Z⁴ – Adda⁵ – ácido D-glutâmico⁶ – N-metil dehidroalanina⁷. As MCs são nomeadas de acordo com os dois L-aminoácidos variáveis (CARMICHAEL *et al.*, 1988). Por exemplo, MC-LR (leucina-arginina), MC-RR (arginina-arginina), MC-LA (leucina-alanina) e MC-YA (tirosina-alanina).

Consistem de mais de 85 variantes identificadas, as quais apresentam diferentes níveis de toxicidade (RASTOGI *et al.*, 2014). As variantes mais tóxicas de microcistinas são aquelas que apresentam em sua estrutura L-aminoácidos mais hidrofóbicos, como por exemplo, MC-LA, -LR, -YR e -YM, e as menos tóxicas aquelas com aminoácidos mais hidrofílicos, tal como a MC-RR (FALCONER, 2005). Com base em estudos de toxicidade aguda, dentre as diferentes variantes, a MC-LR é considerada a hepatotoxina mais potente (FUNARI & TESTAI 2008).

São moléculas relativamente polares, solúveis em água e metanol, mas insolúveis em solventes orgânicos. As MCs são mais estáveis em água filtrada ou deionizada do que em reservatórios e águas naturais (PRAKASH *et al.*, 2009). Podem resistir à ebulição e persistir durante muitos anos quando armazenadas a seco em temperatura ambiente (FAN *et al.*, 2014a). MCs são bastante estáveis sob a luz solar, mas podem degradar sob radiação ultravioleta (TSUJI *et al.*, 1995). São resistentes a hidrólise e oxidação química em pH próximo ao neutro, no entanto, em valores de pH elevado (≈ 9) e temperaturas de 21-30°C ou baixo (≈ 1) e temperaturas de 40°C, uma lenta hidrólise pode ser observada (RASTOGI, 2014). Apesar de sua estabilidade química, MCs são passíveis de biodegradação por bactérias aquáticas (JONES *et al.*, 1994; HO *et al.*, 2012).

As MCs são sintetizadas pela via não-ribossomal por grandes complexos multi-enzimáticos que incluem a PKS (polyketide synthase) e NRPS (non-ribossomal peptide synthetase) (RASTOGI *et al.*, 2014).

O Adda (ácido 3-amino-9-metóxi-2,6,8-trimetil-10-fenil-4,6-dienoico) e o resíduo N-metil dehidroalanina (Mdha) são responsáveis pela atividade biológica, conferindo toxicidade ao composto, e seu principal mecanismo de ação é a inibição das proteínas fosfatases tipo 1 (PP1) e tipo 2 (PP2A) (CHORUS & BARTRAM, 1999). A inibição da atividade dessas enzimas induzidas pelas MCs é resultado de uma interação não-covalente inicial, mediada pelo Adda hidrofóbico, da cadeia lateral das MCs e a parte apolar do triptofano da enzima. Seguida de uma ligação covalente do α , β -carbonil insaturado do resíduo de Mdha das MCs com o grupamento tiol da cisteína-273 da PP1 e da cisteína-266 da PP2 (DAWSON, 1998).

As MCs agem sobre os hepatócitos, onde chegam por meio de receptores dos ácidos biliares e promovem desorganização do citoesqueleto. Os danos às células hepáticas incluem ainda peroxidação lipídica, perda da integridade da membrana, fragmentação de DNA, apoptose, necrose e sangramento intra-hepático, podendo levar à morte por choque hemorrágico (RUNNEGAR & FALCONER, 1982; CHORUS & BARTRAM, 1999). Além da inibição de proteínas fosfatases, o estresse oxidativo induzido por MCs também pode causar danos ao DNA, com grandes mudanças na transcrição de genes e potencial de promover tumor.

A intoxicação pode ocorrer através do consumo de água, alimento ou suplemento alimentar contaminados por MCs, durante o uso recreacional de corpos d'água contendo florações tóxicas de cianobactérias ou por hemodiálise, se a água usada no preparo da solução de diálise não for purificada adequadamente. Os sintomas causados pela intoxicação por MCs podem incluir náusea, fraqueza, irritação de pele, gastroenterite, pneumonia e hepatoenterite (ROEGNER *et al.*, 2013).

A toxicidade das MCs em animais de laboratório (camundongos) apresenta DL_{50} entre 50 e 1200 $\mu\text{g/Kg}$ de peso corpóreo quando administrada via intraperitoneal (i.p) e entre 5.000 e 10.900 $\mu\text{g/Kg}$ de peso corpóreo por administração oral. Como mencionado anteriormente, a MC-LR é considerada a variante mais tóxica, com DL_{50} (i.p.) na faixa de 50~60 $\mu\text{g/Kg}$ de peso corpóreo. Os valores de DL_{50} (i.p.) de outras

variantes, tais como a MC-LA, -YR e -YM, são similares ao da MC-LR, já a DL₅₀ (i.p.) de MC-RR é cerca de 10 vezes maior (Tabela 1) (CHORUS & BARTRAM, 1999).

Figura 5: Estrutura geral das microcistinas.

Fonte: Adaptada de CARDOZO, 2007.

2.4. Casos de intoxicação por cianotoxinas no Brasil

Diversos casos de intoxicação humana e animal por cianotoxinas já foram relatados em todo mundo, embora nem todos comprovados. Os relatos incluem intoxicações em animais domésticos (gado bovino, ovelhas, porcos, cavalos, cães, entre outros), selvagens (aves, patos, rinocerontes, veados, zebras, entre outros) e aquáticos (peixes, tartarugas, aves) (CHORUS & BARTRAM, 1999; CHORUS, 2001; RASTOGI *et al.*, 2014).

No Brasil, o primeiro caso comprovado de intoxicação humana, ocorreu em 1996, na cidade de Caruaru (PE), quando 116 (89%) de 131 pacientes com problemas renais crônicos, passaram a apresentar um quadro clínico de distúrbios visuais, náusea e vômito após serem submetidos a sessões de hemodiálise. Subsequentemente, 100 pacientes desenvolveram insuficiência hepática aguda e, desses, 76 vieram a falecer. Testes realizados nos filtros de carvão ativado utilizado na hemodiálise indicaram a presença de cianotoxinas, dos grupos da microcistina e cilindrospermopsina (JOCHIMSEN *et al.*, 1998; POURIA *et al.*, 1998; CARMICHAEL *et al.*, 2001; AZEVEDO *et al.*, 2002).

No entanto, TEIXEIRA *et al.* (1993) apontam ocorrências anteriores que relacionam a intoxicação e morte humana com toxinas produzidas por cianobactérias. Em 1988, na região de Paulo Afonso (Bahia), foram relatados 2000 casos de gastroenterite severa que resultaram na morte de 88 pessoas num período de 42 dias. Os autores correlacionam esse acontecimento com o consumo de água contaminada por cianotoxinas, do reservatório de Itaparica, onde na época, ocorreu uma grande floração de cianobactérias dos gêneros *Microcystis* e *Anabaena*.

2.5. Legislação que rege o monitoramento de cianobactérias e cianotoxinas

Os graves incidentes de intoxicação, descritos anteriormente, contribuíram para a inclusão das cianotoxinas no padrão de potabilidade brasileiro, objeto da Portaria MS nº 2914/2011, a qual estabelece os procedimentos e responsabilidades relativos ao controle e vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade. Com a entrada em vigor dessa Portaria, os responsáveis pelo tratamento e fornecimento de água para consumo humano ficam obrigados a realizar o monitoramento da ocorrência de cianobactérias na água do manancial utilizado para abastecimento e de algumas cianotoxinas na água tratada. A Portaria nº 2914 do Ministério da Saúde (BRASIL, 2011) estabelece valores máximos permitidos (VMP) para MCs e STXs de 1,0 µg/L e 3,0 µg equivalente de STX/L, respectivamente. Essas concentrações devem representar as contribuições da fração intracelular e da fração extracelular na amostra analisada. A frequência de realização do monitoramento de cianobactérias no manancial de abastecimento de água é realizada de acordo com a densidade celular encontrada na amostragem. A amostragem deve ser realizada mensalmente se a densidade de cianobactérias for igual ou inferior a 10.000 células/ml e semanalmente se esse valor for excedido. Além disso, a Portaria sugere que, quando for detectada a presença de gêneros potencialmente produtores de cilindrospermopsinas (CYL) e anatoxina-a(s) (ANA-a(s)) no monitoramento de cianobactérias, a análise dessas cianotoxinas é recomendada, observando o valor máximo aceitável de 1,0 µg/L para CYL. Outras cianotoxinas não foram inseridas pela inexistência de técnicas de detecção padronizadas e pela necessidade de informações mais consolidadas.

As tabelas 2 e 3 Esses valores estão representados na Tabela 2 e 3.

Tabela 2: Padrão de cianotoxinas da água para consumo humano, segundo a Portaria nº 2914/2011.

Cianotoxinas	Unidade	VMP⁽¹⁾	VMA⁽²⁾
Microcistinas	µg/L	1,0 ⁽³⁾	-
Saxitoxinas	µg equivalente STX/L	3,0	-
Cilindrospermopsinas	µg/L	-	1,0

NOTAS:

(1) Valor máximo permitido

(2) Valor máximo aceitável

(3) O valor representa o somatório das concentrações de todas as variantes de microcistinas

Fonte: Portaria MS nº 2914/2011 (BRASIL, 2011)

Tabela 3: Frequência de monitoramento de cianobactérias no manancial de abastecimento de água de acordo com sua densidade celular, segundo a Portaria nº 2914/2011.

Densidade de cianobactérias (células/mL):	Frequência
≤ 10.000	Mensal
> 10.000	Semanal

Fonte: Portaria MS nº 2914/2011 (BRASIL, 2011)

A Resolução CONAMA Nº 357, de 17 de março de 2005 (BRASIL, 2005), dispõe sobre a classificação dos corpos d'água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes. Assim como a Portaria MS nº 2914/2011, o Conselho Nacional de Meio Ambiente, por meio desta resolução, define valores máximos de densidade de cianobactérias entre 20.000 a 100.000 células/mL para as diferentes classes de água doce. A Tabela 4 mostra alguns parâmetros de qualidade de água e seus valores máximos permitidos para cada classe de água doce, exigidos pela legislação brasileira.

Tabela 4: Valores limítrofes de alguns parâmetros de qualidade de água definidos para as diferentes classes de água doce, exigidos pela Resolução CONAMA Nº 357 (BRASIL, 2005).

Parâmetros	Classe 1	Classe 2	Classe 3	Classe 4
Turbidez	40 UNT	100 UNT	100 UNT	-
Cor verdadeira	Nível de cor natural do corpo de água (mg Pt/L)	75 mg Pt/L	75 mg Pt/L	-
pH	6,0 ~ 9,0	6,0 ~ 9,0	6,0 ~ 9,0	6,0 ~ 9,0
Clorofila <i>a</i>	10 µg/L	30 µg/L	60 µg/L	-
Densidade de cianobactérias	20.000 células/mL ou 2 mm ³ /L	50.000 células/mL ou 5 mm ³ /L	100.000 células/mL ou 10 mm ³ /L *	-

* Cianobactérias para dessedentação de animais: os valores de densidade de cianobactérias não deverão exceder 50.000 células/ml, ou 5mm³/L.

O Conselho Nacional do Meio Ambiente, por meio da Resolução CONAMA nº 274, de 29 de novembro de 2000 (BRASIL, 2000), estabelece as definições dos critérios de balneabilidade em águas brasileiras, de forma a assegurar as condições necessárias à recreação de contato primário (atividades de natação, esqui aquático, mergulho ou qualquer atividade que exija o contato direto do usuário com os corpos d'água). Apesar dessa Resolução não apresentar valores orientadores para o número de cianobactérias, ela classifica como impróprias, águas no trecho avaliado com a presença de floração de algas ou outros organismos, até que se comprove que não oferecem riscos à saúde humana. Trechos de praias e balneários com ocorrência de toxicidade ou formação de nata decorrente de floração de algas ou outros organismos são passíveis de interdição pelos órgãos de controle ambiental.

Recentemente foi publicada no Diário Oficial da União (DOU), a Resolução CONAMA nº 467, de 16 de julho de 2015 (BRASIL, 2015), que dispõe sobre critérios para a autorização de uso de produtos ou de agentes de processos físicos, químicos ou biológicos para o controle de organismos ou contaminantes em corpos hídricos superficiais e dá outras providências. Segundo o artigo 7º, a autorização para uso de produtos e processos físicos, químicos ou biológicos, em mananciais de abastecimento público, deve ser informada às secretarias municipais de saúde pelo órgão ambiental competente, especialmente no controle da proliferação de cianobactérias.

Como visto, os reservatórios podem ser utilizados para diversas finalidades, mas o abastecimento público e a recreação são as atividades que requerem uma maior atenção, já que as principais formas de exposição às cianotoxinas incluem a via oral e dérmica, por meio da ingestão ou do uso recreacional da água. Em função dos riscos potenciais à saúde e à preservação da vida aquática, este tema tem ganhado espaço na legislação nacional. As resoluções, publicações e regulamentos são constantemente revisados, conforme avançam os estudos sobre esses micropoluentes, a fim de garantir a adequação da água às suas diferentes finalidades (CARVALHO *et al.*, 2013).

2.6. Tratamento de água para a remoção de cianobactérias e cianotoxinas

A elevada presença de cianobactérias nos mananciais de abastecimento público, além de conferir sabor e odor desagradáveis à água, resultado do aumento da produção de compostos como geosmina e metil-isoborneol, pode causar diversos problemas operacionais nas estações de tratamento de água (ETA), afetando a eficiência e o custo do tratamento. Os problemas operacionais incluem dificuldade de coagulação e floculação, baixa eficiência do processo de decantação, colmatação dos filtros e o aumento da necessidade de produtos para desinfecção (EDZWALD & WINGLER, 1990; EDZWALD, 1993; DI BERNARDO, 1995). Entretanto, a maior preocupação em relação a essas florações está no fato de algumas espécies de cianobactérias serem produtoras de toxinas extremamente potentes (COHEN, 1986; CARMICHAEL, 1988).

No Brasil, a tecnologia mais amplamente utilizada no tratamento de água para abastecimento público é o sistema convencional. As etapas de coagulação, floculação, sedimentação ou flotação e filtração, que contemplam tal sistema, apresentam uma alta eficiência na remoção de células viáveis de cianobactérias, sendo essa eficiência influenciada principalmente pelas condições de coagulação e floculação (YOO *et al.*, 1995; CHOW *et al.*, 1999). Tais etapas podem ser reproduzidas em escala laboratorial através do teste de jarros, uma ferramenta bastante útil para a eleição das melhores condições de agitação, tempo de contato e dosagens de agentes químicos (oxidantes, coagulantes, floculantes). No entanto, estudos mostram que o mesmo não alcança a mesma expectativa em relação à remoção dos metabólitos extracelulares ou dissolvidos, o que requer, muitas vezes, a adoção de barreiras auxiliares para aumentar a eficiência na remoção desses compostos (HIMBERG *et al.*, 1989; CHOW *et al.*, 1999; HO *et al.*, 2006). Dentre os métodos de tratamento de água não convencionais, um grande destaque tem sido dado a processos de adsorção, fundamentados no uso de carvão ativado (LAMBERT *et al.*, 1996; MÜLLER *et al.*, 2009) flotação por ar dissolvido seguido de filtração rápida (EDZWALD & WINGLER, 1990; EDZWALD, 1993); processos de separação por membranas (osmose reversa, nanofiltração, microfiltração e ultrafiltração) (WESTRICK *et al.*, 2010); processos de oxidação química envolvendo agentes como cloro e derivados (NICHOLSON *et al.*, 1994; HO *et al.*, 2006; KULL *et*

al., 2006; DALY *et al.*, 2007; MEREL *et al.*, 2009), permanganato de potássio (RODRÍGUEZ *et al.*, 2007; RODRÍGUEZ *et al.*, 2008; FAN *et al.*, 2013), peróxido de hidrogênio (HE *et al.*, 2012) e ozônio (ROSITANO *et al.*, 2001; BROOKE *et al.*, 2006) e, mais recentemente, processos oxidativos avançados (peroxidação assistida por radiação ultravioleta, reagente de Fenton, foto-Fenton, fotocatalise heterogênea e ozonização assistida por ultravioleta em meio básico) (PROUSEK, 1996; MOMANI, 2007; SHARMA *et al.*, 2012).

