



INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES
Autarquia Associada à Universidade de São Paulo

**Potencial das radiações ionizantes para reduzir a toxicidade da cianobactéria
Microcystis aeruginosa**

THALITA TIEKO SILVA

**Dissertação apresentada como parte dos
requisitos para obtenção do Grau de
Mestre em Ciências na Área
de Tecnologia Nuclear - Aplicações**

**Orientadora:
Profa. Dra. Sueli Ivone Borrely**

**São Paulo
2021**

INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES
Autarquia Associada à Universidade de São Paulo

Potencial das radiações ionizantes para reduzir a toxicidade da cianobactéria
Microcystis aeruginosa

Versão Corrigida

Versão Original disponível no IPEN

THALITA TIEKO SILVA

Dissertação apresentada como parte
dos requisitos para obtenção do Grau
de
Mestre em Ciências na Área
de Tecnologia Nuclear - Aplicações

Orientadora:
Profa. Dra. Sueli Ivone Borrely

São Paulo
2021

Fonte de Financiamento: Comissão Nacional de Energia Nuclear – CNEN

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Como citar:

SILVA, T. T. **Potencial das radiações ionizantes para reduzir a toxicidade da cianobactéria *Microcystis aeruginosa***. 2021. 91 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Nuclear), Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, IPEN-CNEN, São Paulo. Disponível em: www.teses.usp.br/teses/pdf/dissertacao/00003C/00003E.pdf; (data de consulta no formato: dd/mm/aaaa)

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de geração automática da Biblioteca IPEN, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Silva, Thalita Tiekó
Potencial das radiações ionizantes para reduzir a toxicidade da cianobactéria *Microcystis aeruginosa* / Thalita Tiekó Silva; orientador Sueli Ivone Borrelly. -- São Paulo, 2021.
91 f.

Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Nuclear (Aplicações) -- Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo, 2021.

1. feixe de elétrons. 2. ecotoxicidade. 3. microcistinas. 4. *Alivibrio fischeri*. 5. *Daphnia similis*. I. Borrelly, Sueli Ivone, orient. II. Título.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Autor: Thalita Tieko Silva

Título: Potencial das radiações ionizantes para reduzir a toxicidade da cianobactéria
Microcystis aeruginosa

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Tecnologia Nuclear da Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Mestre em Ciências.

Data: 08/julho/2021

Banca Examinadora:

Profa. Dra.: Sueli Ivone Borrely

Instituição: Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares Julgamento: _____

Dra.: Fernanda Rios Jacinavicius

Instituição: Faculdade de Ciências Farmacêuticas - USP Julgamento: _____

Dra.: Sandra Regina Mattioli

Instituição: Centro Tecnológico da Marinha em São Paulo Julgamento: _____

Dedico este trabalho aos meus pais, meu irmão e ao Leandro por me apoiarem mais nesta jornada.

AGRADECIMENTOS

À Comissão Nacional de Energia Nuclear – CNEN pela concessão da bolsa de estudo.

À Profa. Dra. Sueli Ivone Borrely pela orientação, apoio e convivência durante esses dois anos. Também agradeço a confiança depositada em mim durante todo o período de desenvolvimento deste projeto.

Ao Prof. Dr. Ernani Pinto Júnior da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, por gentilmente, conceder a cepa de cianobactéria e a infraestrutura do laboratório para o desenvolvimento deste trabalho.

À Dr. Fernanda Rios Jacinavicius, pelo apoio e ajuda durante todo o período do projeto e auxílio nos cultivos. Seu conhecimento e apoio foram fundamentais, muito obrigada!!

À toda equipe que faz parte do laboratório, Nath, Vanessa, Flávio e Larissa pelo apoio, conhecimento compartilhado, as inúmeras conversas, sugestões, e toda ajuda nos longos dias de montagem de testes. À toda a família LEBA o meu muito obrigada!

Aos engenheiros Elizabeth Somessari e Samir Somessari do acelerador de elétrons (CETER-IPEN) pelo auxílio na irradiação das amostras.

Aos Professores Julio Marumo e Roberto Vicente pelo primeiro contato na Pós graduação do IPEN e sempre, gentilmente, me acolherem nos eventos e almoços na GRR, muito obrigada!!

Ao Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares - IPEN, por disponibilizar toda a infraestrutura dos laboratórios, onde me proporcionou todo o conhecimento e crescimento profissional ao longo destes dois anos.

Aos meus pais e irmão, por todo apoio e incentivo durante a realização deste trabalho e por todos esses anos. Obrigada mais uma vez pelo amor sempre incondicional!

Ao Leandro pelo imenso companheirismo, apoio, paciência e amor durante mais esta jornada. Obrigada por sempre acreditar em mim!!

À Hannah, por sua amizade que ultrapassou as barreiras da graduação e na distância continental. Com certeza o mundo do fitoplâncton se tornou mais fácil!!!

À Marina, por mais estes anos de amizade, companhia de pausa para café dentre todas as correrias do dia-a-dia.

Às meninas Mariane e Nayara, que me acompanharam e me apoiaram em mais essa fase mesmo que à distância. Um super obrigada por toda a força, energias positivas durante estes anos!

“Remember to look up at the stars and not down at your feet. Try to make sense of what you see and wonder about what makes the universe exist. Be curious. And however difficult life may seem, there is always something you can do and succeed at. It matters that you don't just give up.”

Stephen Hawking

RESUMO

SILVA, T. T. **Potencial das radiações ionizantes para reduzir a toxicidade da cianobactéria *Microcystis aeruginosa***. 2021. 91 p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Nuclear) - Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, IPEN-CNEN/SP, São Paulo. Disponível em: (data de consulta no formato: dd/mm/aaaa)

As cianobactérias frequentemente são relacionadas a florações tóxicas, devida a presença de cianotoxinas: compostos biosintetizados pelas cianobactérias que possuem certa toxicidade à vertebrados e que são observadas em altas concentrações nessas florações. Atualmente, os processos convencionais utilizados para o tratamento de água não são totalmente eficazes na remoção dessas cianotoxinas quando em concentrações relativamente elevadas. Desse modo, o trabalho teve por objetivo a aplicação da radiação ionizante por feixe de elétrons no crescimento da cultura e na produção de pigmentos, eficiência na degradação de microcistinas intracelulares e extracelulares e avaliação da toxicidade da cianobactéria *Microcystis aeruginosa* pós irradiação para o microcrustáceo *Daphnia similis* e a bactéria *Alivibrio fischeri*. A cianobactéria *M. aeruginosa* suspensa em meio ASM-1 em fase exponencial do crescimento foi exposta à irradiação por feixe de elétrons nas doses entre 1 e 10 kGy. O tratamento com irradiação diminuiu o crescimento da cultura, a produção dos pigmentos fotosintéticos e MC intracelulares, enquanto que para as MC extracelulares não houve alteração na concentração média de MC total com o aumento da dose. Para a toxicidade aguda com *Daphnia similis*, as doses entre 3 e 10 kGy indicaram diferenças estatisticamente significativas em relação à amostra controle quando o organismo-teste foi exposto às cianobactérias cultivadas por 7 e 15 dias. A exposição dos dafnínidos ao sobrenadante da cultura de cianobactérias cultivada por 15 dias tratadas por feixe de elétrons mostrou aumento de toxicidade com o aumento da dose. Porém, não foi observado efeito agudo na exposição ao sobrenadante da cultura cultivada por 7 dias, tendo os organismos-teste sobrevivência média de 93,33% (1 kGy) e 100% (4 kGy). Para a bactéria *Alivibrio fischeri*, a menor toxicidade foi na exposição com cianobactérias cultivadas por 15 dias, não sendo observados efeitos na inibição da luminescência da bactéria (0%) nas doses de 3 e 5 kGy. Neste estudo, a radiação ionizante, com acelerador de elétrons, será testada como uma tecnologia alternativa para a inibição da cianobactéria *M. aeruginosa* e na redução de toxicidade de microcistina presente nos reservatórios de abastecimento do estado de São Paulo.

Palavras-chave: feixe de elétrons, ecotoxicidade, microcistinas, *Alivibrio fischeri*, *Daphnia similis*.

ABSTRACT

SILVA, T. T. *Potential of ionizing radiation to reduce the toxicity of cyanobacteria Microcystis aeruginosa*. 2021. 91 p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Nuclear) - Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, IPEN-CNEN/SP, São Paulo. Disponível em: (data de consulta no formato: dd/mm/aaaa)

Cyanobacteria are often related to toxic blooms, due to the presence of cyanotoxins: compounds biosynthesized by cyanobacteria that have certain toxicity to vertebrates and that are observed in high concentrations in these blooms. Currently, conventional processes used for water treatment are not fully effective in removing these cyanotoxins when in relatively high concentrations. Thus, this work aimed at the application of ionizing radiation by electron beam in culture growth and production of pigments, radiation efficiency in the degradation of intracellular and extracellular microcystins and evaluation of the toxicity of *Microcystis aeruginosa* cyanobacteria after irradiation for the microcrustacean *Daphnia similis* and the bacteria *Alivibrio fischeri*. The cyanobacterium *M. aeruginosa* suspended in ASM-1 medium in exponential growth phase was exposed to irradiation by electron beam at doses between 1 and 10 kGy. Irradiation treatment decreased culture growth, photosynthetic pigment production and intracellular MC, while for extracellular MC there was no change in the mean total MC concentration with increasing dose. For acute toxicity with *Daphnia similis*, doses between 3 and 10 kGy indicated statistically significant differences in relation to the control sample (0 kGy) when the test organism was exposed to cyanobacteria cultures grown for 7 and 15 days. Exposure of daphnids to the supernatant of a 15-day cyanobacterial culture treated by electron beam radiation showed increased toxicity with increasing dose. However, it was not observed acute effect in the exposure to the culture supernatant for 7 days, with the test organisms having a mean survival of 93.33% (1 kGy) and 100% (4 kGy). For the bacteria *Alivibrio fischeri*, the lowest toxicity was in exposure to cyanobacteria cultivated for 15 days, with no effects on the inhibition of the bacteria's luminescence (0%) at doses of 3 and 5 kGy. In this study, ionizing radiation, with an electron accelerator, is tested as an alternative technology for the inhibition of *M. aeruginosa* cyanobacteria and for the reduction of microcystin toxicity present in the supply reservoirs in the state of São Paulo.