2.6.1. Oxidação química aplicada à remoção de cianotoxinas – Cloração

As técnicas de desinfecção baseadas nos processos de oxidação química têm complementado o sistema convencional de tratamento de água, configurando-se uma barreira contra os riscos provocados pela presença desses compostos na água de abastecimento público. O processo de desinfecção visa à inativação de microrganismos patogênicos presentes na água, através do uso de agentes químicos ou não químicos. Os agentes químicos incluem cloro, bromo, iodo, dióxido de cloro, ozônio, permanganato de potássio, peróxido de hidrogênio, ácido peracético, ferrato de potássio e íons metálicos prata e cobre. Dentre os agentes físicos (não químicos) destacam-se o calor e a radiação ultravioleta (DI BERNARDO & DANTAS, 2005).

A cloração foi o primeiro e ainda é um dos métodos mais comuns de desinfecção utilizados no mundo, mas em países como a Europa e os Estados Unidos é também usual, o uso de oxidantes como cloramina, dióxido de cloro, permanganato de potássio, peróxido de hidrogênio e ozônio no tratamento (OGA *et al.*, 2008). Os agentes oxidantes são geralmente adicionados no final do processo de tratamento de água, mas podem ser utilizados no início ou em pontos intermediários de acordo com a necessidade. São utilizados principalmente para o controle de odor e sabor, remoção de cor, remoção de ferro e manganês e controle do crescimento de microrganismos patogênicos nos sistemas de distribuição e estocagem (SHARMA *et al.*, 2012). Além disso, devido a sua alta capacidade oxidativa, a cloração promove eficiente remoção de micropoluentes como pesticidas e cianotoxinas (MEREL *et al.*, 2010). A pré-oxidação tem sido amplamente relatada por auxiliar a coagulação, especialmente na remoção de algumas algas e cianobactérias, e têm se mostrado bastante eficiente, sob certas condições, na degradação de algumas cianotoxinas, mas também pode levar à lise celular e liberação das toxinas no meio, o que não é interessante para os sistemas de tratamento de água (CHORUS & BARTRAM, 1999). A pós-oxidação, por outro lado, se mostra mais eficiente na remoção da fração extracelular.

O processo de oxidação envolve a troca de elétrons entre espécies químicas com mudança do estado de oxidação das espécies envolvidas. A espécie que perde elétrons sofre oxidação e a que ganha elétrons sofre redução, caracterizando uma

reação de oxirredução. O cloro aplicado na água, na forma de gás, solução de hipoclorito de sódio ou hipoclorito de cálcio na forma seca, sofre inicialmente hidrólise para a formação de cloro livre, na forma de cloro molecular aquoso, ácido hipocloroso (HOCl) e íon hipoclorito (ClO⁻), sendo o HOCl a espécie mais reativa (Sharma *et al.*, 2012). As equações das reações químicas envolvidas são:

$$pK_a = -\log K_a = 7,53$$

A proporção relativa dessas formas é altamente dependente do pH e da temperatura da água. Devido ao pKa de 7.53 do HOCl, em valores de pH baixos a espécie dominante é o HOCl e em valores de pH mais elevados, prevalece a forma menos reativa, o ClO⁻ (WESTRICK *et al.*, 2010). Estudos como o Nicholson *et al.* (1994), mostram que em valores de pH baixos, a remoção de microcistinas é bastante eficiente, mas conforme se elevam os valores de pH há um comprometimento dessa eficiência. Em vista disto, para a inativação das microcistinas, é aconselhável que se proceda a cloração em valores de pH inferiores a 8,0. No entanto, em contraste com as MCs, observa-se um aumento da taxa de inativação das STXs em valores elevados de pH, fato explicado pela forma ionizada das STXs em pH elevado, tornando-as mais suscetíveis à oxidação (NICHOLSON *et al.*, 2003; ZAMYADI *et al.*, 2010). Além do pH da amostra, parâmetros como o tempo de contato e a dose de oxidante aplicada são responsáveis pela eficiência da oxidação de cianotoxinas, tratando-se de uma etapa altamente crítica no tratamento (NICHOLSON *et al.*, 1994, TSUJI *et al.*, 1997, HART *et al.*, 1998; SENOGLES *et al.*, 2000 e NICHOLSON *et al.*, 2003).

Apesar dos benefícios decorrentes do tratamento de desinfecção, o cloro reage com a matéria orgânica presente na água e pode levar à formação de subprodutos orgânicos potencialmente carcinogênicos e mutagênicos. Dentre os subprodutos da cloração, os tri-halometanos (THM) são os mais conhecidos e de

maior ocorrência, seguido dos ácidos haloacéticos (HAA) (OGA *et al.*, 2008). Devido à sua potencial toxicidade, os THM e HAA também foram incluídos no padrão de potabilidade objeto da Portaria MS nº 2914/2011, com valores de referência (VMP) de 0,08 e 0,1mg/L para HAA e THM totais, respectivamente, para a água de consumo humano. A própria toxina também pode reagir com o cloro e formar subprodutos dessa reação, sendo descritos na literatura cerca de 8 subprodutos, 6 compostos e seus respectivos isômeros oriundos da cloração de MC-LR e 2 compostos oriundos da Cilindrospermopsina (Tabela 5). Entretanto ainda há escassez de informações sobre eles e seus efeitos sobre a saúde (TSUJI *et al.* 1997, BANKER *et al.* 2001, MEREL *et al.* 2009, MEREL *et al.* 2010).

Tabela 5: Características dos subprodutos resultantes da cloração de Microcistina-LR e Cilindrospermopsina.

Toxina	Subproduto	Fórmula química	Isômeros observados
Microcistina-LR	Dihidroxi-microcistina	$C_{49}H_{76}N_{10}O_{14}$	8
	Monocloro-microcistina	$C_{49}H_{73}N_{10}O_{12}Cl$	3
	Monocloro-hidroxi-microcistina	$C_{49}H_{75}N_{10}O_{13}Cl$	5
	Monocloro-dihidroxi-microcistina	$C_{49}H_{75}N_{10}O_{14}Cl$	>10
	Dicloro-dihidroxi-microcistina	$C_{49}H_{74}N_{10}O_{14}Cl_2$	7
	Tricloro-hidroxi-microcistina	$C_{49}H_{73}N_{10}O_{13}Cl_3$	6
Cilindrospermopsina	5-cloro-cilindrospermopsina	$C_{15}H_{20}N_5O_7SCl$	Não especificado
	Ácido cilindrospermopsina	$C_{12}H_{19}N_3O_7S$	Não especificado

Fonte: Adaptado de Merel *et al.* 2010

2.7. Métodos de Detecção e Quantificação de Microcistinas

Em virtude do risco que as cianotoxinas podem apresentar à saúde humana e animal, as pesquisas acerca desses metabólitos tem se intensificado. Existem atualmente diversos métodos para a detecção, identificação e quantificação de cianotoxinas, que variam desde testes rápidos e de baixo custo em campo, até técnicas analíticas mais sofisticadas. Os métodos analíticos variam quanto ao nível de sofisticação bem como o grau de informação que fornecem e incluem técnicas imunológicas e bioquímicas baseadas, respectivamente, em ensaios imunoenzimáticos (ELISA) e de atividade enzimática (inibição de proteína fosfatase, PPIA), ensaios biológicos (bioensaios, testes de toxicidade) e métodos analíticos que incluem cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC-UV/Vis, HPLC-PDA), eletroforese capilar (CE), ressonância magnética nuclear (NMR) e espectrometria de massas (LC-MS, MALDI-TOF, GC-MS). É importante que o método de análise apropriado seja selecionado para cada composto a fim de aumentar a eficiência da análise (MSAGATI *et al.*, 2006). Embora essas técnicas sejam altamente eficientes na detecção e quantificação de cianotoxinas, elas ainda não são muito difundidas no monitoramento de águas de abastecimento, devido ao alto custo de alguns equipamentos e reagentes. Além disso, algumas cianotoxinas carecem de padrões analíticos, dificultando a sua quantificação.

É evidente a necessidade do desenvolvimento de um método rápido de análise dessas toxinas, mas fornecer meios para avaliar os níveis intracelulares de toxinas, além daquelas dissolvidas na água (extracelular), é também de extrema relevância. Isto é particularmente importante onde as águas afetadas são destinadas para o abastecimento público, permitindo que ações corretivas sejam tomadas, quando necessário, para que o tratamento de água funcione de maneira eficiente (LAWTON, 1994).

2.8. Estudo de viabilidade celular de cianobactérias

Uma das preocupações em se utilizar agentes químicos no controle e combate de florações de cianobactérias está no risco desses produtos causarem a lise celular e liberar as toxinas no meio (CHANG, 2011). Ao entender melhor o efeito desses químicos em nível celular, técnicas como a citometria de fluxo podem se tornar ferramentas eficientes no direcionamento da escolha da dosagem dos agentes químicos e do tempo de contato a ser adotado para o controle de florações em corpos d'água.

O uso da citometria de fluxo em estudos de ciências aquáticas tem se intensificado nos últimos 30 anos, com os primeiros trabalhos sendo publicados na década de 80 (DUBELAAR, 2000).

A avaliação da integridade da membrana celular pode ser considerada um indicador de funcionamento da célula, uma vez que se presume que as células com membranas intactas são capazes de reproduzir e realizar atividades metabólicas, a menos que seu DNA esteja danificado. Células com membrana danificada não podem manter ou gerar potencial de membrana e podem ser classificadas como mortas, uma vez que suas estruturas internas são livremente expostas ao meio. (MIKULA *et al.*, 2012).

A viabilidade das células e a integridade da membrana foram avaliadas após os processos de oxidação por meio de citometria de fluxo (DALY *et al.*, 2007; DING *et al.*, 2010; FAN *et al.*, 2013; FAN *et al.*, 2014). Quando se utiliza a citometria de fluxo, marcadores de ácidos nucleicos, tais como o corante SYTOX® Green (fluorescência verde) ou iodeto de propídio (fluorescência vermelha) são frequentemente adicionados a fim de permear através das paredes das células comprometidas conferindo às células danificadas ou não viáveis, fluorescência.

Na presença do reagente SYTOX® Green, é possível verificar a viabilidade celular através da avaliação da integridade da membrana celular, baseada na permeabilidade do corante à membrana. O corante SYTOX® Green possui alta afinidade ao ácido nucléico e penetra apenas nas membranas celulares danificadas, sendo incapaz de penetrar em células com membranas celulares intactas (MACHADO & SOARES, 2012). Esse corante tem sido bastante utilizado em estudos com cianobactérias e outros grupos do fitoplâncton. REGEL *et al.* (2004) investigou o efeito da turbulência em *M. aeruginosa*, DALY *et al.* (2007) e LIN *et al.*

(2009), o efeito da cloração em *M. aeruginosa* e *A. circinallis*, Mikula *et al.* (2012) o efeito do peróxido de hidrogênio em *M. aeruginosa*, FAN *et al.* (2014) avaliaram o efeito do sulfato de cobre, cloro, permanganato de potássio, peróxido de oxigênio e ozônio sobre a integridade celular de *M. aeruginosa*.

Outros estudos têm documentado qualitativamente a destruição física de várias cianobactérias após a oxidação usando microscopia eletrônica de varredura (SEM) (PLUMMER & EDZWALD, 2001; LIN *et al.*, 2009; MIAO & TAO, 2009; CHANG *et al.*, 2011; MA *et al.*, 2012; CORAL *et al.*, 2013). Apesar de eficaz, SEM capta apenas algumas células ou filamentos por imagem e a preparação da amostra é mais trabalhosa, requerendo tratamento de congelamento e secagem antes da análise (WERT *et al.*, 2013).

A citometria de fluxo, portanto, fornece um método rápido para obter informações qualitativas e quantitativas sobre os dados celulares e lise celular de cianobactérias e é uma ferramenta a ser explorada nos estudos de monitoramento de florações de microalgas e cianobactérias.

3. OBJETIVOS

O presente trabalho tem como objetivo principal verificar o efeito da pré-cloração, utilizando como agente oxidante o hipoclorito de sódio, sobre as células e toxinas de uma linhagem tóxica de *Microcystis aeruginosa* (LTPNA 08).

Objetivos específicos

- Avaliar o efeito da dose do oxidante e tempo de contato sobre a integridade celular de células de *M. aeruginosa* LTPNA 08, investigando alterações associadas à permeabilidade celular;
- Avaliar o efeito da dose do oxidante e tempo de contato sobre a liberação e degradação de microcistinas (LR e RR) produzidas pela linhagem *M. aeruginosa* LTPNA 08;
- Avaliar o efeito da dose do oxidante e tempo de contato sobre a degradação de clorofila-a e ficocianina.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Toxinas e Produtos Naturais de Algas do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas e no Laboratório de Saneamento “Professor Lucas Nogueira Garcez” do Departamento de Engenharia Hidráulica e Sanitária da Escola Politécnica, da Universidade São Paulo.

Ambos os locais são dotados de infra-estrutura física e instrumental adequados, onde foram realizadas as atividades experimentais e analíticas. O cultivo e as análises cromatográficas foram desenvolvidos no Laboratório de Laboratório de Toxinas e Produtos Naturais de Algas e os ensaios de oxidação, envolvendo ensaios de jarros, foram realizados no Laboratório de Saneamento “Professor Lucas Nogueira Garcez”.

4.1. Manutenção e Cultivo de Cianobactérias

O Laboratório de Toxinas e Produtos Naturais de Algas (LTPNA) mantém um banco de culturas de cianobactérias, do qual foi selecionada uma linhagem brasileira de *M. aeruginosa* (LTPNA 08), produtora de microcistinas MC-LR e MC-RR, isolada no reservatório de Salto Grande, Americana – SP (CARNEIRO *et al.*, 2012). A linhagem foi mantida em meio de cultura ASM-1 (GORHAN *et al.*, 1964), em condições assépticas, sob intensidade luminosa de $20\mu\text{mol fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, temperatura de $23 \pm 2^\circ\text{C}$, pH 8,0, sem aeração e fotoperíodo de 12 horas. A irradiância luminosa foi medida através de um sensor quântico (QSL-100, Box – Biospherical Instruments Inc.). O repique das culturas foi realizado a cada 20 dias.

A composição do meio de cultura ASM-1 está apresentada na Tabela 6. Para o preparo das soluções estoque, os sais foram pesados em uma balança analítica (Modelo MSU, Série Cubis, Sartorius) e dissolvidos em água ultrapura (Milli-Q®), em balões volumétricos, completando-se os respectivos volumes com água Milli-Q. As soluções estoque foram armazenadas em frascos schotts e mantidas sobre refrigeração em geladeira. Para cada litro de meio ASM-1, preparado em balão volumétrico (1L), foram adicionados 20, 2, 0,1 e 0,4mL das soluções A, B, C e D, respectivamente, completando-se o volume com água destilada. O pH do meio foi

ajustado para 8,0 com soluções de NaOH 1M e HCl 1M em um pHmetro modelo 827 (Metrohm ®).

Tabela 6: Composição do meio ASM-1 (Gorhan *et al.*, 1964).

Composição	Concentração (g/100mL)	Composição	Concentração (g/100mL)
<u>SOLUÇÃO A:</u>		<u>SOLUÇÃO C:</u>	
NaNO ₃	0,850	H ₃ BO ₃	2,48
MgSO ₄ . 7H ₂ O	0,245	MnCl ₂ . 4H ₂ O	1,39
MgCL ₂ . 6H ₂ O	0,205	FeCl ₃ . 6H ₂ O	1,08
CaCl ₂ . 2H ₂ O	0,145	ZnCl ₂	0,335
		CoCl ₂ . 2H ₂ O	0,0019
		ou CoCl ₂ .6H ₂ O	0,019
		CuCl ₂ . 2H ₂ O	0,0013
		ou CuCl ₂	0,0014
<u>SOLUÇÃO B:</u>		<u>SOLUÇÃO D:</u>	
KH ₂ PO ₄	0,68	Na ₂ EDTA	1,86
Na ₂ HPO ₄ . 12H ₂ O	1,79		
ou Na ₂ HPO ₄	0,71		

Fonte: Gorhan *et al.*, 1964

4.2. Avaliação do crescimento celular de *M. aeruginosa* LTPNA 08

O crescimento celular da linhagem de *M. aeruginosa* LTPNA 08 foi acompanhado a cada dois dias, por um período de 30 dias. As células, fixadas em solução de lugol imediatamente após a amostragem, foram contadas em hemocitômetro de Fuchs-Rosenthal, com o auxílio de um microscópio óptico estimando-se o número de células.mL⁻¹. A partir dos dados de contagem, foram estabelecidas as curvas de crescimento e calculadas as taxas de crescimento, pela aplicação da regressão exponencial aos dados da variação do número de células no tempo, de acordo com a Equação 1 (REYNOLDS, 2006):

$$N_t = N_0 \cdot e^{rn \cdot t}$$

Equação 1

$$rn = \ln(N_t / N_0) / t$$

Onde:

N_t = número de células no tempo t

N_0 = número inicial de células ($t=0$)

rn = taxa de crescimento

4.3. Ensaios de oxidação

Os ensaios de pré-oxidação com hipoclorito de sódio foram realizados com base nas metodologias de Daly *et al.*, 2007, Ma *et al.*, 2012 e Wert *et al.*, 2013.

4.3.1. Preparo do inóculo de *M.aeruginosa*

Para os testes de oxidação química, as culturas de *M.aeruginosa* foram mantidas em Erlenmeyers de 2000 mL contendo 1500 mL de meio ASM-1, por 30 dias, nas mesmas condições descritas no item 4.1. Cerca de 20mL das culturas a serem repicadas foram utilizadas como inóculo. O tempo de cultivo foi adotado com base no perfil de produção das cianotoxinas e na obtenção de uma cultura densa em células para a realização dos experimentos de cloração. As culturas foram centrifugadas a 7.000 rpm, 15°C, por 5 minutos e o sobrenadante descartado. O sedimento celular foi lavado 3 vezes e ressuspenso em água destilada para o subsequente uso nos testes de jarros, conforme metodologia adaptada de Ma *et al.*, 2012.

4.3.2. Preparo das soluções estoque de cloro

Foram preparadas soluções estoque de cloro a partir da diluição do reagente comercial hipoclorito de sódio (NaClO) de grau analítico 4-6% (Vetec®) em água destilada. Para cada dosagem testada, foi preparada uma solução estoque a fim de se inocular o mesmo volume de hipoclorito de sódio e obter as dosagens desejadas de cloro. A determinação do teor de cloro ativo no hipoclorito de sódio foi realizada

pelo método iodométrico, conforme descrito na seção 4500-Cl B do Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (APHA, 2005).

Para isso foi pipetado 1mL do reagente hipoclorito de sódio em um balão de 1000mL e completou-se o volume com água destilada. Foram transferidos 100 mL da solução diluída de hipoclorito diluído em erlenmeyer de 250mL, em triplicata. Em seguida, foram adicionados aos frascos 5mL de ácido acético concentrado (glacial) para ajustar o pH na faixa de 3 a 4 e, com uma espátula, aproximadamente 1g de iodeto de potássio (KI). Os frascos foram homogeneizados e mantidos no escuro por cerca de 6 minutos. Após esse tempo, foi iniciada a titulação com tiosulfato de sódio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) 0,025N, até as soluções apresentarem uma coloração amarelo palha. Foram adicionadas algumas gotas de solução indicadora de amido, conferindo coloração azulada à amostra, e prosseguiu-se com a titulação com $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 0,025N até o ponto final da reação, quando as soluções passaram a ser incolores. Os volumes gastos de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 0,025N foram anotados e utilizados no cálculo do teor de cloro ativo, de acordo com a Equação 2.

$$mg \frac{\text{Cl}_2}{L} = \frac{V_{\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3} \cdot N_{\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3} \cdot 35450}{Vol.amostra} \quad \text{Equação 2}$$

Onde:

$V_{\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3}$ = volume gasto de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ para titular a amostra

$N_{\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3}$ = normalidade do $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$

4.3.3. Preparo da água de estudo

A água de estudo foi preparada com água destilada (2L) acrescida de 4mL da solução B do meio ASM-1 ($\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$), conforme metodologia de Wert *et al.*, 2013. Em seguida, ajustou-se o pH para 6,0 com soluções de NaOH 1M e HCl 1M e acrescentou-se as células de *M.aeruginosa* (LTPNA 08). Foi realizada primeiramente a contagem das células previamente lavadas e a partir dela calculou-se o volume de inóculo necessário para se iniciar os experimentos, visando entre 1×10^6 células por mL de água de estudo.

4.3.4. Teste de jarros

Os ensaios de oxidação foram realizados em temperatura ambiente, em equipamento de teste de jarros, composto por 6 jarros com capacidade de 2L e um dispositivo de agitação com hastes, palhetas e controle elétrico de velocidade (Nova Ética)

Os ensaios foram conduzidos utilizando-se cloro, na forma de NaClO, em concentrações finais de 0,5, 1,5, 2, 2,5 e 3 mg.L⁻¹ (ppm) de cloro, com tempos de contato de 0, 15, 30 e 60 minutos. Para cada dosagem testada, foram realizadas 5 replicatas e um tratamento controle (sem adição do oxidante).

Os jarros contendo 2 litros de água acrescidos 1x10⁶ células.mL⁻¹ de células de cianobactérias foram mantidos sob agitação de 100 rpm durante todo o ensaio. Após a adição do cloro e decorridos os tempos de contato, alíquotas de 200mL foram coletadas de cada jarro. Dessas, 2mL foram separados para a contagem celular, 50mL para a determinação de cloro residual livre e total, e ao volume restante foram adicionados 2mL de Na₂S₂O₃ 1M, para cessar a ação do cloro. As amostras contendo Na₂S₂O₃ foram destinadas à análise de turbidez, cor aparente, pigmentos fotossintéticos e microcistinas.

4.3.5. Parâmetros analisados

4.3.5.1. Turbidez

A turbidez foi determinada através de um turbidímetro de bancada modelo 2100N (Hach Co., Colorado, EUA) e os valores dados em termos de unidades de turbidez (NTU – Nephelometric Turbidity Unit), conforme metodologia descrita na seção 2130 B do Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (APHA, 2005).

4.3.5.2. Cor Aparente

As medidas de cor aparente foram realizadas em um espectrofotômetro modelo DR-2010 (Hach Co., Colorado, EUA) através da conversão dos valores de absorção em λ 455 nm em mg Pt-Co.L⁻¹, conforme metodologia descrita na seção

2120 C do Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (APHA, 2005).

4.3.5.3. Cloro Residual Livre

Alíquotas de 50 mL foram separadas para a análise de cloro residual livre (mg.L^{-1}) pelo método DPD Colorimétrico, conforme descrito na seção 4500-Cl G do Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (APHA, 2005). Foram utilizados sachês individuais de reagente DPD em pó (Hach Co., Colorado, EUA) e as leituras foram realizadas em um espectrofotômetro (DR-2010 HACH®), em comprimento de onda de 530nm.

4.3.5.4. Contagem Celular

Para avaliar o efeito do hipoclorito de sódio sobre as células de *M.aeruginosa*, foram coletadas alíquotas de 2 mL antes da adição do oxidante e nos tempos de contato de 0, 15, 30 e 60 minutos. As células foram fixadas com solução de lugol imediatamente após a amostragem e contadas em hemocitômetro de Fuchs-Rosenthal com o auxílio de um microscópio ótico em aumento de 40x (Primo Star, Zeiss, Alemanha), estimando-se o número de células. mL^{-1} .

4.3.5.5. Pigmento fotossintético (Clorofila-a)

Alíquotas de 15 mL contendo $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ coletadas nos tempos de contato de 0, 15, 30 e 60 minutos foram filtradas em filtros de borosilicato (AP-20 – 13mm diâmetro – Millipore). Os filtros foram cuidadosamente armazenados em eppendorfs âmbar e mantidos em freezer -20°C até o momento de serem analisados. A extração de clorofila-a foi feita com a adição 1500 μL de acetona 90% sobre os filtros, seguida de agitação no vortex. As amostras foram mantidas em banho de ultrassom em 2 ciclos de 10 minutos, com intervalos de 10 minutos no freezer, e posteriormente centrifugadas a 15.000 g, 4°C , durante 15 minutos. Ao abrigo da luz, 500 μL dos sobrenadantes foram cuidadosamente recolhidos e transferidos para vials âmbar de 2mL para subsequente análise cromatográfica.

A análise de clorofila-a foi realizada por HPLC-DAD (Shimadzu, Kyoto, Japão), seguindo o protocolo de Jodlowska & Latala (2003). A separação cromatográfica foi realizada em uma coluna Luna 5 μm C18(2) 100 A, 250 x 3,0 mm (Phenomenex, EUA), conforme gradiente apresentado na Tabela 7. A fase móvel

utilizada consistiu em: A) acetato de amônio 0,5M:metanol (20:80) e B) acetona:metanol (20:80), a uma vazão de 0,6mL/min.

Tabela 7: Gradiente utilizado para a análise de clorofila-a por HPLC-DAD.

Coluna: Luna 5µm C18(2) 100 A, 250 x 3,0 mm (Phenomenex, EUA)		
Tempo (min)	Eluente A (%)	Eluente B (%)
0,01	40	60
1	40	60
10	20	80
20	20	80
22	0	100
32	0	100
35	40	60
50	40	60

A clorofila-a foi identificada pelo espectro de absorção em 665nm e pela comparação do tempo de retenção com padrão analítico. A quantificação foi realizada pela integração dos picos cromatográficos e as áreas integradas utilizadas no cálculo da concentração através da curva de calibração construída com padrão analítico de clorofila-a (Sigma-Aldrich).

4.3.5.6. Microcistinas

Para avaliar o efeito do NaClO sobre as microcistinas, foram coletadas alíquotas de 100 mL de cada jarro nos tempos de contato de 0, 15, 30 e 60 minutos. Essas alíquotas foram submetidas à filtração em pré-filtros de fibra de vidro de 47 mm de diâmetro (Sartorius, Alemanha), com o auxílio de um sistema de filtração a vácuo. Os filtros foram dobrados ao meio duas vezes e armazenados em tubos Falcon de 15 mL envoltos em papel alumínio, e o líquido filtrado foi armazenado em tubos Falcon de 50 mL. Ambos foram mantidos em freezer a -20°C até o momento da análise. O material retido no filtro foi analisado como fração intracelular (fração particulada) e o líquido filtrado como fração extracelular (fração dissolvida) para determinação das microcistinas, seguindo as metodologias de Nicholson *et al.*, 1994 e Lawton *et al.*, 1994.

Para a análise, os filtros foram picotados, transferidos para tubos Falcon de 15 mL e a eles acrescidos 3 mL de metanol 70%. Em seguida, os tubos contendo os filtros foram imersos em gelo e submetidos à probe de ultrassom (Omni Sonic Ruptor 400 Ultrasonic Homogenizer - OMNI International, EUA), a uma intensidade de 30% durante 1 minuto, para lise celular. As amostras foram centrifugadas a 11.000 rpm, 15°C, por 15 minutos e o sobrenadante retirado. Após 3 ciclos de repetições da extração, os sobrenadantes coletados foram secados sob nitrogênio e o extrato ressuspenso em 1mL de metanol 70% e, por fim, filtrado em membranas de PVDF de 0,45 µm (Millipore, EUA) para a análise cromatográfica. O líquido filtrado foi submetido à extração em fase sólida (SPE), utilizando cartuchos de extração em fase sólida C18 Sep-Pak Vac 6cc, 500mg (Waters, EUA), para a concentração das cianotoxinas de interesse, conforme metodologia descrita por Kim *et al.*, (2009). Os cartuchos foram previamente condicionados com 10 mL de metanol grau HPLC, seguido de 10 mL de água Milli-Q. O líquido filtrado (100 mL) foi aplicado aos cartuchos, os quais foram, posteriormente, lavados com 10 mL de água Milli-Q, 10 mL de metanol 20% e 10 mL de metanol 80%. O eluato da última lavagem com metanol 80% foi coletado em tubos de ensaio de vidro e secado sob nitrogênio e a uma temperatura de 35°C. O material seco foi ressuspendido em 1 mL de metanol 70% e em seguida filtrado em membrana de PVDF de 0,45 µm (Millipore, EUA), com o auxílio de uma seringa de 1 mL para a análise cromatográfica.

As amostras foram analisadas e quantificadas em sistema cromatográfico Agilent 1260 Infinity acoplado a espectrômetro de massas do tipo triplo quadrupolo (6460 Triple Quad LC/MS, Agilent Technologies, EUA), com ionização por electrospray (ESI), em modo positivo a 3500V. Foi utilizado o nitrogênio como gás nebulizador (45 psi) e gás secante (5 mL/min a 300°C). A separação dos compostos foi promovida em uma coluna Synergi 4µ Fusion-RP 80A (150 x 2,0 mm, 4µm; Phenomenex, EUA), sob gradiente linear (Tabela 8). A fase móvel consistiu em A) água e B) acetonitrila:água (90:10), ambos contendo 2mM de formiato de amônio e 0,1% de ácido fórmico, a uma vazão de 0,25 mL/min. O volume de injeção utilizado para a análise de microcistinas nas amostras foi de 5µL.

Tabela 8: Gradiente utilizado para a análise de MC-LR e RR por LC-MS/MS.

Coluna: Synergi 4 μ Fusion-RP 80A (150 x 2,0 mm, 4 μ m; Phenomenex, EUA)		
Tempo (min)	Eluente A (%)	Eluente B (%)
0	65	35
10	50	50
11	0	100
13	0	100
14	65	35
20	65	35

O espectrômetro foi operado no modo MRM – Monitoramento de Reações Múltiplas, monitorando-se as transições iônicas de m/z 995,5 > m/z 135; 995,5 > 213; 519,9 > 135 e 519,9 > 213. As transições de m/z 995,5 > 135 e 519,9 > 135 foram utilizadas para quantificar MC-LR e MC-RR, respectivamente. Enquanto que as transições m/z 995,5 > 213 e 519,9 > 213 foram utilizadas como confirmação do analito (Tabela 9). Microcistinas foram identificadas pela comparação entre os tempos de retenção com padrões analíticos e quantificadas pela integração das áreas dos picos cromatográficos usando curvas de calibração construídas com padrões analíticos de MC-RR e MC-LR (Abraxis, EUA). A identificação da MC-RR de massa molar de 1036 Da, foi feita através do monitoramento do íon precursor de m/z 519,9 que dá origem aos íons produtos de m/z 135 e 213. O íon de m/z 519,9 refere-se ao íon $[M+2H]^{2+}$ deste composto, que possui dois resíduos de arginina em sua estrutura, conferindo a dupla carga. Já para a MC-LR de massa molar 995 Da, o monitoramento foi realizado para o íon precursor $[M + H]^+$ de m/z 995,5, que corresponde à molécula protonada, que também produz fragmentos de m/z 135 e m/z 213. Esses fragmentos foram selecionados para a implementação o método qualitativo para as microcistinas. O íon fragmento característico de m/z 135 observado nas duas variantes de microcistinas origina-se pela clivagem alfa da cadeia lateral do resíduo Adda e fornece uma ferramenta de diagnóstico muito útil para a identificação de microcistinas no ambiente, diferenciando-as de outros compostos interferentes (YUAN *et al.*, 1999; MCELHINEY & LAWTON, 2005).

Tabela 9: Parâmetros otimizados para as transições monitoradas (m/z 135 e 213) no modo MRM.

Composto	Íon Precursor (m/z)	Íon Produto (m/z)	Fragmento	Energia de Colisão (CE) (eV)
MC-LR	995,5	135	120	70
MC-LR	995,5	213	120	80
MC-RR	519,9	135	100	20
MC-RR	519,9	213	100	60

4.3.5.7. Viabilidade celular

O efeito do agente oxidante sobre a permeabilidade celular da linhagem LTPNA 08 foi testado com diferentes concentrações de cloro, na forma de NaClO, em diferentes tempos de contato. A viabilidade celular foi avaliada através da verificação da integridade da membrana celular por citometria de fluxo, em um citômetro de fluxo modelo FACS CANTO™ II (Becton Dickinson, USA) integrado ao software de aquisição BD FACSDiva™, utilizando um marcador denominado SYTOX® Green (Invitron, USA), conforme metodologia descrita por Regel *et al.*, (2004) e Daly *et al.*, (2007). Este corante apresenta alta afinidade ao ácido nucléico e penetra apenas nas membranas celulares danificadas, emitindo uma fluorescência verde quando excitada a fontes de 450-490nm. Os canais de leitura FITC, PerCP, APC e PE foram utilizados para detectar células marcadas com SYTOX e as autofluorescências de clorofila, ficocianina e ficoeritrina nas células, respectivamente.