Key words: electron beam, ecotoxicity, microcystins, *Alivibrio fischeri*, *Daphnia similis*.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Ensaio de toxicidade com exposição de organismos-modelo à hepatotoxina MC-LR.....	25
Tabela 2 - Processos oxidativos avançados e suas principais reações químicas para a geração de radicais e H ₂ O ₂	29
Tabela 3 - Classificações, energia utilizada e principais aplicações de aceleradores de elétrons na indústria.....	31
Tabela 4 - Solução, reagentes, quantidade (g) e modo de preparo correspondente às soluções-estoque (mL) para o meio de cultivo ASM-1.....	36
Tabela 5 - Compostos verificados por LC-MS/MS e identificados via ferramenta Dereplicator e comparados com a literatura nas amostras intracelulares após irradiação por feixe de elétrons.....	58
Tabela 6 - Compostos verificados por LC-MS/MS e identificados via ferramenta Dereplicator e comparados com a literatura nas amostras extracelulares após irradiação por feixe de elétrons.....	63
Tabela 7 - Valores de CE ₅₀ -48 h (%), limite inferior L.I. (%) e limite superior L.I. (%) e coeficiente de correlação (R) das culturas de <i>M. aeruginosa</i> (cultivo de 7 dias) com e sem tratamento por irradiação por feixe de elétrons nos ensaios de toxicidade com <i>Daphnia similis</i> . Os dados são representados pela média de três amostras (n=3) e o desvio padrão (dp) de cada conjunto de dados.....	66
Tabela 8 - Valores de CE ₅₀ -48 h (%), limite inferior L.I. (%) e limite superior L.I. (%) e coeficiente de relação (R) das culturas de <i>M. aeruginosa</i> (cultivo por 15 dias) com e sem tratamento por irradiação por feixe de elétrons nos ensaios de toxicidade com <i>Daphnia similis</i> . Os dados são representados pela média de três amostras (n=3) e o desvio padrão (dp) de cada conjunto de dados.....	67

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura química geral da hepatotoxina NOD. Posição (1) D-MeAsp; (2) L-arginine; (3) Adda; (4) D-Glu e (5) Mdhb. A molécula foi desenhada por meio do software Marvin 21.2.0, 2021, ChemAxon.	22
Figura 2 - Estrutura química geral da hepatotoxina MC. Posição (1) D-Ala é D-alanina; (2) X; (3) D-MeAsp é ácido D-eritro- β -methilaspartic; (4) Z; (5) Adda; (6) D-Glu é ácido D-glutamato e (7) Mdha é N-methildehidroalanina. A molécula foi desenhada por meio do software Marvin 21.2.0, 2021, ChemAxon.	23
Figura 3 - Fluxograma de Fases do desenvolvimento da pesquisa: 1) Implementação do cultivo da cianobactéria no LEBA e 2) Irradiação por feixe de elétrons na suspensão de cianobactérias.....	35
Figura 4 - Acelerador de elétrons (IPEN/CNEN - CETER).....	38
Figura 5 - Microcrustáceo <i>Daphnia similis</i> (Crustacea, Cladocera).....	41
Figura 6 - Área de proteção de manancial no reservatório de Ribeirão Piraí, Bacia do Rio Jundiaí, no município de Salto- SP.....	42
Figura 7 - Sistema Microtox (Modelo M-500 – Microbics).....	44
Figura 8 - Curva de crescimento para <i>M. aeruginosa</i> em cultivo estabelecido no LEBA - IPEN/CNEN. Os dados são representados pela média de três replicatas (n=3); barras de erro indicam o desvio padrão (dp) de cada conjunto de dados.	45
Figura 9 - Cultura de <i>M. aeruginosa</i> após exposição à radiação por feixe de elétrons. O eixo horizontal é representado pela dose (kGy) e o eixo vertical é o tempo decorrido após a irradiação (h).....	47
Figura 10 - Espectro de absorção entre os comprimentos de onda 480 e 780 nm da cultura de <i>M. aeruginosa</i> pós irradiação por feixe de elétrons nos tempos de monitoramento 6 h; 24 h e 48 h. A) cultura com 7 dias e B) cultura com 15 dias.....	48
Figura 11 - Absorção máxima no comprimento de onda de 680 nm da cultura de <i>M. aeruginosa</i> pós irradiação por feixe de elétrons. A) cultura com 7 dias e B) cultura com 15 dias.	49

Figura 12 - Concentração de clorofila- <i>a</i> e carotenóides totais ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) após irradiação por feixe de elétrons na cultura de <i>M. aeruginosa</i> . Os dados são representados pela média de três replicatas (n=3); barras de erro indicam o desvio padrão (dp) de cada conjunto de dados. A) cultura com 7 dias e B) cultura com 15 dias.	51
Figura 13 - pH das cianobactérias <i>M. aeruginosa</i> suspendidas em meio ASM-1 após irradiação por feixe de elétrons. A) cultura com 7 dias e B) cultura com 15 dias. Os dados são representados pela média de três replicatas (n=3); barras de erro indicam o desvio padrão (dp) de cada conjunto de dados.....	54
Figura 14 - Agrupamento de MC formado pela análise de GNPS com base nos espectros de fragmentação MS / MS obtidos das amostras intracelulares nas culturas de <i>M. aeruginosa</i> após exposição à irradiação por feixe de elétrons. Os íons $[M + H]^+$ e $[M + 2H]^{2+}$ estão representados no agrupamento.....	56
Figura 15 - Concentração das MC intracelulares nas amostras controle e tratadas por feixe de elétrons logo após o processo de irradiação: (a) MC intracelulares totais e (b) variantes de MC intracelulares. Os dados são representados pela média de três amostras (n=3); barras de erro indicam o desvio padrão (dp) de cada conjunto de dados, $p < 0,0001$ (****).	60
Figura 16 - Intervalo de confiança de 95 % (Dunnett) em relação à amostra controle (0 kGy).	61
Figura 17 – Agrupamento de MC formado pela análise de GNPS com base nos espectros de fragmentação MS / MS obtidos das amostras extracelulares nas culturas de <i>M. aeruginosa</i> após exposição à irradiação por feixe de elétrons. Os íons $[M + H]^+$ e $[M + 2H]^{2+}$ estão representados no agrupamento.....	62
Figura 18 - Concentração das MC extracelulares nas amostras controle e tratadas por feixe de elétrons logo após o processo de irradiação: (a) MC extracelulares totais e (b) variantes de MC extracelulares. Os dados são representados pela média de três amostras (n=3); barras de erro indicam o desvio padrão (dp) de cada conjunto de dados.	64
Figura 19 - Intervalo de confiança de 95 % (Dunnett) em relação à amostra controle (0 kGy) para a MC total extracelular.	65
Figura 20 - Concentração efetiva em 50% dos organismos (CE_{50}) após exposição de 48 h nas culturas controle (0 kGy) e tratadas por feixe de elétrons logo após o processo de	

irradiação: nas culturas com 7 (verde) e 15 dias (roxo). Os dados são representados pela média de três amostras (n=3); barras de erro indicam o desvio padrão (dp) de cada conjunto de dados. $p < 0,001$ (***) e $p < 0,0001$ (****).....	68
Figura 21 - Intervalo de confiança de 95 % (Dunnett) das CE ₅₀ (48 h) dos ensaios de toxicidade com <i>Daphnia similis</i> em culturas cultivadas por 7 dias.....	69
Figura 22 - Intervalo de confiança de 95 % (Dunnett) das CE ₅₀ (48 h) dos ensaios de toxicidade com <i>Daphnia similis</i> em culturas com 15 dias.....	70
Figura 23 - Sobrevivência média (%) de <i>Daphnia similis</i> à concentração de 100 % do sobrenadante das culturas de <i>M. aeruginosa</i> , com 7 dias, após irradiação por feixe de elétrons. Os dados são representados pela média de três amostras (n=3); barras de erro indicam o desvio padrão (dp) de cada conjunto de dados.	71
Figura 24 - Concentração efetiva em 50 % dos organismos (CE ₅₀) após exposição de 48 h ao sobrenadante das culturas de <i>M. aeruginosa</i> , cultivo com 15 dias, após irradiação por feixe de elétrons. Os dados são representados pela média de três amostras (n=3); barras de erro indicam o desvio padrão (dp) de cada conjunto de dados.	72
Figura 25 - Carta controle de sensibilidade para o cladóceros <i>Daphnia similis</i> à substância de referência KCl.	73
Figura 26 - Percentual de inibição na luminescência da bactéria <i>Alivibrio fischeri</i> quando exposta as amostras sobrenadantes das culturas cultivadas por 7 e 15 dias com e sem tratamento por feixe de elétrons.....	74