Para o experimento de viabilidade celular, primeiramente, foi realizada a determinação do teor de cloro da solução comercial de NaClO pelo método iodométrico, conforme descrito no item 4.3.2. A partir dessa solução, foram preparadas soluções estoque de concentrações conhecidas (16, 8, 5, 4, 3, 2, 1 e 0.1 mg/L), através da diluição em água destilada, de modo que se obtivesse concentrações finais de 8, 4, 2.5, 2, 1.5, 1, 0.5 e 0.05 mg/L de cloro, respectivamente. Em tubos de polipropileno de fundo redondo de 5 mL foram pipetados 1mL da cultura de *M. aruginosa* LTPNA 08 (cultura previamente contata),

visando uma concentração final de $3,5 \times 10^6$ células/mL, e 1mL das respectivas soluções estoque de NaClO. Os tubos foram homogeneizados e mantidos no escuro com tempo de contato de 0, 15, 30 e 60 minutos. Após o tempo de contato, os tubos foram centrifugados a 4000 rpm por 10 minutos e o sobrenadante descartado. Todos os tratamentos foram realizados em triplicata.

Uma solução estoque de SYTOX® Green (5 mM) preparada em dimetilsulfóxido (DMSO) e armazenada em freezer a -20°C , foi utilizada para o preparo de uma solução intermediária de 50 μM em PBS tampão fosfato-salino (PBS) pH 7,2 diluído 10x em água Milli-Q. A partir dessa solução intermediária, foi preparada uma solução de SYTOX em PBS com concentração de 0,1 μM . 300 μL de SYTOX 0,1 μM foram adicionados à triplicata de tubos contendo o pellet de células tratadas com NaClO e ao tubo contendo células não tratadas. Aos tubos contendo células tratadas com dosagens variadas de NaClO, mas sem marcação, foram adicionados 300 μL de PBS. Os tubos contendo células tratadas sem marcação, os tubos contendo células não tratadas com marcação e o tubo contendo apenas células, foram utilizadas como controles. Após a adição do SYTOX e do PBS, as amostras foram homogeneizadas e incubadas em ambiente escuro por cerca de 7 minutos, antes de serem analisadas no citômetro de fluxo. A montagem do experimento, esquematizada na Figura 8, mostra o tratamento em triplicata e os controles utilizados no experimento.

As leituras das amostras foram realizadas nos seguintes canais (Tabela 10):

Tabela 10: Canais de leitura dos fluorocromos analisados e seus respectivos comprimentos de onda de excitação e emissão.

Laser/Canal	Pigmento	λ excitação	λ emissão
Azul / PERC-P	Clorofila <i>a</i>	448	670
Azul / PE	Ficoeritrina	448	585
Azul / FITC	SYTOX® Green	448	530
Vermelho / APC	Ficocianina	633	660

Figura 6: Fluxograma de execução do experimento de viabilidade celular, avaliado por citometria de fluxo, testando diferentes concentrações de Cl_2 e tempos de contato.

M.aeruginosa

Durante a aquisição e análise das amostras em citômetro de fluxo, foram definidas as regiões de interesse (*gates*) para selecionar as populações celulares de interesse e determinar a intensidade de fluorescência somente das células situadas nesta região. Ao delimitar os *gates* foi possível definir células positivas e negativas para a fluorescência de cada fluorocromo analisado. Intensidades de fluorescência acima de 10^2 foram consideradas positivas e abaixo dela negativas.

A aquisição dos dados foi realizada até completar um total de 100.000 eventos gravados, utilizando o software de aquisição FACS DIVA e as análises dos dados foi realizada pelo software de análise FlowJo.

As amostras foram analisadas em gráficos bidimensionais da intensidade de fluorescência (Figura 7), em que os quadrantes Q1 e Q2, no eixo y, representam células positivas para clorofila (PerCP) e ficocianina (APC), e os quadrantes Q3 e Q4 representam células com baixa intensidade de fluorescência para esses pigmentos. No eixo x, os quadrantes Q1 e Q3 representam as células não marcadas com o SYTOX e os quadrantes Q2 e Q4 representam as células marcadas com o corante, ou seja, células que tiveram sua membrana celular danificada.

Figura 7: Representação de gráfico bidimensional da intensidade de fluorescência

4.7. Análise estatística

Os dados estão expressos como a média $\pm$ desvio padrão (DP). A análise estatística foi realizada no software Minitab® v17. Foi utilizado o teste ANOVA para a análise de variância com um fator, seguido do teste de Tukey para as comparações que assumem variâncias iguais. Todos os testes foram realizados com intervalo de confiança de 95% ($p < 0,05$).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Avaliação do crescimento celular e perfil de produção de cianotoxinas produzidas por *M. aeruginosa* (LTPNA 08)

A Figura 8 ilustra a curva de crescimento de *M.aeruginosa* (LTPNA 08) em meio de cultura ASM-1. Considerou-se taxa de crescimento total a taxa obtida pela equação da regressão aplicada a todos os dados. Assim, a partir da análise da equação, observou-se uma taxa de crescimento total de 0,1259, depois de 30 dias de cultivo.

Figura 8: Curva de crescimento da linhagem *Microcystis aeruginosa* (LTPNA 08) em meio ASM-1, no período de 30 dias. As barras de erro indicam o desvio padrão das médias (n=3).

Amostragens para a análise de MC-LR e MC-RR foram realizadas nos tempos 8, 16, 24 e 30 dias de cultivo para avaliar o perfil de produção dessas cianotoxinas no período de 30 dias. Microcistinas foram identificadas pela comparação entre os tempos de retenção com padrões analíticos e quantificadas

pela integração das áreas dos picos cromatográficos usando curvas de calibração construídas com padrões analíticos de MC-RR e MC-LR (Figura 9).

Figura 9: Curvas de calibração construídas para quantificação das microcistinas LR e RR. (A) Curva de calibração da MC-LR. (B) Curva de calibração da MC-RR.

O perfil de produção das variantes de microcistinas LR e RR, produzidas pela linhagem LTPNA 08, pode ser visualizado na Figura 10.

Figura 10: Perfil de produção das microcistinas LR e RR ao longo de 30 dias de cultivo. As barras de erro indicam o desvio padrão das médias (n=3).

Observou-se o aumento da produção de microcistinas ao longo do tempo amostral, com a maior produção aos 30 dias de cultivo. Verificou-se também a maior produção da variante RR em relação à MC-LR.

Em culturas de *Microcystis*, os níveis de microcistinas intracelulares se concentram no final da fase exponencial de crescimento e começam a decair gradualmente durante a fase estacionária quando a liberação de toxinas extracelulares se torna mais dominante (WERT *et al.*, 2014).

5.2. Ensaio de Cloração com Cultivos Laboratoriais de *M. aeruginosa*

5.4.1. Decaimento do cloro

Alíquotas foram coletadas em cada tempo de contato pré-determinado e o residual de cloro livre foi medido. Curvas de decaimento foram construídas a partir dos valores de residuais de cloro obtidos para cada dose (Figura 11).

Figura 11: Medidas de cloro residual livre após 60 minutos de exposição ao oxidante em concentrações de 0,5, 1, 1,5, 2, 2,5 e 3 mg.L⁻¹ Cl₂.

Como mostra a Figura 11, o cloro livre é rapidamente consumido nos primeiros 15 minutos de contato, seguido de uma redução mais gradual ao longo da exposição. Nota-se que ao final de 60 minutos, praticamente todo o cloro foi consumido para as doses aplicadas de 0,5, 1,5 e 2 mg Cl₂.L⁻¹. Contudo, com a aplicação de doses mais altas (2,5 e 3 mg Cl₂.L⁻¹) foram observados residuais de cloro livre acima de 0,5 mg.L⁻¹ ao final de 30 minutos. O rápido consumo de cloro nos primeiros minutos de exposição pode ser atribuído à elevada concentração de compostos cromóforos presentes no material orgânico natural, os quais são altamente reativos com o cloro livre (DALY *et al.*, 2004; MA *et al.*, 2012). Neste caso, o alvo primário do oxidante foram as células de *M. aeruginosa* LTPNA 08.

Em relação ao decaimento do cloro, tendências similares foram encontradas em trabalhos como de Daly *et al.*, 2007, Lin *et al.*, 2009, Zamyadi *et al.*, 2010 e Ma *et al.*, 2012, ao utilizarem linhagens de *M.aeruginosa* e *A. circinalis*. Ao analisarem mais pontos nos tempos iniciais, verificaram que o cloro é rapidamente consumido logo nos primeiros minutos de contato com o oxidante. Fan *et al.* (2013) verificaram o rápido decaimento das concentrações de cloro logo no primeiro minuto de contato, seguido de um decaimento mais gradual ao longo do tempo restante, com doses iniciais de cloro de 3, 4 e 5 mg.L⁻¹. Com 30 minutos de contato, verificou-se um residual de cloro de 0,1 e 1 mg.L⁻¹ para as doses de 4 e 5 mg Cl₂.L⁻¹, respectivamente, mas nenhum residual foi verificado para a dose de 3 mg Cl₂.L⁻¹. Ao final de 60 minutos de exposição, foi verificado a presença de um residual de cloro livre de 0,2 mg.L⁻¹ apenas para a dose de 5 mg Cl₂.L⁻¹, com total consumo do cloro para as demais doses. Os experimentos de oxidação de Fan *et al.* (2013) foram conduzidos com suspensão de células de *M. aeruginosa* em meio ASM-1 contendo densidade celular de 7×10^5 células.mL⁻¹ e pH de 7,5. Sabe-se que a eficiência da cloração é determinada pelo pH da água, através da distribuição das espécies de HOCl e ClO⁻. Em valores de pH abaixo da neutralidade, a espécie predominante é o HClO, e por ser a espécie mais reativa, garante maior eficiência de oxidação. Em valores de pH mais elevados, por outro lado, há predominância da espécie menos reativa ClO⁻, e portanto, menor eficiência de oxidação é esperada. Em comparação com os resultados obtidos no presente trabalho, Fan *et al.* (2013) tiveram que aplicar doses maiores do oxidante para atingir resultados aproximados. Essa demanda maior de cloro pode ser explicada pelos diferentes valores de pH adotados nos dois trabalhos.

Segundo Nicholson *et al.*, (1994), a manutenção de um residual mínimo de cloro de 0,5 mg.L⁻¹ por 30 minutos em pH < 8 é suficiente para a completa degradação das toxinas. Essa recomendação parece ser válida para o presente estudo, uma vez que, nas condições testadas, apenas as doses que apresentaram um residual de cloro maior que 0,5 mg.L⁻¹ apresentaram remoções acima de 90%. Em vista disso, o ministério da saúde estabelece, por meio da Portaria MS nº 2914/2011 que após a desinfecção, a água fornecida para consumo humano contenha um teor mínimo de cloro residual livre de 0,5 mg.L⁻¹, sendo obrigatória a

manutenção de, no mínimo, 0,2 mg.L⁻¹ de cloro residual livre ou 2 mg/L de cloro residual combinado em toda a extensão do sistema de distribuição.

Para garantir a eficiência da cloração, a concentração de cloro aplicada e o tempo no qual as células e/ou toxinas são expostas ao oxidante são parâmetros importantes a serem considerados. O grau apropriado de oxidação é obtido através do cálculo de CT (concentração x tempo), obtido pela determinação da área sob o gráfico de concentração de cloro em relação ao tempo, através da integração numérica usando o método trapezoidal, conforme a Equação 3:

$$CT = \int_0^t [Cl]_t dt = \frac{C_0}{k} (e^{kt} - 1) \quad \text{Equação 3}$$

Onde:

[Cl]_t = residual de cloro no tempo de contato específico (mg.L⁻¹)

C₀ = concentração de cloro residual inicial

t = tempo de contato (min)

k = constante de decaimento de primeira ordem (min⁻¹)

As constantes de velocidade de primeira ordem (k_{Cl₂}) para o decaimento de cloro foram determinadas pela Equação 4:

$$\ln \frac{[Cl]_t}{[Cl]_0} = -k_{Cl_2} t \quad \text{Equação 4}$$

Onde:

[Cl]_t = concentração de cloro residual livre no tempo de contato específico t

[Cl]₀ = concentração de cloro livre no tempo de contato = 0

k_{Cl₂} = constante de decaimento de primeira ordem

t = tempo de contato

O modelo de decaimento do cloro se ajustou a todas as curvas de decaimento da Figura 11 e todos os coeficientes de correlação (R²) excederam valores de 0,86.

Os valores de CT e as constantes de decaimento de primeira ordem estão discriminados na Tabela 11.

Tabela 11: Valores de CT e as constantes de primeira ordem obtidos nos ensaios de decaimento de Cl_2 para as células de *M. aeruginosa* LTPNA 08, considerando as diferentes doses aplicadas.

<i>M. aeruginosa</i> – pH 6,0 – 1×10^6 células.mL⁻¹					
Tempo (min)	0,5 mg Cl_2 .L ⁻¹	1,5 mg Cl_2 .L ⁻¹	2,0 mg Cl_2 .L ⁻¹	2,5 mg Cl_2 .L ⁻¹	3,0 mg Cl_2 .L ⁻¹
0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
15	4,10	15,84	17,96	30,16	34,58
30	6,50	27,30	28,46	56,62	64,22
60	10,05	40,66	41,98	103,12	104,42
<hr/>					
k (s ⁻¹)	$8,09 \times 10^{-4}$	$5,26 \times 10^{-4}$	$6,61 \times 10^{-4}$	$2,23 \times 10^{-4}$	$2,70 \times 10^{-4}$
R ²	(0,90)	(0,97)	(0,99)	(0,86)	(0,98)

5.4.2. Efeito da pré-cloração sobre as células de *M. aeruginosa*

A densidade celular de *M. aeruginosa* LTPNA 08 foi acompanhada por contagem celular por microscopia óptica ao longo da exposição a diferentes doses do oxidante (Figura 12).

Figura 12: Variação do número de células de *M. aeruginosa* LTPNA 08 ao longo do tempo de exposição a diferentes doses de cloro. As barras de erro indicam o desvio padrão das médias (n=5).

As células coradas com solução de lugol não apresentaram alterações morfológicas evidentes de lise ou morte celular, o que dificultou a verificação do efeito do oxidante sobre as células por microscopia óptica. Como mostra a figura 12, o número de células contadas antes e após a exposição a diferentes doses do oxidante foram estatisticamente iguais ($p > 0,05$).

Resultados semelhantes por microscopia eletrônica de varredura (Scanning Electron Microscopy - SEM) foram encontrados por MA *et al.* (2012). Os experimentos foram conduzidos em água destilada contendo células de *M. aeruginosa* em densidade celular de $2,2 \times 10^6$ células.mL⁻¹ e com aplicação de doses de cloro de 0,8, 1,2, 1,6 e 2 mg.L⁻¹. As imagens de SEM apresentaram uma limitada extensão da lise celular ou distorção da membrana celular após a cloração. Para a

maioria das células, nenhuma alteração morfológica evidente foi observada mesmo após a exposição a uma dose de cloro de 2 mg.L^{-1} por 120 minutos. LIN *et al.* (2009) também avaliaram o efeito do cloro sobre as células de *M. aeruginosa* e verificaram diferentes níveis de alterações morfológicas. Em uma dose de cloro de 1 mg.L^{-1} e curto tempo de contato (1min), foram observadas pequenas deformações e a presença de filamentos na superfície celular que sugerem a liberação de material intracelular. Após 30 minutos de exposição a $2 \text{ mg Cl}_2.\text{L}^{-1}$, as células apresentaram-se menores e com aspecto rugoso. Doses mais altas de cloro (6 mg.L^{-1}) foram aplicadas em água bruta (Reservatório Tai-Hu – Taiwan) contendo células de *M. aeruginosa* em densidades celulares diferentes. A integridade celular foi avaliada por citometria de fluxo e verificou-se que em densidade celular de $1,3 \times 10^5 \text{ células.mL}^{-1}$, aproximadamente 100% das células sofreram danos pela cloração e em densidade celular de $4,4 \times 10^5 \text{ células.mL}^{-1}$ cerca de 52% das células foram comprometidas. Embora as imagens de SEM tenham mostrado alterações na morfologia celular e uma pequena porção das células tenha sofrido lise com completa desintegração celular (redução de 10% do número total de células), as células permaneceram detectáveis nas análises por citometria de fluxo. Ambos os autores sugerem que o cloro é capaz de promover danos à célula, mas sem atingir a extensão da completa desintegração (MA *et al.*, 2012; LIN *et al.*, 2009).