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
1.1	OBJETIVOS	16
1.1.1	Objetivos específicos	16
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
2.1	Cianobactérias	17
2.1.1	Características gerais.....	17
2.1.2	Presença de cianobactérias em águas continentais eutrofizadas	19
2.1.3	Cianotoxinas	19
2.1.4	Ecotoxicidade de cianobactérias e suas cianotoxinas	23
2.2	Legislação e tratamento de cianotoxinas	26
2.2.1	Legislação	26
2.2.2	Processos Oxidativos Avançados (POA).....	28
2.2.3	Radiação ionizante	29
2.2.4	Irradiação por feixe de elétrons.....	30
2.2.5	Tratamento de cianotoxinas e cianobactérias.....	32
2.3	Detoxificação de cianotoxinas em meio aquoso por POA	33
3	MATERIAIS E MÉTODOS	35
3.1	Implementação do cultivo e manutenção da cianobactéria	35
3.2	Determinação do crescimento de <i>M. aeruginosa</i>	37
3.3	Irradiação das células da cianobactéria <i>Microcystis aeruginosa</i>	37
3.3.1	Determinação das concentrações de clorofila- <i>a</i> (cl- <i>a</i>) e carotenóides totais	38
3.3.2	Preparação das amostras para análise em LC-MS e UHPLC	39
3.4	Análises físico-químicas	40
3.4.1	Determinação de peróxido de hidrogênio (H ₂ O ₂)	40
3.5	Ensaio ecotoxicológico	40
3.5.1	Microcrustáceo <i>Daphnia similis</i>	40

3.5.2	Bactéria marinha <i>Alivibrio fischeri</i> (antigo <i>Vibrio fischeri</i>)	43
3.6	Análise estatística	44
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	45
4.1	Implementação do cultivo da cianobactéria <i>Microcystis aeruginosa</i>	45
4.2	Irradiação por feixe de elétrons na cianobactéria <i>Microcystis aeruginosa</i>	46
4.2.1	Influência da irradiação no crescimento da cultura	46
4.2.2	Influência da irradiação na produção dos pigmentos fotossintéticos.....	50
4.2.3	Influência da irradiação nos parâmetros físico-químicos	53
4.2.4	Influência da irradiação nos metabólitos secundários.....	55
4.3	Influência da irradiação por feixe de elétrons na toxicidade	65
4.3.1	Microcústáceo <i>Daphnia similis</i>	65
4.3.2	Carta controle.....	73
4.3.3	Bactéria marinha luminescente <i>Alivibrio fischeri</i>	74
5	CONCLUSÃO	77
6	SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	78
7	REFERÊNCIAS	79

1 INTRODUÇÃO

As cianobactérias, também conhecidas como cianofíceas, são organismos procariontes gram-negativos fotossintetizantes, pertencentes ao grupo das eubactérias e podem ser encontradas em habitats terrestres, marinhos e dulcícolas (DUY et al., 2000). Esses microrganismos possuem importante papel como produtores primários formando a base da cadeia trófica e atuando na ciclagem de nutrientes (SCHIRRMESTER et al., 2011). Apresentam grande diversidade morfológica, podendo ser encontradas nas formas unicelulares, ocorrendo individualmente, em colônias e agrupamentos e, também, sob a forma filamentosa.

A eutrofização artificial é o processo de enriquecimento das águas principalmente por nitrogênio e fósforo oriundos de atividade antropogênica. Este aumento na disponibilidade de nutrientes produz alterações no ecossistema aquático promovendo o crescimento excessivo da comunidade fitoplanctônica, muitas vezes relacionados ao aumento da incidência e geralmente predominância de florações de cianobactérias (HARPER, 1992; DOKULIL e TEUBNER, 2000; FERBER et al., 2004; KOMÁREK e JOHANSEN, 2015). Essas florações promovem a alteração da qualidade da água, com a redução de oxigênio dissolvido e mortalidade da biota local, gerando regiões de hipoxia, com perdas ecológicas e econômicas.

As cianobactérias possuem a capacidade de formar uma grande variedade de metabólitos secundários, que exibem diversos tipos de atividades biológicas ou bioquímicas (CULLEN et al., 2019), sendo que alguns desses metabólitos foram identificados como potentes toxinas, as chamadas cianotoxinas. Segundo SANSEVERINO et al. (2017), as cianotoxinas podem ser classificadas em quatro categorias de acordo com seu alvo toxicológico em vertebrados: neurotoxinas, dermatotoxinas, citotoxinas e hepatotoxinas. No meio aquático, as cianotoxinas estão presentes de forma extracelular e, também, contidas nas células e em maior concentração durante a fase exponencial de crescimento das cianobactérias. A liberação de cianotoxinas intracelulares pode ocorrer pela senescência celular, estresse celular e, também, pelo uso de algicidas (GURBUZ et al., 2016; SVIRČEV et al., 2017).

No Brasil, há registros de diversos gêneros com potencial na produção de toxinas como: *Microcystis*, *Cylindrospermopsis*, *Dolichospermum*, *Planktothrix*, *Aphanizomenon*, entre outras (SANT'ANNA et al., 2008). Atualmente, a Portaria GM/MS nº 888 do Ministério da Saúde estabelece as competências de monitoramento e controle de cianotoxinas e da densidade celular de cianobactérias para a garantia da qualidade da água

para consumo humano e manter os padrões de potabilidade. Dessa maneira, o regulamento determina o monitoramento das espécies de cianobactérias potencialmente produtoras das toxinas e, ainda, estabelece os limites máximos aceitáveis (LMA) para três tipos de cianotoxinas: microcistinas, cilindrospermopsinas e saxitoxinas (BRASIL, 2021).

Dentre os métodos utilizados para o controle da formação de florações de cianobactérias em águas naturais encontram-se os processos químicos, físicos e biológico, como por exemplo a filtração, coagulação, clarificação, flotação, ozônio e a fotólise (BURATTI et al., 2017; SVIRČEV et al., 2017). As tecnologias alternativas para a remoção de toxinas na água incluem os Processos Oxidativos Avançados (POA), que se caracterizam pela geração de radical hidroxila [$\bullet\text{OH}$] para oxidar substâncias químicas presentes em soluções aquosas. Dentre os diversos tipos de tecnologias em POA existentes, a radiação ionizante é considerada uma das mais eficientes na geração de radicais oxidativos e importantes esforços têm sido realizados para tornar essa aplicação viável para a área ambiental. Trata-se de uma tecnologia consolidada para aplicações industriais, modificação de polímeros, esterilização e produtos médicos-cirúrgicos, dentre outras aplicações (GEHRINGER et al., 1993).

Neste estudo, a radiação ionizante, com acelerador de elétrons, será testada como uma tecnologia alternativa com aplicabilidade ambiental, sendo avaliadas a degradação de microcistinas e a inibição da cianobactéria *Microcystis aeruginosa*.

1.1 OBJETIVOS

Esse trabalho tem o objetivo de avaliar a eficiência da radiação ionizante, proveniente de feixe de elétrons, para a inibição no crescimento da cianobactéria *M. aeruginosa* e na degradação de microcistinas que passam a contaminar as águas dos reservatórios, com ênfase na redução de efeitos tóxicos.

1.1.1 Objetivos específicos

- Estabelecer as condições de cultivo para a cianobactéria *M. aeruginosa*;
- Determinar o crescimento da cianobactéria nas condições laboratoriais definidas;
- Avaliar a eficiência da irradiação por feixe de elétrons nas variações fisiológicas associadas ao crescimento celular, produção de pigmentos (clorofila-*a* e carotenóides totais) e microcistinas;
- Avaliar a eficiência da irradiação por feixe de elétrons na toxicidade à organismos-teste de diferentes níveis tróficos por meio de ensaios de toxicidade aguda (bactéria luminescente *Alivibrio fischeri* e o microcrustáceo *Daphnia similis*).

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Esta revisão bibliográfica apresenta uma contextualização sobre as principais características das cianobactérias, bem como os riscos à sua proliferação em ambientes eutrofizados e implicações para o equilíbrio ambiental. Em seguida, são apresentadas as principais legislações vigentes no Brasil para o monitoramento e controle de cianotoxinas e cianobactérias. Na sequência será realizada uma análise sobre a aplicação de processos oxidativos avançados, em especial a irradiação por feixe de elétrons, no controle deste e demais poluentes. Por fim, uma abordagem sobre a importância de conciliar o uso de POA e a ecotoxicidade para o desenvolvimento e aplicação da irradiação por feixe de elétrons.

2.1 Cianobactérias

2.1.1 Características gerais

As cianobactérias são organismos procariontes gram-negativos fotossintetizantes. Os primeiros organismos estão registrados em fósseis que datam de cerca de 3,5 bilhões de anos, porém é entre 2,5 – 0,57 bilhões de anos que se encontra o maior número de registros de cianobactérias em estromatólitos (SCHOPF, 2000). Algumas formações modernas de estromatólitos, atualmente, podem ser vistas em regiões da África do Sul, Austrália e Bahamas (ANDRES e REID, 2006; SCHIRRMESTER et al., 2011; SCHOPF, 2000).

Estes microrganismos são considerados os pioneiros na produção de oxigênio e energia química por meio da fotossíntese, o qual ocorre pela conversão de água, dióxido de carbono e nutrientes. A eficiência na realização de fotossíntese e a absorção de luz em diferentes faixas do espectro visível se dá pela gama de pigmentos presentes na célula como a clorofila-*a*, carotenóides e ficobiliproteínas (SAINI et al., 2018). Dentre os diferentes pigmentos citados, as ficobiliproteínas (ficocianina, ficoeritrina e aloficocianina) são encontradas predominantemente nas cianobactérias (UDAYAN et al., 2017).

As cianobactérias são encontradas em diversos habitats marinhos, de água doce e terrestres como, por exemplo, fontes geotermiais, lagos hipersalinos, rios, desertos, tapetes e biofilmes microbianos e oceanos (BÜDEL et al., 2018; OREN, 2015; RAMANATHAN et al., 2013; WARD et al., 2012). Tal capacidade de adaptação à ambientes extremos é devida a capacidade de adaptação às variações nos fatores abióticos como luminosidade, radiação UV, temperatura e pH.

RIPPKA et al., 1979 apresentaram uma classificação na qual as cianobactérias eram divididas em cinco subclasses: Chroococcales, Pleurocapsales, Oscillatoriales, Nostocales e Stigonematales (KOMÁREK et al., 2014; SHESTAKOV e KARBYSHEVA, 2017). Porém, KOMÁREK et al., (2014) propuseram a classificação considerando aspectos genético-moleculares (análise filogenética), propriedades fisiológicas e morfológicas além dos critérios ecológicos. Assim, as cianobactérias foram classificadas em oito ordens: Gloeobacterales, Synechococcales, Spirulinales, Chroococcales, Pleurocapsales, Oscillatoriales, Chroococciopsidales e Nostocales. Brevemente serão abordadas as três ordens que possuem espécies predominantemente encontradas em florações de cianobactérias e são recorrentes na literatura.

Na Ordem *Nostocales*, os gêneros são representados por cianobactérias filamentosas e possuem dois tipos de células desenvolvidas: heterocistos, células especializadas e modificadas para a captura e fixação de N₂ e acinetos, células em repouso e resistentes à dessecação (KOMÁREK e JOHANSEN, 2015). Neste grupo são encontrados os gêneros *Aphanizomenon*, *Cylindrospermopsis*, *Dolichospermum* e *Nostoc* (DEMAY et al., 2019; KOMÁREK e JOHANSEN, 2015), extensivamente estudados em florações tóxicas de cianobactérias em corpos hídricos eutrofizados.

A Ordem *Chroococcales* corresponde às cianobactérias unicelulares e coloniais cocóides (KOMÁREK et al., 2014; KOMÁREK e JOHANSEN, 2015). As cianobactérias crescem como células únicas ou, ainda, podem se agrupar em colônias, podendo ser observadas à olho nu, como ocorre com florações com dominância do gênero *Microcystis* (DEMAY et al., 2019; KOMÁREK e JOHANSEN, 2015). As formas celulares são diversas, podendo ser esféricas, ovais, fusiformes, bastões, ou ainda, irregulares.

Por fim, a Ordem *Oscillatoriales* possui os gêneros *Lyngbya*, *Oscillatoria* e *Phormidium* (ANDREEVA et al., 2020; DEMAY et al., 2019; KOMÁREK et al., 2014). Estes gêneros são cianobactérias marinhas de forma filamentosa, porém, sem a presença de heterócito (PAERL, 2012) e exercem papel fundamental na produção primária costeira e estuarina. Já nos ambientes de água doce são encontrados os gêneros *Geitlerinema*, *Limnothrix*, *Planktolyngbya*, *Planktothrix* e *Pseudanabaena*, os quais já identificados nos reservatórios Billings e Guarapiranga no Estado de São Paulo (SANT'ANNA et al., 2008).

Assim como os demais organismos fitoplanctônicos, as cianobactérias necessitam de nutrientes para seu desenvolvimento, sendo o nitrogênio (N) e o fósforo (P) importantes macronutrientes disponíveis de forma limitante nos ecossistemas aquáticos quando há condições de equilíbrio ecológico e ambientais (HARPER, 1992).

2.1.2 Presença de cianobactérias em águas continentais eutrofizadas

De acordo com HARPER (1992), as fontes principais e naturais de P e N são, respectivamente, o intemperismo e desgaste de rochas que contenham fosfato e o nitrogênio gasoso (N_2) presente na atmosfera terrestre. Atualmente, o aumento na concentração destes nutrientes nos corpos de água ocorre principalmente devido a descarga de compostos nitrogenados e fosfatados nos corpos hídricos, oriundos da atividade humana como a atividade agrícola e o uso de fertilizantes e do despejo de efluentes domésticos e industriais sem tratamento. A sobrecarga de nutrientes nos corpos hídricos tem como resultado a alteração dos ciclos biológicos nesses sistemas aquáticos afetados.

Durante o processo de eutrofização, mudanças na composição fitoplanctônica são observadas, geralmente com a dominância de cianobactérias nesses sistemas. DOKULIL e TEUBNER, (2000) apresentaram uma revisão sobre os principais fatores que podem estar relacionados à recorrente predominância de cianobactérias nestes ambientes eutrofizados. Os autores citam diversos fatores, dentre eles a concentração de nutrientes, profundidade do lago, temperatura, luminosidade e capacidade de mistura da coluna d'água, além da complexidade da cadeia trófica.

Como resultado da combinação entre a floração e a dominância de cianobactérias, há o risco de que esses microrganismos produzam diversos metabólitos secundários tóxicos - cianotoxinas e que, caso encontrados em altas concentrações, afetam a qualidade da água, com periculosidade à saúde humana e animal.

2.1.3 Cianotoxinas

Os metabólitos secundários são aqueles que não são utilizados para as atividades primárias, crescimento celular ou na produção de energia, por exemplo, e podem ser caracterizados como tóxicos ou não-tóxicos. Os não-tóxicos possuem uma ampla atuação na regulação celular como hormônios e função antibiótica (SVRCEK e SMITH, 2004). No entanto, os metabólitos secundários tóxicos, as cianotoxinas, especula-se que são biosintetizados e utilizados como defesa contra predadores e patógenos (SIVONEN e JONES, 1999; VAN DONK et al., 2011). Estes pertencem a três classes químicas: peptídeos cíclicos, alcalóides e lipopolissacarídeos.

Por serem metabólitos secundários, estas são geralmente encontradas em concentrações intracelulares, embora possa ser liberada para o corpo d'água por

rompimento e morte celular (SANT'ANNA et al., 2008; WOOD, 2016). Em situações de florações pode ocorrer altas concentrações da toxina em níveis extracelulares.

De acordo com SANSEVERINO et al., (2017), as cianotoxinas podem ser classificadas em quatro categorias de acordo com seu alvo toxicológico em vertebrados: neurotoxinas (anatoxina-a, homoanatoxina-a, guanitoxina, saxitoxina e β -metilamino-L-alanina), dermatotoxinas (lipopolissacarídeos, lyngbyatoxinas e aplisiatoxinas), citotoxinas (cilindrospermopsina) e hepatotoxinas (microcistinas e nodularinas).

2.1.3.1 Neurotoxinas

As neurotoxinas são produzidas por cianobactérias dos gêneros *Dolichospermum*, *Plankothrix*, *Oscillatoria*, *Aphanizomenon*, *Trichodesmium*, *Nostoc* e *Lyngbya* (CARMICHAEL, 1992; SANSEVERINO et al., 2017; SIVONEN e JONES, 1999).

Atualmente, seis neurotoxinas são conhecidas e são elas: anatoxina-a, homoanatoxina-a (toxina homóloga da anatoxina-a), guanitoxina, saxitoxina (ou PSP – paralytic shellfish toxin), neosaxitoxina e β -metilamino-L-alanina (BMAA) (CARMICHAEL, 1992; SANSEVERINO et al., 2017; SIVONEN e JONES, 1999). Conforme CARMICHAEL (1992), as neurotoxinas atuam no bloqueio neuromuscular e a depender da dose de intoxicação podem ocasionar parada respiratória, paralisia muscular, respiração abdominal exagerada e, em casos extremos, a morte.

2.1.3.2 Dermatotoxinas

As dermatotoxinas lipopolissacarídeos (LPS) são produzidas por todos os gêneros de bactérias gram-negativas, dentre as quais as cianobactérias estão inseridas, pois trata-se de um componente proteico presente na membrana externa e são capazes de causar irritação na pele e alergias (SANSEVERINO et al., 2017). As lyngbyatoxinas e aplisiatoxinas ocasionam dermatite aguda, enquanto que esta, ainda, possui indício na formação de tumores (SANSEVERINO et al., 2017).

2.1.3.3 Citotoxinas

A cilindrospermopsina (CYN) é biosintetizada pelos gêneros *Cylindrospermopsis*, *Aphanizomenon* e *Raphidiopsis* (SANSEVERINO et al., 2017). De acordo com CARMICHAEL (1992), apresentam um amplo espectro de bioatividade contra algas, bactérias e fungos, e já são encontradas evidências de bioacumulação em moluscos,

crustáceos e peixes com a detecção desta toxina em diversos órgãos de organismos aquáticos (SCARLETT et al., 2020). As CYN são classificadas como citotoxina, pois possui ações hepatotóxicas e neurotóxicas. A sua genotoxicidade ocorre após a ativação metabólica da toxina por enzimas do citocromo P-450 (SANSEVERINO et al., 2017). Além do fígado, outros órgãos como rim baço e pulmões, também podem ser afetados (SIVONEN, 2009).

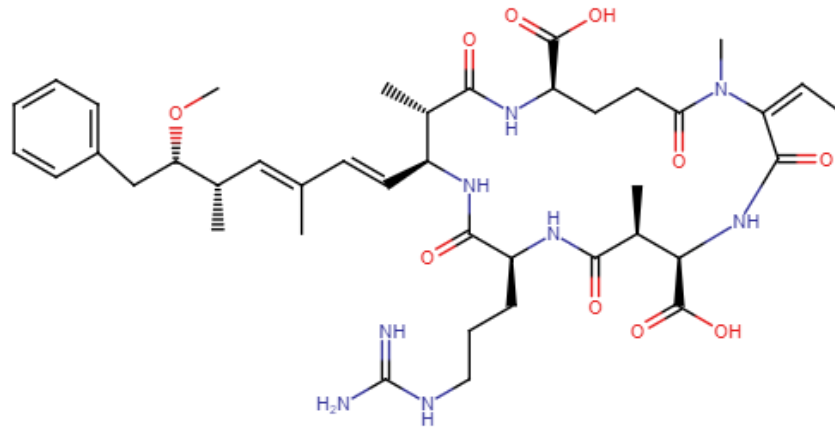
2.1.3.4 Hepatotoxinas

As hepatotoxinas são absorvidas no intestino delgado e por meio de transportadores de ácido biliar na parede intestinal são carregados e acumulados nos hepatócitos (CARMICHAEL, 1992; VAN DER MERWE, 2014). Além disso, atuam como inibidores das fosfatases PP1 e PP2A, os quais são importantes na regulação metabólica celular (VAN DER MERWE, 2014). Os sinais de intoxicação por hepatotoxinas incluem fraqueza, anorexia, vômitos e diarreia (CARMICHAEL, 1992), além de serem responsáveis por promoverem tumores hepáticos (SANSEVERINO et al., 2017). As hepatotoxinas compreendem as nodularinas (NOD) e microcistinas (MC), ambos peptídeos cíclicos com estruturas moleculares e mecanismos de ação similares (SANSEVERINO et al., 2017).