Para avaliar a extensão dos danos causados pela pré-cloração sobre as células de *M. aeruginosa* LTPNA 08, a concentração de clorofila-a também foi acompanhada ao longo da exposição ao oxidante.

O cromatograma e o espectro de absorção do padrão analítico de clorofila-a obtidos por HPLC-DAD em 665nm estão representados na Figura 13. A curva de calibração construída a partir do padrão analítico de clorofila-a e utilizada na análise das amostras apresentou um valor de R^2 de 0,9997 (Figura 14).

Figura 13: Cromatograma representativo do padrão analítico de clorofila-a (A) e espectro de absorção da clorofila-a (B) obtido por HPLC-DAD em 665nm.

Figura 14: Curva de calibração da clorofila-a obtida por HPLC-DAD em 665nm.

A variação da concentração de clorofila-a ao longo da exposição de 60 minutos ao oxidante está representada na Figura 15.

Figura 15: Variação da concentração de clorofila-a ao longo da exposição de 60 minutos ao oxidante em concentrações de 0,5, 1,5, 2, 2,5 e 3 mg $\text{Cl}_2\cdot\text{L}^{-1}$. As barras de erro indicam o desvio padrão das médias (n=5).

Observa-se uma rápida redução da clorofila-a nos primeiros 15 minutos de exposição, seguida de uma redução mais gradual, com a completa degradação do pigmento após 60 minutos de contato para as doses de 2,5 e 3 mg.L⁻¹. Remoções de até 73% foram verificadas para a exposição à menor dose do oxidante (0,5 mg.L⁻¹). Valores de CT acima de 40,66 mg.min.L⁻¹ foram necessários para atingir a quase completa degradação da clorofila-a (>97%). A degradação da clorofila-a durante a cloração indica que o cloro é capaz de causar danos às células de *M. aeruginosa*, levando à perda de permeabilidade da membrana, e reagir com o pigmento sem promover a fragmentação completa da membrana celular, uma vez que as células permaneceram detectáveis nas análises e o número de células manteve-se constante ao longo do tratamento. Segundo Maillard (2002), o rompimento da membrana citoplasmática pode ocorrer sem que a parede celular seja rompida e promover mudanças na permeabilidade, induzindo a liberação dos componentes intracelulares, de forma que o oxidante possa ataca-los interna ou externamente à célula.

Resultados semelhantes foram encontrados na literatura, verificando-se a inativação das células de cianobactérias. Miao e Tao (2009) avaliaram o efeito do ozônio (1, 3 e 5 mg O₃.L⁻¹) sobre as células de *M. aeruginosa* e verificaram uma queda acentuada dos níveis de clorofila-a nos primeiros 10 minutos de contato, seguida de uma redução mais gradual, tendência similar ao encontrado no presente trabalho. Remoções de 75,3% e de até 91,2% de clorofila-a foram obtidas para doses de ozônio de 1 e 5 mg.L⁻¹, respectivamente, após 60 minutos de contato. Wert *et al.* (2013) monitoraram as concentrações de clorofila-a e fluorescência das células para avaliar os danos celulares causados pela oxidação por ozônio, cloro, cloramina e dióxido de cloro em 3 espécies diferentes de cianobactérias (*M. aeruginosa*, *Oscillatoria* sp. e *Lyngbya* sp.). Verificaram que as células de *M. aeruginosa* são mais susceptíveis à oxidação do que as células de *Oscillatoria* sp. e *Lyngbya* sp., e dentre os oxidantes utilizados, a cloramina apresentou menor poder de oxidação. As cianobactérias filamentosas *Oscillatoria* sp. e *Lyngbya* sp. se mostraram resistentes à cloraminação com redução mínima tanto nas concentrações de clorofila-a como na fluorescência da células.

5.4.3. Efeito da pré-cloração sobre a turbidez e cor da água de estudo

Parâmetros físicos corriqueiramente analisados em estações de tratamento de água, tais como cor e turbidez foram monitorados ao longo do tratamento para as diferentes doses de oxidante aplicadas. As Figuras 16 e 17 representam, respectivamente, a variação dos parâmetros de turbidez e cor aparente ao longo do tempo de exposição de 60 minutos ao oxidante.

Figura 16: Medidas de turbidez ao longo da exposição de 60 minutos ao oxidante em concentrações de 0,5, 1,5, 2, 2,5 e 3 mg $\text{Cl}_2\cdot\text{L}^{-1}$. As barras de erro indicam o desvio padrão das médias (n=5).

Figura 17: Medidas de cor aparente após 0, 15, 30 e 60 minutos de contato com o hipoclorito de sódio em concentrações de 0,5, 1,5, 2, 2,5 e 3 mg $\text{Cl}_2 \cdot \text{L}^{-1}$. As barras de erro indicam o desvio padrão das médias (n=5).

Com exceção da cor aparente na dose de 0,5 mg $\text{Cl}_2 \cdot \text{L}^{-1}$, observou-se redução dos valores de ambos os parâmetros analisados após 60 minutos de contato. A redução da turbidez foi verificada nos primeiros 15 minutos de contato e manteve-se constante pelo restante do tempo. Ao final de 60 minutos, os valores de turbidez mantiveram-se abaixo de 5 NTU para todas as doses testadas e os valores de cor ficaram abaixo de 75 mg Pt-Co. L^{-1} , exceto para a dose de 2 mg $\text{Cl}_2 \cdot \text{L}^{-1}$ que apresentou um valor de cor aparente acima de 100 mg Pt-Co. L^{-1} .

Registros fotográficos dos pré-filtros de fibra de vidro de 47 mm de diâmetro ao longo do tratamento mostram a alteração na coloração da amostra após a exposição ao agente oxidante (Figura 18). Houve alteração na coloração das amostras logo nos primeiros minutos de contato com o oxidante, com o clareamento das amostras no decorrer do tratamento, indicando a degradação dos pigmentos fotossintéticos. Nota-se que na menor dose de cloro, a mudança na coloração é menos pronunciada comparada com a das demais doses aplicadas. Essa observação foi condizente com os dados obtidos de clorofila-a (Figura 15), que mostraram a degradação do pigmento ao longo da exposição ao oxidante, com a

obtenção de maiores taxas de degradação quando aplicadas maiores doses do oxidante.

Figura 18: Alteração na coloração das amostras de suspensão de *M. aeruginosa* em função da dose de cloro e do tempo de contato.

5.4.4. Efeito da pré-cloração sobre a liberação e oxidação das microcistinas de *M. aeruginosa* LTPNA 08

A Figura 19 ilustra a variação da concentração de microcistinas (LR e RR) após exposição a diferentes doses de cloro. Como forma de avaliar o efeito do oxidante na liberação das cianotoxinas da célula e na sua subsequente degradação, foram quantificadas tanto a fração intracelular como a extracelular de microcistinas. Os experimentos foram conduzidos em água contendo aproximadamente 1×10^6 células.mL⁻¹ de *M. aeruginosa* LTPNA 08 e concentrações iniciais de microcistinas intracelulares na faixa entre 7,5 e 15,4 µg.L⁻¹. Os níveis extracelulares analisados se encontravam abaixo do limite de quantificação.

As concentrações de microcistinas do tratamento controle, sem adição do oxidante, também foram monitoradas ao longo dos 60 minutos e não foram observadas variações significativas, indicando que as células de *M. aeruginosa* LTPNA 08 não sofreram danos ao ponto de liberarem as toxinas no meio.

Figura 19: Variação da concentração de microcistinas intracelulares e extracelulares totais (MC-RR e MC-LR) ao longo da exposição a diferentes doses do oxidante. (A) 0,5 mg Cl₂.L⁻¹. (B) 1,5 mg Cl₂.L⁻¹. (C) 2 mg Cl₂.L⁻¹. (D) 2,5 mg Cl₂.L⁻¹. (E) 3 mg Cl₂.L⁻¹.

D. **E.**

Conforme a Figura 19 A, nos primeiros 15 minutos de exposição das células de cianobactérias a $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ do oxidante, houve rápido decaimento da concentração de toxinas intracelulares acompanhado pelo aumento dos níveis extracelulares, sugerindo que a toxina intracelular é liberada da célula danificada em uma velocidade maior do que é degradada. Nas doses de $1,5$ e $2 \text{ mg Cl}_2.\text{L}^{-1}$ também foram observadas quedas drásticas dos níveis intracelulares de MCs, com um pequeno aumento das concentrações extracelulares (Figuras 19 B e C). No entanto, em doses mais altas do oxidante (Figuras 19 D e E), embora tenham sido observadas rápidas reduções nas concentrações de toxinas intracelulares, não houve aumento nas concentrações de toxinas extracelulares, relatando valores abaixo dos limites de quantificação e detecção. Tal comportamento indica que o oxidante é capaz de degradar as toxinas a uma velocidade maior que a sua liberação, ou seja, a degradação das toxinas ocorre imediatamente após o contato com o oxidante e pode ocorrer inclusive no interior das células. A rápida liberação das toxinas corresponde à perda da integridade celular. Segundo Ma *et al.* (2012), a degradação menos pronunciada das microcistinas extracelulares nos tempos de contato mais prolongados pode ser atribuído à liberação de outros componentes intracelulares das cianobactérias que podem competir com as microcistinas frente à ação do cloro. Essa competição é também responsável pela menor velocidade de liberação das microcistinas intracelulares.

A eficiência de remoção das microcistinas, dada em percentagem (%), foi determinada através da Equação 5:

$$E\% = \frac{C_i - C_f}{C_i} * 100 \quad \text{Equação 5}$$

Onde,

C_i = Concentração inicial de microcistinas ($t=0$)

C_f = Concentração de microcistinas no tempo t

Ao final de 60 minutos, remoções de 70, 88, 92, 100 e 100% foram obtidos para as doses de 0,5, 1,5, 2, 2,5 e 3 mg $\text{Cl}_2\cdot\text{L}^{-1}$ e remoções de 16, 72, 79, 100 e 100% e de 24, 81, 88, 100 e 100% para os tempos de contato de 15 e 30 minutos, respectivamente. A aplicação de doses de 2,5 e 3 mg $\text{Cl}_2\cdot\text{L}^{-1}$ resultaram na completa remoção das microcistinas com 15 minutos de contato. O aumento da taxa de remoção de microcistinas foi proporcional ao aumento da dose do oxidante e do tempo de contato, no entanto, é possível obter altas taxas de remoções com menores tempos de contato se aplicado doses mais elevadas do oxidante. Em outras palavras, a eficiência de remoção das microcistinas é dependente do fator CT.

Ainda, ao final de 60 minutos, a concentração de microcistinas totais para todas as doses testadas, com exceção para a dose de 0,5 mg $\text{Cl}_2\cdot\text{L}^{-1}$, ficou abaixo do valor máximo permitido de 1,0 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, exigido pela WHO e pela Portaria MS nº 2914/2011 para a água de consumo. Valores de CT acima de 30,16 mg.min. L^{-1} foram necessários para atingir concentrações de microcistinas abaixo de 1,0 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$.

Taxas de remoções de microcistinas semelhantes foram encontradas na literatura. Ho *et al.* (2006) verificaram em seus estudos conduzidos em água tratada fortificada com aproximadamente 20 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de cada variante de microcistina (LR, RR, YR e LA), que a exposição a uma dose de cloro de 1,5 mg. L^{-1} por 30 minutos é suficiente para oxidar pelo menos 90% das microcistinas. Di Bernardo *et al.* (2007) relataram em seus estudos remoção de 96% de microcistinas em concentração inicial de cerca de 100 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, após 30 minutos de contato com 5 mg. L^{-1} Cl_2 . As microcistinas foram diluídas em água deionizada sem processo de purificação. Assim como Daly *et al.* (2007), Ma *et al.* (2012) verificaram nos primeiros minutos de exposição ao cloro, a rápida queda nos níveis intracelulares de MC-LR com o subsequente aumento das concentrações extracelulares. Após tempo de contato mais prolongado, verificou-se a degradação das microcistinas extracelulares.

Tanto a MC-LR quanto a –RR apresentaram reatividades semelhantes frente ao cloro. Esses resultados podem ser comparados com os de Acero *et al.*, 2005, que encontraram resultados semelhantes para MC-LR e MC-RR em pH neutro. De acordo com Acero *et al.*, 2005, é provável que o cloro ataque a dupla ligação conjugada do resíduo Adda das microcistinas. Uma vez que a porção Adda é o mesmo para as 2 toxinas investigadas, eles mostram susceptibilidade similar à

oxidação de cloro neste ponto. Ho *et al.* (2006), no entanto, verificou diferenças na reatividade entre as variantes de MCs avaliadas, seguindo a ordem de oxidação: MC-YR > MC-RR > MC-LR $\geq$ LA. A diferença na reatividade é explicada pelos diferentes aminoácidos presentes na molécula de MCs. Aminoácidos que apresentam ácidos alifáticos, tais como a leucina e alanina, são os menos reativos frente ao cloro. Os compostos que apresentam um grupo amino terminal, como por exemplo, a arginina, são mais reativos, e o aminoácido que apresenta maior reatividade ao cloro é a tirosina, devido ao seu anel aromático.

5.4.5. Efeito da pré-cloração sobre a viabilidade celular de *M. aeruginosa*

LTPNA 08

No estudo de viabilidade celular de *M. aeruginosa* LTPNA 08 por citometria de fluxo, foi possível avaliar os percentuais de permeabilidade celular e de pigmentos fotossintéticos presentes após exposição a doses de 0,05, 0,05, 1, 1,5, 2, 2,5, 4 e 8 mg Cl₂.L⁻¹ por 0, 15, 30 e 60 minutos. O emprego do marcador SYTOX® Green permitiu avaliar a extensão dos danos causados pelo oxidante nas células, através da leitura da intensidade de fluorescência do marcador.

A autofluorescência das células foi verificada nos canais de leitura de FITC, PerCP, APC e PE, que correspondem às leituras de SYTOX® Green, clorofila, ficocianina e ficoeritrina, respectivamente. Os histogramas e os respectivos valores de mediana de intensidade da fluorescência de cada um dos 4 canais estão representados na Figura 20.

Figura 20: Representação da autofluorescência das células de *M. aeruginosa* (LTPNA 08). Os histogramas representam a intensidade da fluorescência dos diferentes pigmentos, avaliando nos canais de leitura de FITC, APC, PE e PerCP, com seus respectivos valores de mediana. (A) SYTOX® Green (FITC). (B) Ficocianina (APC). (C) Ficoeritrina (PE). (D) Clorofila (PerCP).

Pela análise dos histogramas B,C e D e dos respectivos valores de mediana, foi possível verificar a baixa fluorescência de ficoeritrina (PE), em relação à clorofila (PerCP) e ficocianina (APC), pigmentos naturalmente presentes em cianobactérias. Já no histograma A, não foi detectada nenhuma fluorescência no canal de FITC, devido à ausência de marcação pelo SYTOX® Green. Em razão da baixa detecção de ficoeritrina no canal de PE, a apresentação dos resultados foi feita somente em valores percentuais de SYTOX® Green (FITC), clorofila (PerCP) e ficocianina (APC).

Como controles, foram avaliadas também células sem marcação (células tratadas com o oxidante, ressuspendidas em PBS, apenas) e células não expostas ao oxidante, porém marcadas com SYTOX. As últimas dão informações sobre a morte basal das células não expostas ao oxidante. Verificou-se para os tempos de contato de 0, 15, 30 e 60 minutos uma morte basal das células de 14 a 24%, conforme mostrado nos gráficos do tipo *countour plot* da Figura 21.