2.1.3.5 Nodularinas (NOD)

Essas hepatotoxinas são produzidas por espécies de cianobactérias encontradas nos gêneros *Nodularia* e *Nostoc*, sendo a espécie *Nodularia spumigena* a principal produtora dessa toxina (BURATTI et al., 2017; SANSEVERINO et al., 2017). São pentapeptídeos cíclicos e possuem cinco aminoácidos, com estrutura molecular (Figura 1) similar à da MC, com a fórmula geral ciclo(D-MeAsp¹-L-arginine²-Adda³-D-Glutamate⁴-Mdhb⁵) e apresentada na Figura 1 (BURATTI et al., 2017).

Figura 1 - Estrutura química geral da hepatotoxina NOD. Posição (1) D-MeAsp; (2) L-arginine; (3) Adda; (4) D-Glu e (5) Mdhb. A molécula foi desenhada por meio do software Marvin 21.2.0, 2021, ChemAxon.



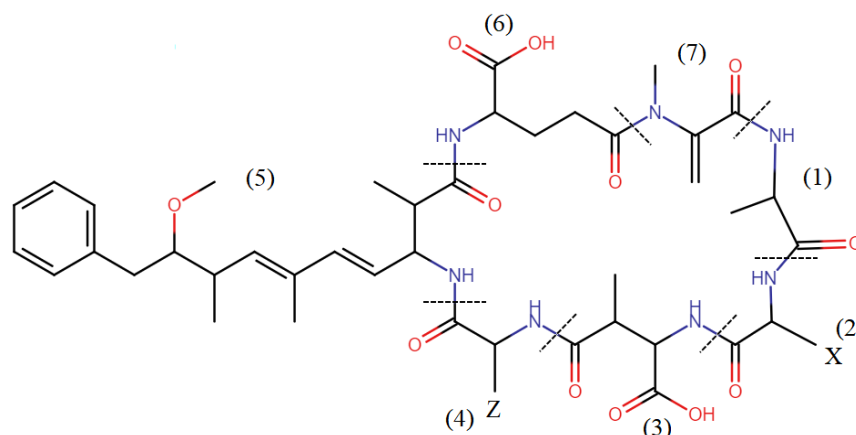
Fonte: autora da dissertação.

Devido à similaridade molecular com MC, as intoxicações por NOD são muito semelhantes às apresentadas por MC, porém as NOD possuem cinética de produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e danos oxidativos ao DNA mais rápida comparativamente à MC-LR (BURATTI et al., 2017).

2.1.3.6 Microcistinas (MC)

São heptapeptídeos cíclicos e são produzidos por diversas espécies de cianobactérias dos gêneros *Dolichospermum*, *Anabaenopsis*, *Aphanizomenon*, *Microcystis*, *Nostoc* e *Oscillatoria* (BURATTI et al., 2017; SIVONEN e JONES, 1999). As MC possuem a fórmula geral ciclo(D-Ala¹-X²-D-MeAsp³-Z⁴-Adda⁵-D-Glut⁶-Mdha⁷) (CHORUS e WELKER, 2021), como apresentado na Figura 2.

Figura 2 - Estrutura química geral da hepatotoxina MC. Posição (1) D-Ala é D-alanina; (2) X; (3) D-MeAsp é ácido D-eritro- β -methilaspartic; (4) Z; (5) Adda; (6) D-Glu é ácido D-glutamato e (7) Mdha é N-metilhidroalanina. A molécula foi desenhada por meio do software Marvin 21.2.0, 2021, ChemAxon.



Fonte: autora da dissertação.

De acordo com CHERNOFF et al., (2020) em florações de cianobactérias nos EUA, há a predominância das variantes MC-RR e MC-LR, embora em algumas florações ocorra maiores concentrações de MC-LA e MC-YR. Além disso, a MC-LR é o congêneres mais comum e mais estudado, devida a sua alta ocorrência nos *blooms* e toxicidade (BURATTI et al., 2017) embora, nessas ocasiões, diversas variantes são detectadas juntas. De acordo com BOUAICHA et al. (2019), a grande quantidade de microcistinas existentes (cerca de 270 variantes) se dá a partir da variação estrutural em praticamente todos os sete aminoácidos presentes na molécula, sendo mais frequente a variação dos aminoácidos nas posições 2 e 4 (X e Z, respectivamente) e a desmetilação de aminoácidos nas posições 3 (D-MeAsp) e/ou 7 (Mdha).

2.1.4 Ecotoxicidade de cianobactérias e suas cianotoxinas

Em estudos de toxicidade, têm sido demonstrado que as cianotoxinas podem ser tóxicas à organismos de diferentes níveis tróficos e com a tendência de bioacumulação em invertebrados e vertebrados, além de biomagnificação (FERRÃO-FILHO e KOZLOWSKY-SUZUKI, 2011; HARDY et al., 2015; SCARLETT et al., 2020). A intoxicação por cianotoxinas possui duas vias: direta e indireta. A intoxicação direta ocorre pela ingestão, inalação de partículas e o contato dermal. Enquanto que a intoxicação indireta acontece pelo consumo de animais e plantas que possuem a toxina acumulada.

Diversos estudos reportam que a presença e diferentes concentrações de cianotoxinas no ambiente aquático provocam efeitos na biodiversidade, além de inibição de crescimento e reprodução em diversos organismos aquáticos como bactérias,

zooplânctons e peixes (NIZAN et al., 1986; LÓPEZ FLORES et al., 2010; SUN et al., 2021).A exposição às florações de cianobactérias pode afetar desde a alimentação do organismo analisado, como apresentado por NIZAN et al., (1986) que utilizou diferentes espécies de dafnídeos em seus estudos, até respostas em processos bioquímicos como aquele avaliado por ESTERHUIZEN-LONDT et al., (2016) na espécie *Daphnia pulex*.

Para as bactérias, a compreensão sobre os mecanismos de ação das cianotoxinas ainda é escasso. Em estudo recente de PRASATH et al., (2019), os autores demonstraram a viabilidade do sistema Microtox® com *Vibrio fischeri* para a detecção de cianotoxinas em florações de cianobactérias a partir da inibição de bioluminescência na bactéria marinha. O método apresentado se mostrou viável para esse tipo de análise, uma vez que os resultados apresentaram boa correlação entre a hepatotoxina MC purificada e os extratos de amostras de campo utilizados.

Para organismos zooplanctônicos, há diversos estudos relatando os efeitos de cianobactérias e cianotoxinas. Porém, quando utilizamos como exemplo os ensaios de toxicidade com diferentes espécies expostos à hepatotoxina isolada MC-LR (a variante de maior ocorrência), os resultados mostram-se com grande variação, conforme é apresentado na Tabela 1.

Tabela 1 - Ensaios de toxicidade com exposição de organismos-modelo à hepatotoxina MC-LR.

Organismo modelo		Resultado (mg·L ⁻¹)	Referência
<i>Diaptomus birgei</i>	CL50(24h)	1,10 (0,76-1,56)	DEMOTT et al., (1991)
	CL50(48h)	1,0 (0,69-1,46)	
<i>Daphnia pulicaria</i>	CL50(24h)	>50	
	CL50(48h)	21,4 (16,8-29,2)	
<i>Daphnia hyaline</i>	CL50(24h)	34,2 (25,2-53,4)	
	CL50(48h)	11,6 (7,0-15,6)	
<i>Daphnia pulex</i>	CL50(24h)	10,7 (8,2-13,7)	
	CL50(48h)	9,6 (7,8-11,7)	
<i>Eurytemora affinis</i>	CL50(48h)	1,55	GER et al., (2009)
	CL10(48h)	0,14	
<i>Pseudodiaptomus forbesi</i>	CL50(48h)	0,52	
	CL10(48h)	0,21	
<i>Hydra magnipapillata</i>	CL50(24h)	12,158	HU et al., (2011)
	CL50(48h)	4,029	
	CL50(72h)	1,799	

Fonte: autora da dissertação.

Quando analisados os extratos brutos de cianobactérias, há também variação entre os resultados obtidos. HERRERA et al., (2015) utilizaram as espécies *Moina micrura*, *Daphnia laevis* e *Daphnia similis* para avaliar as toxicidade aguda e crônica de seis extratos de *Microcystis* de dois reservatórios colombianos. A partir dos resultados obtidos os autores concluíram que espécies de diferentes localidades e à exposição prévia à toxina diferem significativamente na resposta fisiológica e podem até apresentar uma adaptação na tolerância as toxinas e células de cianobactérias que se formam nas florações.