Figura 21: Gráficos do tipo contour plot mostrando os percentuais de morte basal das células de *M. aeruginosa* (LTPNA 08), através da marcação do SYTOX® Green e da autofluorescência dos pigmentos clorofila e ficocianina, após os tempos de contato de 0, 15, 30 e 60 minutos. (A) APCxFITC – 0 minutos; (B) APCxFITC – 15 minutos; (C) APCxFITC – 30 minutos; (D) APCxFITC – 60 minutos; (E) PerCPxFITC – 0 minutos; (F) PerCPxFITC – 15 minutos; (G) PerCPxFITC – 30 minutos; (H) PerCPxFITC – 60 minutos.

As Figuras 22 e 23 mostram a variação da fluorescência das células de *M. aeruginosa* (LTPNA 08) após o tempo de contato de 30 minutos com o agente oxidante em concentrações variando de 0,05 a 8 mg Cl₂.L⁻¹. Nas figuras, gráficos bidimensionais foram utilizados para mostrar a intensidade de fluorescência do marcador SYTOX® Green em relação aos pigmentos fotossintéticos clorofila e ficocianina.

Os gráficos de A a F, de ambas as figuras, mostram o deslocamento da população de células do quadrante Q1 (células intactas) para o Q2, onde se concentram as células marcadas com o SYTOX® Green, ou seja, células com a membrana danificada. No entanto, nota-se que os gráficos G e H das mesmas figuras, não apresentaram esse padrão de deslocamento, tendo suas células concentradas mais no quadrante Q3. Esse comportamento mostra que nas doses mais altas testadas não houve marcação celular pelo corante SYTOX® Green e também mostra uma redução na intensidade de fluorescência da clorofila (PerCP), o que indica a sua degradação. É bastante provável que nas doses de 4 e 8 mg Cl₂.L⁻¹ o efeito oxidativo foi mais pronunciado, não só danificando a membrana celular, mas causando a lise total das células, impossibilitando a permanência do corante em seu interior.

Esse perfil de deslocamento é similar ao encontrado por Chang *et al.* (2011), em estudos que avaliaram a integridade da membrana celular de *M. aeruginosa* e *Nitzschia palea* expostas à diferentes concentrações de β -cyclocitral por 8 horas. Ao testarem concentrações crescentes de β -cyclocitral (de 5 a 1000 mg.L⁻¹ para *M. aeruginosa* e de 0,05 a 1000 mg.L⁻¹ para *Nitzschia palea*) observaram o mesmo padrão de deslocamento da população de células do quadrante Q1 para o Q2 e por fim para os quadrantes inferiores Q3 e Q4 (baixa intensidade de fluorescência da clorofila-a). De acordo com os autores, o β -cyclocitral é capaz de romper as células, permitindo o corante SYTOX® Green se ligar aos ácidos nucleicos da célula. No entanto, em concentrações de β -cyclocitral acima de 200 mg.L⁻¹ para *M. aeruginosa* e de 50 mg.L⁻¹ para *Nitzschia palea* há indícios da degradação da clorofila-a e/ou destruição dos ácidos nucleicos impedindo a permanência do marcador na célula.

Fan *et al.*, (2014) verificaram que mais de 95% das células de *M.aeruginosa* perderam a integridade da membrana celular em contato com dosagens de Cl_2 variando de 3 a 5 mg.L^{-1} , em um intervalo de 5 minutos, com ocorrência da liberação de MCs com subsequente oxidação.

Figura 22: Gráficos do tipo contour plot mostrando a variação da intensidade de fluorescência das células de *M. aeruginosa* (LTPNA 08) marcadas com o SYTOX® Green em relação à fluorescência da clorofila, após o tempo de contato de 30 minutos com o agente oxidante em concentrações variando de 0,05 a 8 mg.L⁻¹ de Cl₂. (A) 0,05 mg.L⁻¹ de Cl₂. (B) 0,5 mg.L⁻¹ de Cl₂. (C) 1 mg.L⁻¹ de Cl₂. (D) 1,5 mg.L⁻¹ de Cl₂. (E) 2 mg.L⁻¹ de Cl₂. (F) 2,5 mg.L⁻¹ de Cl₂. (G) 4 mg.L⁻¹ de Cl₂. (H) 8 mg.L⁻¹ de Cl₂.

Figura 23: Gráficos do tipo countour plot mostrando a variação da intensidade de fluorescência das células de *M. aeruginosa* (LTPNA 08) marcadas com o SYTOX® Green em relação à fluorescência da ficocianina, após o tempo de contato de 30 minutos com o agente oxidante em concentrações variando de 0,05 a 8 mg.L⁻¹ de Cl₂. (A) 0,05 mg.L⁻¹ de Cl₂. (B) 0,5 mg.L⁻¹ de Cl₂. (C) 1 mg.L⁻¹ de Cl₂. (D) 1,5 mg.L⁻¹ de Cl₂. (E) 2 mg.L⁻¹ de Cl₂. (F) 2,5 mg.L⁻¹ de Cl₂. (G) 4 mg.L⁻¹ de Cl₂. (H) 8 mg.L⁻¹ de Cl₂.

Células tratadas não marcadas
30 min_0,05 mg.L⁻¹ Cl₂
Nº de eventos: 78524

Células tratadas com marcação
30 min_0,5 mg.L⁻¹ Cl₂
Nº de eventos: 71141

Células tratadas com marcação
30 min_1 mg.L⁻¹ Cl₂
Nº de eventos: 68423

Células tratadas com marcação
30 min_1,5 mg.L⁻¹ Cl₂
Nº de eventos: 67727

Células tratadas com marcação
30 min_2 mg.L⁻¹ Cl₂
Nº de eventos: 77524

Células tratadas com marcação
30 min_2,5 mg.L⁻¹ Cl₂
Nº de eventos: 70860

Células tratadas com marcação
30 min_4 mg.L⁻¹ Cl₂
Nº de eventos: 54984

Células tratadas com marcação
30 min_8 mg.L⁻¹ Cl₂
Nº de eventos: 71967

O percentual de clorofila-a e de ficocianina foram avaliados a partir da soma dos valores de Q1 e Q2 e o percentual de permeabilidade celular pela soma dos valores obtidos em Q2 e Q3. Estes valores foram plotados em gráficos em função da dose do oxidante e do tempo de contato. A Figura 24 representa os percentuais de clorofila-a e a Figura 25 os percentuais de ficocianina. Ambos os gráficos apresentam os percentuais de células que tiveram sua permeabilidade comprometida.

Figura 24: Gráfico representativo das percentagens de permeabilidade celular e de clorofila-a após exposição às diferentes concentrações de Cl_2 em tempos de contato de 0, 15, 30 e 60 minutos.

Figura 25: Gráfico representativo das percentagens de permeabilidade celular e de liberação da ficocianina para o meio extracelular após exposição às diferentes concentrações de Cl_2 em tempos de contato de 0, 15, 30 e 60 minutos.

Comparada com o controle (células não tratadas, marcadas com SYTOX), as células de *M. aeruginosa* LTPNA 08 expostas ao oxidante apresentaram maior percentual de permeabilidade celular. Esse aumento também foi verificado com o aumento da dose aplicada do oxidante, com exceção para a menor dose de oxidante utilizada de 0,05 mg.L^{-1} ($p > 0,05$), indicando que a dose aplicada não foi o suficiente para causar danos à célula. A permeabilidade máxima, sem a desintegração da célula, foi detectada para a concentração de 2,5 mg.L^{-1} Cl_2 , com cerca de 85% das células apresentando a membrana comprometida. Nas concentrações de 4 e 8 mg.L^{-1} Cl_2 as células provavelmente sofreram lise total,

causando destruição dos ácidos nucléicos e impossibilitando a permanência do SYTOX® Green na célula.

Paralelamente foram avaliadas as intensidades de fluorescência da clorofila-a e da ficocianina. O percentual de clorofila, avaliado pela soma dos valores de Q1 e Q2, manteve-se próximo de 100% em todos os tempos amostrados quando expostas às doses de 0,05 a 2,5 mg Cl₂.L⁻¹. Em doses de 4 e 8 mg Cl₂.L⁻¹, foram observadas reduções de 17 a 91% na fluorescência da clorofila, indicando a sua degradação. Nas doses de 0,05 a 1,5 mg Cl₂.L⁻¹, a ficocianina manteve-se presente em todos os tempos amostrados, com valores próximos de 100%. A partir da concentração de 2 mg Cl₂.L⁻¹ verificou-se diminuição nos níveis de ficocianina, não sendo mais detectada em doses de 4 e 8 mg Cl₂.L⁻¹. A ficocianina parece ser mais susceptível à oxidação do que a clorofila-a, pois em doses mais baixas do oxidante já é possível ver a sua diminuição, com total perda da fluorescência na concentração de 4 mg Cl₂.L⁻¹. A degradação da clorofila-a parece estar relacionada com o rompimento da célula, já que a sua degradação só é observada a partir de doses mais altas do oxidante, sendo detectada a sua fluorescência mesmo em dosagem de 8 mg Cl₂.L⁻¹.

Segundo Ma *et al.* (2012), a inativação das células de *M. aeruginosa* ocorre através da passagem de cloro pela membrana celular, sem causar grandes danos à membrana, que age sobre as proteínas e enzimas celulares, alterando todo o mecanismo de funcionamento da célula e levando, assim, à morte. Essa permeabilidade provocada na membrana permite a passagem de pequenas moléculas através dos poros causados pelo cloro. Com o aumento da dosagem de oxidante, a permeabilidade da célula também aumenta, permitindo, assim, passagem de moléculas maiores como a clorofila e ficocianina. A aplicação de doses ainda maiores pode resultar na lise completa com desintegração das células. O mecanismo exato do transporte de oxidante através da membrana celular não é bem compreendido e pode ocorrer por via de difusão ativa, difusão passiva, ou reação com a membrana celular (WERT, 2013).

Quando analisados os diferentes tempos de contato do oxidante com as células de *M. aeruginosa* LTPNA 08, não foram observadas variações

expressivas entre elas. No entanto, sabe-se que o cloro é capaz de reagir com as células logo nos primeiros minutos de exposição e promover danos à membrana celular, como relatado em outros trabalhos (DALY *et al.*, 2007, LIN *et al.*, 2009; FAN *et al.*, 2014). No experimento de viabilidade celular do presente trabalho, não foi adicionado nenhum reagente para cessar a ação do cloro passado os tempos de contato pré-determinados de 0, 15, 30 e 60 minutos. Após exposição ao oxidante, as células foram centrifugadas e o sobrenadante descartado. O fato de não haver diferenças consideráveis entre os tempos de contato de 0, 15, 30 e 60 minutos indica que o procedimento de centrifugação não foi capaz de eliminar todo o oxidante e cessar a oxidação. É provável que ao descartar o sobrenadante, uma porção do líquido presente contendo residual de cloro livre ainda estivesse presente no tubo, reagindo com as células.

Imagens fotográficas das células tratadas com o hipoclorito de sódio em diferentes dosagens foram registradas para permitir a visualização da mudança de coloração das amostras Figura 26.

Figura 26: Registro fotográfico da suspensão de células de *M. aeruginosa* LTPNA 08 expostas à diferentes doses do oxidante.

A partir de doses de 2,5 mg Cl₂.L⁻¹, pôde-se observar uma mudança na coloração das amostras, de um tom esverdeado para um tom amarelado. Essa

alteração na coloração é condizente com os resultados encontrados de clorofila-a da Figura 24, em que se verificou a degradação do pigmento a partir de doses de 2,5 mg $\text{Cl}_2 \cdot \text{L}^{-1}$. A ausência de agitação constante e a incubação em ambiente restrito de luz podem ser os motivos para explicar a discrepância dos resultados obtidos nos ensaios de citometria de fluxo comparados com os obtidos na análise por HPLC-DAD.

A susceptibilidade das células de cianobactérias à cloração é também afetada pelo estado fisiológico das células, densidade celular, matriz de água e as condições de cloração (dose, tempo de contato, pH, temperatura, agitação) (HART *et al.*, 1998; LIN, *et al.*, 2009).

No processo de pré-cloração, as doses e os pontos de dosagem de cloro podem ser otimizados para obter a inativação das células de cianobactérias e o controle dos níveis de toxina, simultaneamente. A aplicação das doses de oxidante em reservatórios como processo de pré-oxidação, deve ser realizada com máxima precaução, uma vez que o cloro pode lisar as células e levar a liberação de toxinas. Além disso, existem muitas variáveis bióticas, abióticas e interações entre comunidades envolvidas, o que pode representar um risco à comunidade aquática. No entanto, com a aplicação de valores de CT adequados, tanto na água bruta como nas estações de tratamento, é possível obter altas taxas de remoções de toxinas dissolvidas e toxinas oriundas da lise celular.

Embora o processo de pré-oxidação seja eficiente na remoção de compostos dissolvidos e auxilie os processos de coagulação e floculação na remoção de compostos particulados, as ações preventivas contra o aparecimento de florações de cianobactérias e microalgas é ainda a melhor alternativa de tratamento. A participação ativa da sociedade junto aos poderes públicos no gerenciamento e planejamento ambiental, principalmente nas questões relativas ao monitoramento e fiscalização é fundamental para garantir a qualidade e preservação dos recursos hídricos.

6. CONCLUSÕES

O efeito do hipoclorito de sódio, utilizado como agente oxidante no processo de cloração, sobre a viabilidade celular de *M. aeruginosa* LTPNA 08 e remoção de MCs foi avaliado testando-se diferentes concentrações e tempos de contato. As conclusões obtidas no trabalho foram as seguintes:

- O processo de cloração causa danos à membrana celular de *M. aeruginosa* LTPNA 08, aumentando a permeabilidade celular e contribui para a liberação de componentes intracelulares (cianotoxinas, clorofila-a) no meio.
- A contagem de células coradas com solução de lugol não é eficiente para avaliar a viabilidade celular
- A clorofila-a é rapidamente degradada pelo hipoclorito de sódio, sendo necessários valores de CT acima de 40,66 mg.min.L⁻¹ para atingir a quase completa degradação da clorofila-a (>97%).
- Foi verificada uma rápida redução da concentração de microcistinas intracelulares nos primeiros 15 minutos de exposição para todas as doses de oxidante, com aumento dos níveis extracelulares e subsequente degradação.
- Para a dose de 0,5 mg Cl₂.L⁻¹, o aumento dos níveis extracelulares de MCs foi mais pronunciado, sugerindo que a toxina intracelular é liberada da célula danificada em uma velocidade maior do que é degradada. Para as doses mais altas, o oxidante foi capaz de remover tanto a fração intracelular como a extracelular.
- Ao manter um residual de cloro livre acima de 0,5 mg.L⁻¹ ao final de 30 minutos de contato, obteve-se a completa remoção das MCs.
- Ao final de 60 minutos, remoções de 70, 88, 92, 100 e 100% foram obtidos para as doses de 0,5, 1,5, 2, 2,5 e 3 mg Cl₂.L⁻¹. Ao manter um residual de cloro livre de no mínimo 0,5 mg.L⁻¹ ao final de 30 minutos de contato obteve-se a completa remoção das microcistinas para as doses de 2,5 e 3 mg Cl₂.L⁻¹.

- Valores de CT acima de 30,16 mg.min.L⁻¹ foram necessários para atingir concentrações de microcistinas abaixo do valor máximo permitido de 1,0 µg.L⁻¹ exigidos pela WHO e pela legislação brasileira de potabilidade da água.
- O aumento da dose de oxidante resultou no aumento da permeabilidade celular, indicativo do comprometimento da integridade da membrana celular.
- A permeabilidade máxima, sem a desintegração da célula, foi detectada para a concentração de 2,5 mg.L⁻¹ Cl₂. Nas concentrações de 4 e 8 mg.L⁻¹ Cl₂ as células provavelmente sofreram lise total, com destruição dos ácidos nucléicos, impossibilitando a permanência do marcador SYTOX® Green na célula.
- A intensidade de fluorescência da clorofila-a só diminuiu a partir da dose de 2,5 mg Cl₂.L⁻¹, sendo detectada mesmo na dose mais alta de 8 mg Cl₂.L⁻¹.
- A intensidade de fluorescência da ficocianina só diminuiu a partir da dose de 1,5 mg Cl₂.L⁻¹, não sendo mais detectada em doses de 4 e 8 mg Cl₂.L⁻¹.
- O processo de cloração, utilizando hipoclorito de sódio, se mostrou eficiente na inativação de células de *M. aeruginosa* LTPNA08 e na remoção de microcistinas totais.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACERO, J.L., RODRIGUEZ, E., MERILUOTO, J. Kinetics of reactions between chlorine and the cyanobacterial toxins microcystins. **Water Research**, v.39, p.1628 – 1638, 2005.