DEMOTT et al., (1991) mostraram que a sensibilidade à MC-LR variou entre as diferentes espécies avaliadas, sendo que a *Daphnia pulicaria* se mostrou a menos sensível dentre todas analisadas, uma vez que a concentração obtida nos ensaios de toxicidade aguda foi de CL₅₀ (48h) 21,4 mg·L⁻¹ (21.400 µg·L⁻¹), valor muito maior que o recomendado pela Organização Mundial da Saúde (OMS), a qual considera o limite de 1 µg·L⁻¹ da mesma hepatotoxina em água potável. Ainda no mesmo estudo, os autores

mostraram que embora a espécie não seja sensível à toxina, a mesma apresentou inibição na alimentação quando exposta à cianobactéria *Microcystis aeruginosa*.

Em estudo conduzido por ESTERHUIZEN-LONDT et al., (2016) percebeu-se que a espécie *Daphnia pulex* não se mostrou sensível quando exposta ao extrato bruto de uma floração de cianobactérias e nem a mistura comercial de cianotoxinas. Porém, houve estresse enzimático nas duas exposições, sendo necessário um maior tempo de recuperação do organismo para a diminuição de peróxido de hidrogênio celular quando exposto à mistura comercial.

2.2 Legislação e tratamento de cianotoxinas

2.2.1 Legislação

Como previamente mencionado, a OMS estabelece que o valor máximo aceitável para a concentração de MC-LR em água potável é $1 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. Este valor é utilizado como padrão em diversos países para o controle e monitoramento desta hepatotoxina em água, como ocorre no Brasil e será discutido adiante.

Na Austrália, há regulação para o monitoramento e controle de cianobactérias em água potável. Neste caso, o limite estipulado pela regulamentação estipula valor crítico no número de células de cianobactérias presentes na água, considerando aceitável a densidade celular de 6500 cel mL^{-1} e limite alvo de 1000 cel mL^{-1} . Além disso, o monitoramento deve ocorrer regularmente nos períodos em que é observado o aumento na densidade celular, como ocorre geralmente no verão (NHMRC, 2011).

Já no Brasil, duas regulamentações acerca dos padrões da qualidade da água e critérios de potabilidade apontam considerações sobre a presença de cianotoxinas e/ou presença de cianobactérias no corpo hídrico: CONAMA 357 e Portaria GM/MS n° 888.

O Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA), a partir da Resolução CONAMA 357 estabelece os padrões de qualidade da água a diferentes classes, classificadas a partir de sua destinação/usos. Nesta classificação, são analisadas 3 classes de água e nestas são determinados valores de densidades de cianobactérias para garantir a proteção da saúde e bem-estar humano. Assim, há três limites máximos de densidade celular para cianobactérias, de acordo com classe do corpo d'água: Classe 1, os quais destinam-se ao abastecimento para consumo humano pós tratamento simplificado, dentre outros, o limite máximo aceitável (LMA) é de densidade máxima de cianobactérias de $20.000 \text{ células}\cdot\text{mL}^{-1}$. Para corpos hídricos de Classe 2, destinadas ao abastecimento para

consumo humano pós tratamento convencional além dos outros usos, é estabelecido densidade celular máxima de cianobactérias de $50.000 \text{ células}\cdot\text{mL}^{-1}$. Por fim, a Classe 3, considera densidade celular máxima de cianobactérias de $100.000 \text{ células}\cdot\text{mL}^{-1}$ (CONAMA, 2005).

Já o Ministério da Saúde por meio da Portaria GM/MS nº 888 de 04 de maio de 2021, estabelece os limites de controle e vigilância dos padrões da qualidade da água para o consumo humano e potabilidade (BRASIL, 2021). A portaria em vigor estabelece limites máximos aceitáveis (LMA) para três tipos de cianotoxinas: MC total, CYN e STX.

De acordo com esta regulamentação, é determinado que ocorra o monitoramento mensal em todos os pontos de captação de água do manancial quando o número de células de cianobactérias não exceder $10.000 \text{ células}\cdot\text{mL}^{-1}$ e, semanalmente quando o número de células de cianobactérias exceder este valor. Quando ocorrer um valor maior que $20.000 \text{ células}\cdot\text{mL}^{-1}$ deve ser realizada a análise semanal das cianotoxinas microcistinas, saxitoxinas e cilindrospermopsinas. Além disso, deve-se identificar os gêneros de cianobactérias presentes. Para as cianotoxinas, a Portaria estabelece o LMA de $3,0 \mu\text{g L}^{-1}$ para STX. Já para CYN e MC total o LMA é o mesmo para ambas, sendo estabelecida a concentração de $1,0 \mu\text{g L}^{-1}$ para mananciais superficiais.

Em diversos países, incluindo o Brasil, o tratamento de água convencional consiste em duas fases: física e química, as quais estão inseridas as etapas de coagulação, floculação, sedimentação e filtração. Na etapa química, os oxidantes mais comumente utilizados são: cloro, dióxido de cloro, peróxido de hidrogênio, ozônio e permanganato (SHARMA et al., 2012). Porém, de acordo com EPA (2014), o uso de oxidantes, por exemplo sulfato de cobre e ozônio, oferecem risco para a ruptura celular e consequente liberação de toxinas para a água. O mesmo risco é observado para o uso do cloro no tratamento da água, uma vez que, dependendo da concentração utilizada, possui o agravante de possível formação de subprodutos na água com toxicidade equivalente ou maior que a de cianotoxinas, além da alta toxicidade em sua manipulação.

No entanto, processos como ozonização e o uso de peróxido de hidrogênio ativado, quando aplicados de forma adequada, podem resultar em importante degradação do contaminante alvo, como observado na literatura. Esses oxidantes fazem parte dos chamados processos oxidativos avançados (POA), que têm sido amplamente estudados como tratamentos alternativos e ecologicamente viáveis para a remoção destas toxinas na água, uma vez que os tratamentos convencionais utilizados atualmente não são totalmente eficazes na remoção das cianotoxinas quando encontrados em concentrações relevantes.

Muito embora a preservação e a não ocorrência de cianobacterias em demasia seria a melhor opção.

2.2.2 Processos Oxidativos Avançados (POA)

Os Processos Oxidativos Avançados (POA) são caracterizados pela produção de radicais hidroxila ($\text{HO}\cdot$), espécies transitórias altamente oxidantes e não seletivas em sua oxidação. A formação de $\text{HO}\cdot$ de forma não seletiva possibilita a mineralização de compostos orgânicos, quando ocorre de forma completa, em dióxido de carbono (CO_2) e água (SHARMA et al., 2012).

Dentre os POA existentes, destacam-se o Fenton, o foto-Fenton, UV/ H_2O_2 , ozonização, radiação ionizante, dentre outros. Na Tabela 2 estão exemplificadas alguns POA e suas principais reações na geração de radicais hidroxila.

Tabela 2 - Processos oxidativos avançados e suas principais reações químicas para a geração de radicais e H₂O₂.

POA	Principais reações
Fenton	<p>Reação Fenton:</p> $\text{Fe}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{Fe}^{3+} + \text{OH}^- + \text{HO}\cdot$ <p>Regeneração do íon ferroso:</p> $\text{Fe}^{3+} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{Fe}^{2+} + \text{H}^+ + \text{HO}_2\cdot$
Foto-Fenton	<p>Semicondutor fotólise:</p> $\text{H}_2\text{O}_2 + h\nu \rightarrow 2\text{HO}\cdot (\lambda < 300 \text{ nm})$ <p>Regeneração do íon ferroso:</p> $\text{Fe}(\text{OH})^{2+} + h\nu \rightarrow \text{Fe}^{2+} + \text{HO}\cdot (\lambda < 450 \text{ nm})$
UV/H ₂ O ₂	$\text{H}_2\text{O}_2 + h\nu \rightarrow 2\text{HO}\cdot$
Ozônio	O_2
Método sonoquímico	Dissociação termal da água em presença de ultrassom:
Radiação ionizante	$\text{H}_2\text{O} + \gamma \rightarrow \text{HO}\cdot + \text{H}\cdot$ <p>Radiólise da água:</p> $\text{H}_2\text{O} \rightarrow (2,6)\text{e}^-_{\text{aq}} + (0,6)\text{H}\cdot + (2,7)\text{HO}\cdot + (0,07)\text{H}_2\text{O}_2 + (2,6)\text{H}_3\text{O}^+ + (0,45)\text{H}_2$

Fonte: BABU et al., (2019).

2.2.3 Radiação ionizante

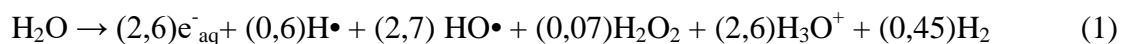
A radiação ionizante é a energia, sob a forma de onda ou partícula, necessária para remover ou ionizar elétrons de um átomo ou molécula (CHMIELEWSKI, 2005). A existência das radiações ionizantes ocorre desde o início do universo, sendo, portanto, um fenômeno natural. Na Terra, teve função essencial na formação de elementos químicos essenciais para o início da vida no planeta, como por exemplo hidrogênio, oxigênio e nitrogênio (SCOTT, 2014).

A radiação ionizante é encontrada sob duas formas: particulada, a qual inclui as partículas alfa (α), partículas betas (β), pósitrons, nêutrons, prótons e íons pesados, e na forma de radiação eletromagnética incluindo os raios-X e gama (γ) (SCOTT, 2014). A utilização da radiação ionizante de forma comercial é realizada a partir de fontes de radioisótopos artificiais de radiação gama e aceleradores de elétrons para irradiação por feixe de elétrons. Os irradiadores com fontes de ⁶⁰Co (em alguns casos ¹³⁷Cs) são utilizados para a esterilização de dispositivos médicos e alimentos devida à alta

penetrabilidade do raio γ , enquanto que os irradiadores por feixe de elétrons têm sua tecnologia voltada para a indústria e sua aplicabilidade depende da energia do acelerador.

Durante o processo de radiação, a energia transferida para a matéria irradiada é definida como “dose absorvida”, a qual é a responsável pela produção de íons e espécies excitadas na matéria irradiada e, por consequência, na indução química da radiação (WOODS, 1998). A unidade internacional de dose absorvida é o joule por quilograma ($\text{J}\cdot\text{kg}^{-1}$) ou Gray (Gy).

Quando a radiação ionizante é aplicada em matrizes aquosas, a degradação de compostos orgânicos ocorre pelo processo de radiólise da água (Equação 1) no qual há a formação de radicais de espécie oxidativa ($\text{HO}\bullet$) e redutiva ($\text{H}\bullet$, e^-_{aq}) (KURUCZ et al., 1995; SMIETANKO-CHMIELEWSKA e CHMIELEWSKI, 2011). A molécula do composto orgânico reage com os radicais formados e com a molécula de H_2O_2 .



Na equação, o valor do rendimento (G) é determinado para 100 eV de energia absorvida e estão indicados com os valores entre parênteses. Este valor significa o número de radicais, moléculas ou íons que são formados (ou destruídos) em uma solução.

2.2.4 Irradiação por feixe de elétrons

Os aceleradores de elétrons são categorizados em três tipos: baixa, média e alta energia, os quais são definidos de acordo com a energia do acelerador. A aplicação industrial do acelerador ocorre de acordo com a finalidade com que se destinará seu uso, conforme apresentado na Tabela 3.

Tabela 3 - Classificações, energia utilizada e principais aplicações de aceleradores de elétrons na indústria.

Classificação (energia)	Energia (keV a MeV)	Aplicações
Baixa	150 keV a 300 keV	Cura de tintas e vernizes; Revestimento em papéis; Circuitos eletrônicos; Desinfestação de sementes.
Média	300 keV a 5 MeV	Tratamento de gases de combustão; Esterilização de tecidos humanos; Produção de nanopartículas por eletrocatalisadores; Crosslink para reticulação de fios e cabos.
Alta	5 MeV a 10MeV	Esterilização de produtos médicos; Enriquecimento de pedras preciosas; Tratamento de efluentes industriais e domésticos; Preservação e desinfestações de alimentos.

Fonte: CALVO et al. (2012); WOODS (1998).

O uso de aceleradores de elétrons para o tratamento de efluentes têxteis se mostrou promissor com a construção de uma planta-piloto em Miami, Flórida, EUA, no ano de 1988 (KURUCZ et al., 1995). O tratamento consistia na combinação entre feixe de elétrons (acelerador com energia fixada em 1 MeV e força de feixe de 40 kW) e tratamento biológico para a purificação do efluente têxtil sob fluxo contínuo, obtendo decréscimo na concentração total de poluentes após o tratamento biológico, influenciada pelo tratamento primário pelo feixe de elétrons, resultante na conversão radiolítica do ácido tereftálico, principal poluente do efluente. Hoje essa unidade já está descomissionada.

No Brasil, diversos estudos demonstraram a eficiência da irradiação por feixe de elétrons no tratamento de poluentes complexos como efluentes domésticos (SAMPA et al., 1995), esgotos e lodo (BORRELY et al., 1998), fármacos (SILVA et al., 2016; TOMINAGA et al., 2018) e efluente têxtil (GARCIA et al., 2020).

BORRELY et al., (1998), por meio do tratamento por feixe de elétrons reduziu a contagem total de bactérias em amostras de lodo resultante do tratamento de esgotos. As contagens iniciais de bactérias estavam no intervalo de $2,0 \times 10^7$ até $2,6 \times 10^9 \cdot g^{-1}$. Após o tratamento das amostras com doses na faixa entre 4,0 e 10,0 kGy, obteve-se uma redução de 3 a 5 ciclos log nas contagens totais de bactérias. Já com amostras irradiadas com 15,0

kGy estas resultaram em um nível considerável de higienização, com contagens inferiores a 10 colônias, formando unidades por mililitro em 17 amostras avaliadas.

Para o tratamento de efluentes têxteis GARCIA et al., (2020) indicaram que a aplicação de doses entre 2,5 e 10 kGy para o tratamento do corante Red 239 foram responsáveis pela redução significativa na toxicidade para a bactéria marinha *Vibrio fischeri* e microcrustáceo *Daphnia similis* e, também, na redução de 95% na coloração do efluente após irradiação com 5 kGy.

2.2.5 Tratamento de cianotoxinas e cianobactérias

Estudos visando a aplicação da irradiação por feixe de elétrons no tratamento de cianotoxinas e controle de cianobactérias são escassos, embora os resultados se mostraram promissores para o controle deste poluente.

A primeira aplicação de feixe de elétrons para o controle de microalgas e cianobactérias foi publicado por KANG (2004). O autor avaliou as espécies de água doce *Chlorella sp.*, *Scenedesmus sp.*, *Microcystis sp.*, *Dolichospermum sp.* (antiga *Anabaena sp.*), *Oscillatoria sp* e as espécies marinhas *Prorocentrum micans*, *Prorocentrum minimum*, *Scrippsiella trochoidea*, *Lingulodinium polyedra* e *Cochlodinium polykrikoides* e os efeitos da radiação na atividade fotossintética e danos celulares pós irradiação com doses de 1 a 10 kGy. Os resultados mostraram uma diminuição de 40% na atividade fotossintética para *Microcystis sp.* após ser irradiada com 3 kGy, enquanto que espécies de microalgas marinhas obtiveram o mesmo resultado quando expostos à dose de 1 kGy.

LIU et al., (2014) usaram a irradiação com feixe de elétrons para investigar a inibição de *M. aeruginosa*. Após 11 dias do processamento por radiação, a eficiência de remoção foi de 91 e 84% para 4,0 e 5,0 kGy, respectivamente, quando comparados ao controle. A taxa de fotossíntese diminuiu significativamente com doses entre 2 e 5 kGy. No estudo, os danos causados pelo feixe de elétrons nas cianobactérias e posteriormente observados nas enzimas antioxidantes demonstraram que as células não sobreviveram após a exposição à radiação.

Em outro estudo conduzido pelos mesmos autores, LIU et al., (2015) estudaram os efeitos do feixe de elétrons no controle de *M. aeruginosa* e na degradação de MC-LR. Houve flutuação na concentração intercelular de MC-LR nas doses entre 2 e 5 kGy, indicando que há uma dose apropriada de feixe de elétrons capaz de inibir a produção de MC intracelular. A remoção da concentração total de MC foi de 72,1% quando a dose de 5 kGy foi empregada.

KIM e PONOMAREV (2021) estudaram a exposição das microalgas marinhas tóxicas *Cochlodinium polykrikoides* e *Alexandrium catenella* às doses de radiação de até 1 kGy. Foi observado que a dose de 1 kGy foi responsável pela mortalidade de cerca de 79,0% e 82,0% nas amostras de *Cochlodinium polykrikoides* e *Alexandrium catenella*, respectivamente. Para a espécie *Alexandrium catenella*, a concentração de compostos tóxicos foi de 41,34 para 16,21 fmol·cel⁻¹ na exposição da cultura em 0,3 kGy, enquanto que a neurotoxina neo-STX, teve um decréscimo de 84% quando a microalga foi exposta a 1 kGy.

2.3 Detoxificação de cianotoxinas em meio aquoso por POA

A utilização de POA têm se provado viável devido ao sucesso da degradação de uma variedade de efluentes industriais, pesticidas, efluentes da indústria têxtil, produtos farmacêuticos, dentro outros (BABU et al., 2019; SMIETANKO-CHMIELEWSKA e CHMIELEWSKI, 2011). No entanto, em alguns casos, durante a utilização do processo pode haver a formação de compostos finais ou intermediários tóxicos. Dessa forma, espera-se que testes de toxicidade sejam utilizados como ferramenta na avaliação da detoxificação do efluente após o tratamento por POA.

Assim, os ensaios ecotoxicológicos têm suma importância na observação de efeitos agudo e crônico do composto formado ao organismo-modelo, sendo o efeito agudo a letalidade ou alguma outra manifestação do organismo como, por exemplo, a imobilidade do organismo modelo. Enquanto que o efeito crônico é observado em um longo período do ciclo de vida do organismo, apresentando alterações no metabolismo, crescimento, reprodução, e até mesmo morte dos organismos após longos períodos de exposição, normalmente envolvendo concentrações inferiores àquelas que demonstraram efeito no nível agudo (ZAGATTO e BERTOLETTI, 2008).

RIZZO (2011) apresentou uma revisão crítica sobre os efeitos dos POA sobre a toxicidade de diferentes classes de contaminantes (fármacos, efluentes têxteis, pesticidas e a cianotoxina MC) a diferentes tipos de organismos-modelo encontrados na literatura (invertebrados, microalgas, bactérias e peixes). Especificamente para a hepatotoxina MC, o autor analisou sobre a utilização de fotocatalise com TiO₂ e ozônio na detoxificação das amostras analisadas.

Mais recentemente, LIRA et al., (2017) utilizaram ultrassom para a degradação da hepatotoxina MC e neurotoxina STX e avaliações de ecotoxicidade com o microcrustáceo *Ceriodaphnia dubia*. De acordo com os resultados apresentados pelos

autores, nas amostras sem tratamento houve diminuição na reprodução do organismo mesmo quando utilizado a menor concentração das toxinas MC e STX permitidas por lei, 1 e 3 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, respectivamente. Para as amostras tratadas com ultrassom, as mortalidades não foram significativas em nenhuma das concentrações testadas.