APHA – American Public Health Association. Standard methods for the examination of water and wastewater. 21st edition, edited by Andrey D. Eaton, Lenore S. Clesceri, Eugene W. Rice, Arnold E. Greenberg, Washington, EUA, 2005.

AZEVEDO, S.M.F.O., CARMICHAEL, W.W., JOCHIMSEN, E.M., RINEHART, K.L., SHARON, L., SHAW, G.L., EAGLESHAM, G.K.. First report of microcystins from a Brazilian isolate of the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. **Journal of Applied Phycology**, v.3, p.261-265, 1994.

AZEVEDO, S.M.F.O. Cianobactérias tóxicas: causas ecológicas e consequências para a saúde pública. Apostila: Curso de especialização em Limnologia, gerenciamento de recursos hídricos e aquicultura – IBCCF^o - UFRJ, 2002

AZEVEDO, S.M.F.O., BRANDÃO, C.C.S.B. (2003). Cianobactérias Tóxicas na água para Consumo Humano na Saúde Pública e Processos de Remoção em Água para Consumo Humano. FUNASA.

AZEVEDO, M.T.D., SANT'ANNA, C.L. Morfologia e reprodução. In: SANT'ANNA, C. L.; AZEVEDO, M.T.D.; et al. (Ed.). **Manual ilustrado para identificação e contagem de cianobactérias de águas continentais brasileiras**. 1ª ed. Rio de Janeiro: Interciência, 2006.

BANKER, R., CARMELI, S., WERMAN, M., TELTSCH, B., PORAT, R., SUKENIK, A. Uracil moiety is required for toxicity of the cyanobacterial hepatotoxin cylindrospermopsin. **Journal of Toxicology & Environmental Health**. v.62, n.4, p.281-288, 2001.

BERMAN-FRANK, I., LUNDGREN, P., FALKOWSKI, P. Nitrogen fixation and photosynthetic oxygen evolution in cyanobacteria. **Research in Microbiology**, v.154, p.157-164, 2003.

BICUDO, C.E.M., MENEZES, M. Gêneros de Algas continentais do Brasil. Chave para identificação e descrições. São Carlos: Ed. Rima, p489, 2005.

BOUVY, M.; FALCÃO, D.; MARINHO, M.; PAGANO, M.; MOURA, A. Occurrence of *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanobacteria) in 39 Brazilian tropical reservoirs during the 1998 drought. **Aquatic Microbial Ecology**, v. 23, p. 13-27, 1999.

BRANCO, C. W.; SENNA, P. A. Factors influencing the development of *Cylindrospermopsis raciborskii* and *Microcystis aeruginosa* in the Paranoá Reservoir, Brasília, Brazil. **Algological Studies**, v.75, p.85-96, 1994.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Coordenação-Geral de Vigilância em Saúde Ambiental. **Portaria MS 2914/2011**. Disponível em: <http://www.comitepcj.sp.gov.br/download/Portaria_MS_291411.pdf>.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA). **Resolução CONAMA 357/2005**. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/port/conama/res/res05/res35705.pdf>>.

BROOKE, S., NEWCOMBE, G., NICHOLSON, B., KLASS, G. Decrease in toxicity of microcystins LA and LR in drinking water by ozonation. **Toxicon**, v.48, n.8, p.1054–1059, 2006.

CARDOZO, K.H.M., GUARATINI, T., BARROS, M.P., FALCÃO, V.R., TONON, A.P., LOPES, N.P., CAMPOS, S., TORRES, M.A., SOUZA, A.O., COLEPICOLA, P., PINTO, E. Metabolites from algae with economical impact. **Comparative Biochemistry and Physiology**, Part C, v.146, p. 60 – 78, 2007.

CARMICHAEL, W. W.; BEASLEY, V.; BUNNER, D. L.; ELOFF, J. N.; FALCONER, I.; GORHAM, P.; HARADA, K.; KRISHNAMURTHY, T.; MIN-JUAN, Y.; MOORE, R. E.; RINEHART, K.; RUNNEGAR, M.; SKULBERG, O. M.; WATANABE, M. Naming of cyclic heptapeptide toxins of cyanobacteria (blue-green algae). **Toxicon**, v.26, n.11, p. 971-973, 1988.

CARMICHAEL, W. W. Cyanobacteria secondary metabolites - The cyanotoxins. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 72, n. 6, p. 445-459, 1992.

CARMICHAEL, W. W. Toxins of Cynaobacteria. **Scientific American**, v.270, n.1, p.78 – 86, 1994.

CARMICHAEL, W.W., AZEVEDO, S.M.F.O., AN, J.S., MOLICA, R.J.R., JOCHIMSEN, E.M., LAU, S., RINEHART, K.L., SHAW, G.R. Human fatalities from cyanobacteria, chemical and biological evidence for cyanotoxins. **Environmental Health Perspectives**, v.109, p.663–668, 2001.

CARNEIRO, R.L., DÖRR, F.A., DÖRR, F., BORTOLI, S., DELHERBE, N., VÁSQUEZ, M., PINTO, E. Co-occurrence of microcystin na microginin congeners in Brazilian strains of *Microcystis* sp. **FEMS-Microbiology Ecology**, v.82, p.692–702, 2012.

CARVALHO, M.C., AGUJARO, L.F., PIRES, D. **Manual de cianobactérias planctônicas: legislação, orientações para o monitoramento e aspectos ambientais**. CETESB - Companhia Ambiental do Estado de São Paulo, 2013. Disponível também em: <http://www.cetesb.sp.gov.br/>

CHANG, DE-WEI., HSIEH, MENG-LING., CHEN, YAN-MIN., LIN, TSAIR-FUH., CHANG, JO-SHU. Kinetics of cell lysis for *Microcystis aeruginosa* and *Nitzschia paleain* the exposure to β -cyclocitral. **Journal of Hazardous Materials**, v.185, p.1214 – 1220, 2011.

CHORUS, I., BARTRAM, J. **Toxic cyanobacteria in water – a guide to their public health consequences, monitoring and management**. 3 ed.: Publisher on behalf of WHO – World Health Organization, 1999.

CHORUS, I. Introduction: Cyanotoxins – research for environmental safety and human health. In: Chorus I, editor. *Cyanotoxins – Occurrence, Causes, Consequences*. Berlin: Springer-Verlag, p.1–4, 2001.

CHOW, C.W.K., DRIKAS, M., HOUSE, J., BURCH, M.D.E., VELZEBOER, R.M.A. The impact of conventional water treatment process on cells of the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. **Water Research**. v.33, n.15, p.3253-3262, 1999.

COHEN, Z. Products from microalgae. In: Richmond, A. (ed.), *Handbook of Microalgal Mass Culture*. CRC Press Inc., p.421-454, 1986.

CORAL, L.A., ZAMYADI, A., BARBEAU, B., BASSETTI, F.J., LAPOLLI, F.R., PRÉVOST, M. Oxidation of *Microcystis aeruginosa* and *Anabaena flos-aquae* by ozone: Impacts on cell integrity and chlorination by-product formation. **Water Research**, v.47, p.2983 – 2994, 2013.

DALY, R.I., HO, L., BROOKES, J.D. Effect of Chlorination on *Microcystis aeruginosa* Cell Integrity and Subsequent Microcystin Release and Degradation. **Environmental Science & Technology**, v.41, n.12, p.4447 – 4453, 2007.

DE JULIO, M., FIORAVANTE, D.A., DE JULIO, T.S., OROSKI, F.I., GRAHAM, N.J.D. A methodology for optimising the removal of cyanobacteria cells from a Brazilian eutrophic water. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 27, n. 1, p. 113-126, 2010.

DI BERNARDO, L. **Algas e suas influências na qualidade das águas e nas tecnologias de tratamento**. ABES – Associação Brasileira de Engenharia Sanitária e Ambiental, Rio de Janeiro – Brasil, 1995.

DI BERNARDO, L., DANTAS, A.B. **Métodos e técnicas de tratamento de água**. 2.ed. São Carlos: RiMa, v.2, p.792, 2005.

DI BERNARDO, L., DE LUCA, S.J., KURODA, E.K. **Contribuição ao Estudo da Remoção de Cianobactérias e Microcontaminantes Orgânicos por Meio de Técnicas de Tratamento de Água para Consumo Humano**. PROSAB, Belo Horizonte, Minas Gerais, p.504, 2007.

DING, J., SHI, H., TIMMONS, T., ADAMS, C. Release and removal of microcystins from *Microcystis* during oxidative-, physical-, and UV-based disinfection. **Journal of Environmental Engineering**, v.136, n.1, p.2 – 11, 2010.

DUBELAAR, G.B.J., JONKER, R.R. Flow cytometry as a tool for the study of phytoplankton. **Scientia Marina**, v. 62, n.2, p.135 – 156, 2000.

EDZWALD, J.K., WINGLER, B.J. Chemical and physical aspects of dissolved air flotation for the removal of algae. **Journal Water SRT-Aqua**, v.39, n.1, p.24-35, 1990.

EDZWALD, J.K. Algae, bubbles, coagulants and dissolved air flotation. **Water Science and Technology**, v.27, n.10, p.67-81, 1993.

ESTEVEZ, F.A. Fundamentos da Limnologia, 2 Ed. Rio de Janeiro: Editora Interciência, 1998.

FAN, J., DALY, R., HOBSON, P., HO, L., BROOKES, J. Impact of potassium permanganate on cyanobacterial cell integrity and toxin release and degradation. **Chemosphere**, v.92, p.529 – 534, 2013.

FAN, J., HOBSON, P., HO, L., DALY, R., BROOKES, J. The effects of various control and water treatment processes on the membrane integrity and toxin fate of cyanobacteria. **Journal of Hazardous Materials**, v.264, p.313 – 322, 2014.

GIBSON, C. E., SMITH, R. V. Freshwater plankton. IN: Carr, N. G., Whitton, B. A. (Eds), **The biology of cyanobacterium**. Botanical Monographs, Blackwell Scientific Publications, London, v. 19, p. 463-490, 1982.

GORHAN P.R., MCLACHLAN, J., HAMMER, U.T., KIM, W.K. Isolation and culture of toxic strains of *Anabaena flos-aquae* (Lingb.). **Verhandlungen des Internationalen Verein Limnologie**, v.15, p.796-804, 1964.

HAGEMANN, M. Molecular biology of cyanobacterial salt acclimation. **FEMS Microbiology Reviews**, v.35, n.1, p.87-123, 2011.

HART, J., FAWELL, J.K., CROLL, B. The fate of both intra and extracellular toxins during drinking water treatment. **Water Supply**, v.16, p.611-616, 1998.

HE, X., PELAEZ, M., WESTRICK, J.A., O'SHEA, K.E., HISKIA, A., TRIANTIS, T., KALOUDIS, T., STEFAN, M.I., DE LA CRUZ, A., DIONYSIOU, D.D. Efficient removal of microcystin-LR by UV-C/H₂O₂ in synthetic and natural water samples. **Water Research**, v.46, p.1501 – 1510, 2012.

HIMBERG, K., KEIJOLA, A.M., HIIKVIRTA, L. The effect of water treatment process on the removal of hepatotoxins from microcystis and oscillatoria cyanobacteria: a laboratory study. **Water Research**, v.23, n.2, p.979-984, 1989.

HO, L. ONSTAD, G., VON GUNTEN, U., RINCK-PFEIFFER, S., CRAIG, K., NEWCOMBE, G. Differences in the chlorine reactivity of four microcystin analogues. **Water Research**, v.40, p.1200-1209, 2006.

HOFFMANN, L., KOMÁREK JIRŮ., KASŤOVSKÝ., JAN. System of cyanoprokaryotes (cyanobacteria) – state in 2004. **Algological Studies**, v.117, p.95-115, 2005.

HUDNELL, H. K. Cyanobacterial harmful algal blooms: state of science and research needs. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v.619, p.950, 2008.

JOCHIMSEN, E.M., CARMICHAEL, W.W., AN, J.S, CARDO, D.M., COOKSON, S.T., HOLMES, C.E., ANTUNES, M.B., DE MELO FILHO, D.A., LYRA, T.M, BARRETO, V.S., AZEVEDO, S.M., JARVIS, W.R. Liver failure and death after exposure to microcystins at a hemodialysis center in Brazil. **The New England Journal of Medicine**, v.338, p.873–878, 1998.

KOMÁREK, J. & HAUER, T. (2013): CyanoDB.cz - On-line database of cyanobacterial genera. - Word-wide electronic publication, Univ. of South Bohemia & Inst. of Botany AS CR, 2013. Disponível em: <http://www.cyanodb.cz>

KOMÁREK, J., KAŠTOVSKÝ J., MAREŠ J., JOHANSEN, J.R. Taxonomic classification of cyanoprokaryotes (cyanobacterial genera) 2014, using a polyphasic approach. **Preslia**, v.86, p.295-335, 2014.

KULL, T.P.J., SJÖVALL, O.T., TAMMENKOSKI, M.K., BACKLUND, P.H., MERILUOTO, J.A.O. Oxidation of the Cyanobacterial Hepatotoxin Microcystin-LR by Chlorine Dioxide: Influence of Natural Organic Matter. **Environmental Science and Technology**, v.40, p.1504 – 1510, 2006.

LAGOS, N., ONODERA, H., ZAGATTO, P.A., ANDRINOLO, D., AZEVEDO, S.M.F. O., OSHIMA, Y. The first evidence of paralytic shellfish toxins in the freshwater cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* isolated from Brazil. **Toxicon**, v.37, p.1359-1373, 1999.

LAMBERT, T.W., HOLMES, C.F.B., HRUDEY, S.E. Adsorption of microcystin-LR by activated carbon and removal in full scale water treatment. **Water Research**, v.30, n.6, p.1411–1422, 1996.

LAWTON, L.A., EDWARDS, C., CODD, G. Extraction and High-performance Liquid Chromatographic Method for the Determination of Microcystins in Raw and Treated Waters. **Analyst**, v.119, p.1525 – 1530, 1994.

LIN, T-F., CHANG, D-W., LIEN, S-K., TSENG, Y-S., CHIU, Y-T., WANG, Y-S. Effect of chlorination on the cell integrity of two noxious cyanobacteria and their releases of odorants. **Journal of Water Supply: Research and Technology**, v.58, n.8, p.539–551, 2009.

LYCK, S. Simultaneous changes in cell quotas of microcystin, chlorophyll a, protein and carbohydrate during different growth phases of a batch culture experiment with *Microcystis aeruginosa*. **Journal of Plankton Research**, v. 26, p. 727-736, 2004.

MA, M., LIU, R., LIU, H., QU, J. Chlorination of *Microcystis aeruginosa* suspension: Cell lysis, toxin release and degradation. **Journal of Hazardous Materials**, v.217-218, p.279 – 285, 2012.

MACHADO, M.D., SOARES, E.V. Development of a short-term assay based on the evaluation of the plasma membrane integrity of the alga *Pseudokirchneriella subcapitata*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.95, p.1035 – 1042, 2012.

MAILLARD, J.-Y. Bacterial target sites for biocide action. **Journal of Applied Microbiology**, v. 92, n. (suppl.), p. 16S-27S, 2002.

McELHINEY, J., LAWTON, L.A. Detection of the cyanobacterial hepatotoxins microcystins. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v.203, p.219 – 230, 2005.

MEREL, S., LEBOT, B., CLÉMENT, M., SEUX, R., THOMAS, O. MS identification of microcystin-LR chlorination by-products. **Chemosphere**, v.74, n.6, p.832–839, 2009.

MEREL, S., CLÉMENT, M., THOMAS, O. State of the art on cyanotoxins in water and their behaviour towards chlorine. **Toxicon**, v.55, p.677-691, 2010.

MIKULA, P., ZEŽULKA, S., JANCULA, D., MARSALEK, B. Metabolic activity and membrane integrity changes in *Microcystis aeruginosa* –new findings on hydrogen peroxide toxicity in cyanobacteria. **European Journal of Phycology**, v.47, n.3, p.195 – 206, 2012.

MOLICA, R. J. R.; ONODERA, H.; GARCIA, C.; RIVAS, M.; ANDRINOLO, D.; NASCIMENTO, S.; MERGURO, H.; OSHIMA, Y.; AZEVEDO, S. M. F. O.; LAGOS, N. Toxins in freshwater cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanophyceae) isolated from Tabocas reservoir in Caruaru, Brazil, including demonstration of a new saxitoxin analogue. **Phycologia**, v. 41, p. 606 – 611, 2002.

MOMANI, F.A. Degradation of cyanobacteria anatoxin-a by advanced oxidation process. **Separation and Purification Technology**, v.57, p.85–93, 2007.

MÜLLER, C.C., RAYA-RODRIGUEZ, M.T., CYBIS, L.F. Adsorção em carvão ativado em pó para remoção de microcistina de água de abastecimento público. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, v.14, n.1, p. 29–28, 2009.

NABOUT, J.C., ROCHA, B.S., CARNEIRO, F.M., SANT'ANNA, C.L. How many species of Cyanobacteria are there? Using a discovery curve to predict the species number. **Biodiversity and Conservation**, v.22, n.12, p. 2907–2918, 2013.

NICHOLSON, B.C., ROSITANO, J., BURCH, M.D. Destruction of cyanobacterial peptide hepatotoxins by chlorine and chloramine. **Water Research**, v.28, n.6, p.1297–1303, 1994.

NICHOLSON, B.C., SHAW, G.R., MORRALL, J., SENOGLES, P.J., WOODS, T.A., PAPAGEORGIOU, J., KAPRALOS, C., WICKRAMASINGHE, W., DAVIS,

B.C., EAGLESHAM, G.K. AND MOORE, M.R. Chlorination for degrading saxitoxins (paralytic shellfish poisons) in water. *Environmental Technology* 24(11), 1341-1348, 2003.

OGA, S.; CAMARGO, M. M. A.; BATISTUTO, J.A.O. **Fundamentos de toxicologia**. 3. ed. São Paulo: Atheneu, 2008.

PLUMMER, J.D., EDZWALD, J.K. Effect of ozone on Algae as Precursors for Trihalomethane and Haloacetic Acid Production. **Environmental Science Technology**, v.35, p. 3661 – 3668, 2001.

POURIA, S., ANDRADE DE, A., BARBOSA, J., CAVALCANTI, R.L., BARRETO, V.T.S., PREISER, W., POON, G.K., NEILD, G.H., CODD, G.A. Fatal microcystin intoxication in haemodialysis unit in Caruaru, Brazil. **The Lancet**, v.352, n.9121, p.21–26, 1998.

PROUSEK, J. Advanced oxidation processes for water treatment. Chemical processes, **Chemické. Listy**, v.90, n.4, p.229–237, 1996.

RAVEN, P.H., EVERT, R.F. & EICHHORN, S.E. **Biologia Vegetal**, 5^a. ed. Coord. Trad. J.E.Kraus. Editora Guanabara Koogan, Rio de Janeiro. p.176 – 180, 1996.

REGEL, R.H., BROOKES, J.D., GANF, G.G., GRIFFITHS, R.W. The influence of experimentally generated turbulence on the Mash01 unicellular *Microcystis aeruginosa* strain. **Hydrobiologia**, v.517, p. 107–120, 2004.

REYNOLDS, C.S. **The Ecology of Phytoplankton**. 1 ed. Cambridge: Cambridge University Press, 2006.

RIVIERS, B. **Biologia e Filogenia das Algas**. Belo Horizonte: Artmed, 2006.

RODRÍGUEZ, E., MAJADO, M.E., MERILUOTO, J., ACERO, J.L. Oxidation of microcystins by permanganate: reaction kinetics and implications for water treatment. **Water Research**, v.41, n.1, p.102–110, 2007

RODRÍGUEZ, E., ACERO, J.L., SPOOF, L., MERILUOTO, J. Oxidation of MC-LR and -RR with chlorine and potassium permanganate: toxicity of the reaction products. **Water Research**, v.42, n.6–7, p.1744–1752, 2008.

ROEGNER, A.F., BRENA, B., GONZÁLEZ-SAPIENZA, G., PUSCHNER, B. Microcystins in potable surface Waters: toxic effects and removal strategies. **Journal of Applied Toxicology**. v.34, n.5, p.441-57, 2014.

ROSITANO, J., NEWCOMBE, G., NICHOLSON, B., SZTAJNBOK, P. Ozonation of natural algal toxins in four treated waters. **Water Research**, v.35, n.1, p.23–32, 2001.

RUNNEGAR, M.T.C., FALCONER, I.R. (1982). The in vivo and in vitro biological effects of the reptide hepatotoxin from the blue-green alga *Microcystis aeruginosa*. **South African Journal of Science**, v.78, p. 363 – 366, 1982.

SENOGLES, P., SHAW, G., SMITH, M., NORRIS, R., CHISWELL, R., MUELLER, J., SADLER, R. AND EAGLESHAM, G. Degradation of the cyanobacterial toxin cylindrospermopsin, from *Cylindrospermopsis raciborskii*, by chlorination. **Toxicon**, v.38, n.9, p.1203 – 1213, 2000.

SHARMA, V.K., TRIANTIS, T.M., ANTONIOU, M.G., HE, X., PELAEZ, M., HAN, C., SONG, W., O'SHEA, K.E., DE LA CRUZ, A.A., KALOUDIS, T., HISKIA, A., DIONYSIOU, D.D. Destruction of microcystins by conventional and advanced oxidation process: A review. **Separation and Purification Technology**, v.91, p.3–17, 2012.

SANT'ANNA, C.L., AZEVEDO, M.T.P., WERNER, V.R., DOGO, C.R., RIOS, F.R., CARVALHO, L.R. Review of toxic species of Cynaobacteria in Brazil. **Algological Studies**, v.126, p. 251–265, 2008.

SANT'ANNA, C. L., BRANCO, L. H. Z., GAMA JÚNIOR, W. A., WERNE, V. R. Lista de Cyanobacteria do Estado de São Paulo. **Biota Neotropica**, v.11, n.1a, p.1-41, 2012.

SILVA, L.H.S. Fitoplâncton de um reservatório eutrófico (Lago Monte Alegre), Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil. **Revista Brasileira de Biologia**, v.59, n.2. p.281-303, 1999.

TANDEAU DE MARSAC, N.; HOUMARD, J. Adaptation of cyanobacteria to environmental stimuli: new steps towards molecular mechanisms. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 104, p. 119-190, 1993.

TEIXEIRA, M.G.L.C., COSTA, M.C.N., CARVALHO, V.L.P., PEREIRA, M.S.P., HAGE, E. Gastroenteritis epidemic in the área of the Itaparica Dam, Bahia, Brazil. **Bulletin of Pan American Health Organization**, v.27, n.3, p.9, 1993.

TSUJI, K., WATANUKI, T., KONDO, F., WATANABE, M.F., NAKAZAWA, H., SUZUKI, M., UCHIDA, H. AND HARADA, K.I. Stability of microcystins from cyanobacteria – IV – Effect of chlorination on decomposition. **Toxicon**, v.35, n.7, p.1033–1041, 1997.

VAN APELDOORN, M. E.; VAN EGMOND, H. P.; SPEIJERS, G. J. A.; BAKKER, G. J. I. Toxins of cyanobacteria. **Molecular Nutrition & Food Research**, v.51, n.1, p.7-60, 2007.

YOO, R. S., CARMICHAEL, W.W., HOEHN, R. C., HRUDEY, S. E. **Cyanobacterial (Blue-Green Algal) Toxins: A resource Guide**. American Water Works Association – Research Foundation, U.S.A. p.229, 1995.

YUAN, M.; NAMIKOSHI, M.; OTSUKI, A.; RINEHART, K. L.; SIVONEN, K.; WATANABE, M. F. Low-energy collisionally activated decomposition and structural characterization of cyclic heptapeptide microcystins by electrospray ionization mass spectrometry. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 34, p. 33-43, 1999.

WERT, E.C., DONG, M.M., ROSARIO-ORTIZ, F.L. Using digital flow cytometry to assess the degradation of three cyanobacteria species after oxidation processes. **Water Research**, v.47, p.3752 – 3761, 2013.

WERT, E.C., KORAK, J.A., TRENHOLM, R.A., ROSARIO-ORTIZ, F.L. Effect of oxidant exposure on the release of intracellular microcystin, MIB, and geosmin from three cyanobacteria species. **Water Research**, v.52, p.251 – 259, 2014.

WESTRICK, J.A., SZLAG, D.C., SOUTHWELL, B.J., SINCLAIR, J. A review of cyanobacteria and cyanotoxins removal/inactivation in drinking water treatment. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v.397, p.1705–1714, 2010.

WHO – WORLD HEALTH ORGANIZATION 1998. *Guidelines for drinking-water quality* – Addendum to volume 1. WHO, Geneva, 2^a Edição, 36p.

ZAMYADI, A., HO, L., NEWCOMBE, G., DALY, R.I., BURCH, M., BAKER, P., PRÉVOST, M. Release and oxidation of cell-bound saxitoxins during chlorination of *Anabaena circinalis* cells. **Environmental Science and Technology**, v.44, n.23, p.9055–906, 2010.

ZAMYADI, A., HO, L., NEWCOMBE, G., BUSTAMANTE, H., PRÉVOST, M. Fate of toxic cyanobacterial cells and disinfection by-products formation after chlorination. **Water Research**, v.46, p.1524 – 1535, 2012.

ANEXOS

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Secretaria de Pós-Graduação

Informações para os Membros de Bancas Julgadoras de Mestrado/Doutorado

1. O candidato fará uma apresentação oral do seu trabalho, com duração máxima de trinta minutos.

2. Os membros da banca farão a arguição oral. Cada examinador disporá, no máximo, de trinta minutos para arguir o candidato, exclusivamente sobre o tema do trabalho apresentado, e o candidato disporá de trinta minutos para sua resposta.

2.1 Com a devida anuência das partes (examinador e candidato), é facultada a arguição na forma de diálogo em até sessenta minutos por examinador.

3. A sessão de defesa será aberta ao público.

4. Terminada a arguição por todos os membros da banca, a mesma se reunirá reservadamente e expressará na ata (relatório de defesa) a aprovação ou reprovação do candidato, baseando-se no trabalho escrito e na arguição.

4.1 Caso algum membro da banca reprove o candidato, a Comissão Julgadora deverá emitir um parecer a ser escrito em campo exclusivamente indicado na ata.

4.2 Será considerado aprovado o aluno que obtiver aprovação por unanimidade ou pela maioria da banca.

5. Dúvidas poderão ser esclarecidas junto à Secretaria de Pós-Graduação: pgfarma@usp.br, (11) 3091 3621.

São Paulo, 23 de maio de 2014.

Prof. Dr. Adalberto Pessoa Junior
Presidente da CPG/FCF/USP

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Documento sem validade oficial
FICHA DO ALUNO

9141 - 5711725/1 - Kazumi Kinoshita

Email: kazumi.kinoshita@usp.br
Data de Nascimento: 02/05/1989
Cédula de Identidade: RG - 44.813.394-5 - SP
Local de Nascimento: Estado de São Paulo
Nacionalidade: Brasileira
Graduação: Bacharel em Ciências Biológicas - Universidade Federal de São Paulo - São Paulo - Brasil - 2013

Curso: Mestrado
Programa: Toxicologia e Análises Toxicológicas
Data de Matrícula: 05/07/2013
Início da Contagem de Prazo: 05/07/2013
Data Limite para o Depósito: 05/01/2016
Orientador Acadêmico: Prof(a). Dr(a). Ernani Pinto Junior - 05/07/2013 até 17/10/2013. Email: ernani@usp.br
Orientador: Prof(a). Dr(a). Ernani Pinto Junior - 18/10/2013 até 22/10/2015. Email: ernani@usp.br
Proficiência em Línguas: Inglês, Aprovado em 05/07/2013
Data de Aprovação no Exame de Qualificação: Aprovado em 25/09/2014
Data do Depósito do Trabalho: 06/10/2015
Título do Trabalho: "Efeito da pré-cloração sobre a integridade celular e remoção de toxinas de *Microcystis aeruginosa*"
Data Máxima para Aprovação da Banca: 07/12/2015
Data de Aprovação da Banca: 14/10/2015
Data Máxima para Defesa: 12/01/2016
Data da Defesa: 22/10/2015
Resultado da Defesa: Aprovado

Acesso à dissertação/tese: **'Banco de Teses da USP'**

A titulação é: Somente USP

Histórico de Ocorrências: Primeira Matrícula em 05/07/2013
Titulado em 22/10/2015

Aluno matriculado no Regimento da Pós-Graduação USP (Resolução nº 5473 em vigor de 18/09/2008 até 19/04/2013).

Última ocorrência: Titulado em 22/10/2015

Impresso em: 15/12/2015 12:31:33

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Documento sem validade oficial
FICHA DO ALUNO

9141 - 5711725/1 - Kazumi Kinoshita

Sigla	Nome da Disciplina	Início	Término	Carga Horária	Cred.	Freq.	Conc.	Exc.	Situação
BIE5705-5/1	Ecologia de Reservatórios (Instituto de Biociências - Universidade de São Paulo)	05/08/2013	25/11/2013	90	6	80	A	N	Concluída
FBC5803-3/2	Sistemas de Garantia da Qualidade em Laboratórios de Ensaio	06/08/2013	19/08/2013	30	2	100	A	N	Concluída
FBC5802-3/3	Tópicos Avançados em Toxicologia I	06/08/2013	18/11/2013	15	1	75	A	N	Concluída
EDM5791-5/11	Metodologia do Ensino Superior (Faculdade de Educação - Universidade de São Paulo)	13/08/2013	29/11/2013	120	0	-	-	N	Pré-matricula indeferida
QBQ5778-4/1	Proteômica: Bases e Aplicações (Instituto de Química - Universidade de São Paulo)	04/10/2013	07/11/2013	30	0	-	-	N	Pré-matricula indeferida
FBC5734-2/2	Aplicações da Citometria de Fluxo em Modelos Experimentais	09/12/2013	15/12/2013	30	2	100	A	N	Concluída
FBC5813-4/1	Aplicações de Cromatografia e Espectrometria de Massas em Análises Toxicológicas	11/03/2014	14/04/2014	60	4	100	A	N	Concluída
EDM5791-6/1	Metodologia do Ensino Superior (Faculdade de Educação - Universidade de São Paulo)	11/03/2014	03/06/2014	120	8	83	A	N	Concluída
BIE5729-5/1	Ecologia de Águas Continentais (Instituto de Biociências - Universidade de São Paulo)	05/05/2014	25/05/2014	90	0	-	-	N	Matrícula cancelada
Atividade do Programa	Participou da Etapa de Estágio Supervisionado em Docência do Programa de Aperfeiçoamento de Ensino junto à Disciplina FBC0520 - Análises Toxicológicas, ministrada aos alunos de graduação do curso de Farmácia e Bioquímica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. (1)	01/07/2014	30/11/2014	-	3	-	-	-	-

	Créditos mínimos exigidos		Créditos obtidos
	Para exame de qualificação	Para depósito da dissertação	
Disciplinas:	10	25	26
Estágios:			
Total:	10	25	26

Créditos Atribuídos à Dissertação: 71

Observações:

1) Créditos atribuídos de acordo com o disposto na Portaria GR-3588 e GR-4391 - PAE, de 31.08.09 e aprovados pela Comissão de Pós-Graduação, em Sessão de 06/02/2015.

Conceito a partir de 02/01/1997:

A - Excelente, com direito a crédito; B - Bom, com direito a crédito; C - Regular, com direito a crédito; R - Reprovado; T - Transferência.

Um(1) crédito equivale a 15 horas de atividade programada.

Última ocorrência: Titulado em 22/10/2015

Impresso em: 15/12/2015 12:31:33

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Documento sem validade oficial
FICHA DO ALUNO

9141 - 5711725/1 - Kazumi Kinoshita

Comissão julgadora da dissertação de mestrado:			
NUSP	Nome	Vínculo	Função
453826	Emani Pinto Junior	FCF - USP	Presidente
91681	Joao Carlos Monteiro de Carvalho	FCF - USP	Membro
1721740	Viviane Moschini Carlos	UNESP - Externo	Membro

Última ocorrência: Titulado em 22/10/2015

Impresso em: 15/12/2015 12:31:33