No tratamento de cianotoxinas e remediação de cianobactérias por radiação ionizante, FOLCIK e PILLAI (2020) apresentaram uma revisão crítica sobre os principais trabalhos até então publicados. Os autores discorrem sobre a necessidade de desenvolvimento de pesquisa e a necessidade de diferentes abordagens para que ocorra um melhor entendimento sobre os caminhos da degradação de cianotoxinas, em especial a MC-LR, e a aplicação de feixe de elétrons. Ainda é enfatizada a necessidade de ensaios de toxicidade com os produtos da degradação para que sejam melhores compreendidos a viabilidade da aplicação desta tecnologia.

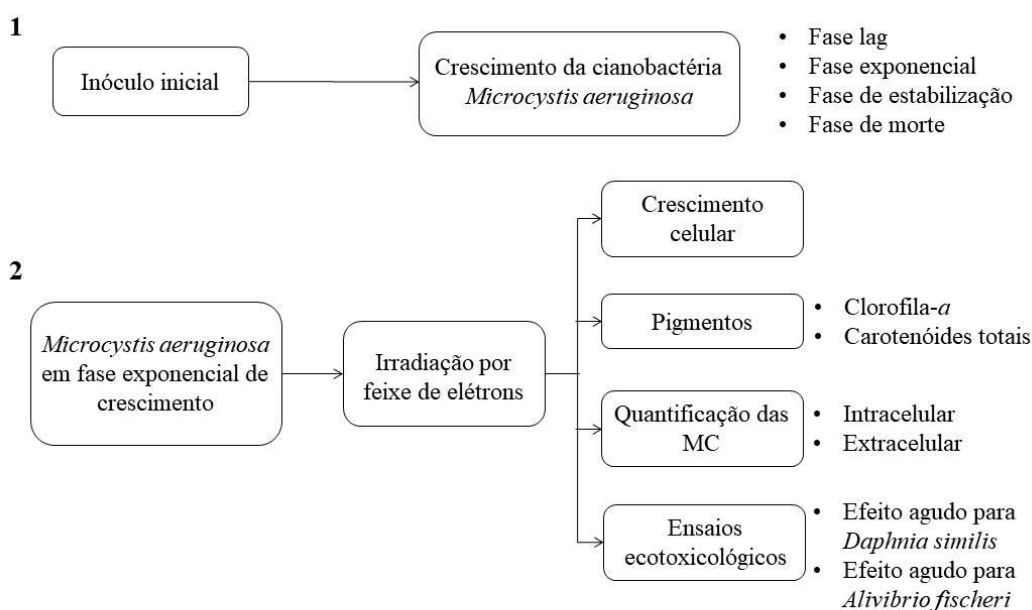
A partir do exposto, ressalta-se que não há, até o momento, estudos em que investigam a aplicação de feixe de elétrons na degradação de cianotoxinas e os efeitos da radiação no extrato de cianobactérias com a avaliação da detoxificação dessas amostras. Desse modo, espera-se que este trabalho possa contribuir para um melhor entendimento na aplicação desta tecnologia no tratamento deste contaminante ambiental.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Os estudos foram conduzidos com a cianobactéria *Microcystis aeruginosa* (CCIBt 3454) pertencente à coleção de cultura de algas do Núcleo de Pesquisa em Ficologia do Instituto de Botânica – SP e obtida por meio do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP. A amostra foi coletada na Represa Billings – estado de São Paulo, em janeiro de 2011 (JACINAVICIUS et al., 2016).

A presente pesquisa foi conduzida em duas fases, conforme apresentada na Figura 3, e a metodologia utilizada para cada uma dessas fases é apresentada a seguir.

Figura 3 - Fluxograma de Fases do desenvolvimento da pesquisa: 1) Implementação do cultivo da cianobactéria no LEBA e 2) Irradiação por feixe de elétrons na suspensão de cianobactérias.



Fonte: autora da dissertação

3.1 Implementação do cultivo e manutenção da cianobactéria

A cultura monoespecífica de *M. aeruginosa* estabelecida no Laboratório de Ensaio Biológicos e Ambientais–LEBA no IPEN/CNEN-SP seguiu o seguinte protocolo: cultura mantida em incubadora modelo Q315F25 (Quimis®) com fotoperíodo de 14 h luz:10 h escuro, irradiância de $56 \pm 3,5 \mu\text{mol photons}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ e temperatura controlada em $24 \text{ }^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$. O meio de cultivo utilizado foi o ASM–1, preparado a partir das quatro

soluções-estoque de acordo com GORHAM et al. (1964), conforme apresentado na Tabela 4.

Tabela 4 - Solução, reagentes, quantidade (g) e modo de preparo correspondente às soluções-estoque (mL) para o meio de cultivo ASM-1.

Solução	Reagente	Quantidade (g)	Preparo
A	NaNO ₃	1,7	Reagentes dissolvidos em água
	MgSO ₄ .7H ₂ O	0,49	destilada em balão volumétrico de
	MgCl ₂ .6H ₂ O	0,41	200 mL
	CaCl ₂ .2H ₂ O	0,29	
B	KH ₂ PO ₄	0,68	Reagentes dissolvidos em água
	Na ₂ HPO ₄ .12H ₂ O	1,79	destilada em balão volumétrico de 100 mL
C	H ₃ BO ₃	2,84	Reagentes dissolvidos em água
	MnCl ₂ .4H ₂ O	1,39	destilada em balão volumétrico de
	FeCl ₃ .6H ₂ O	1,08	100 mL
	ZnCl ₂	0,335	
	CoCl ₂ .6H ₂ O	0,019	
	CuCl ₂ .2H ₂ O	0,0014	
D	EDTA (C ₁₀ H ₁₄ N ₂ Na ₂ O ₈ .2H ₂ O)	1,86	Reagentes dissolvidos em água destilada em balão volumétrico de 100 mL

Fonte: autora da dissertação.

O meio de cultivo foi preparado a partir da adição das soluções-estoque com as seguintes proporções para cada litro: 20 mL de solução-estoque A, 2 mL de solução-estoque B, 0,1 mL de solução-estoque C e 0,4 mL de solução-estoque D. O pH foi ajustado para 8,0 com soluções de NaOH 1M e HCl 1M.

Uma cultura matriz foi mantida em erlenmeyer de 125 mL com volume de 100 mL de meio de cultivo, e fechado com rolhas de algodão e gaze, sendo a cepa repicada mensalmente em prazo máximo de 25 dias. Para os procedimentos de manutenção e análise, todos os materiais e o meio de cultura foram esterilizados em autoclave a 121 °C e pressão de 1,5 atm por 30 min.

3.2 Determinação do crescimento de *M. aeruginosa*

Os ensaios para a verificação dos efeitos da radiação por feixe de elétrons no cultivo da cianobactéria *M. aeruginosa* iniciaram-se pela determinação do crescimento da cianobactéria em laboratório nas condições (laboratoriais) descritas anteriormente. A caracterização das quatro fases: lag, exponencial, estabilização e morte se tornaram referência para os demais ensaios realizados.

Para a confecção da curva de crescimento, durante todo o período de 30 dias, foi retirada uma alíquota de 100 µL e fixada em solução lugol 5 %. As alíquotas foram transferidas por capilaridade para a câmara de Fuchs-Rosenthal e as células contadas em microscópio eletrônico com aumento de 400×. A partir desses dados, os ensaios com feixe de elétrons foram realizados durante a fase exponencial de crescimento da cianobactéria.

Após a determinação da curva de crescimento e definidos os dias que compreendem a fase exponencial, foram calculadas as taxas de crescimento ($\mu \cdot \text{dia}^{-1}$) e o tempo de duplicação ($G \cdot \text{dia}^{-1}$) por dia. Estas taxas foram calculadas de acordo com as fórmulas: $\mu = (\ln N - \ln N_0) \cdot (t - t_0)^{-1}$ e $G = \ln(2) \cdot \mu^{-1}$, sendo N e N_0 o número de células $\cdot \text{mL}^{-1}$ nos tempos t e t_0 , respectivamente (FOGG e THAKE, 1987).

3.3 Irradiação das células da cianobactéria *M. aeruginosa*

A cianobactéria *M. aeruginosa* foi suspensa em meio ASM-1 e irradiada por feixe de elétrons. Para o processamento por radiação ionizante foi utilizado acelerador de elétrons (Dynamitron[®]) do CETER - IPEN que possui as seguintes especificações: energia fixada de 1,4 MeV, potência de 37,5 kW, corrente elétrica de 25 mA e velocidade da esteira de $6,72 \text{ m} \cdot \text{min}^{-1}$ (Figura 4).

Figura 4 - Acelerador de elétrons (IPEN/CNEN - CETER)



Foto: autora da dissertação.

Nesta fase, a suspensão de cianobactérias foi irradiada e análises do crescimento de cultura, concentração dos pigmentos fotossintéticos, concentração da toxina intracelular e extracelular e os efeitos ecotoxicológicos pós irradiação por feixe de elétrons foram avaliados.

As amostras (suspensão de cianobactérias) foram irradiadas em recipientes de vidro de borossilicato. Cada recipiente tinha o volume de 246 mL, valor este definido para que a irradiação ocorresse uniformemente em toda a amostra. As doses de radiação utilizadas para as análises foram: 1,0; 2,0; 3,0; 4,0; 5,0 e 10 kGy e o controle (dose 0 kGy).

3.3.1 Determinação das concentrações de clorofila-*a* (cl-*a*) e carotenóides totais

As concentrações de cl-*a* e carotenóides totais foram determinadas conforme ZAVŘEL et al., (2015) e foram analisadas nas amostras controle e irradiadas.

Descrevendo brevemente a extração e análise, uma alíquota da suspensão de *M. aeruginosa* irradiada em cada dose foi homogeneizada e centrifugada em 15000 g em temperatura ambiente por 7 min e o sobrenadante descartado. Em cada amostra foi adicionado 1 ml de metanol, resfriado previamente em 4 °C, seguido de homogeneização e refrigeração em 4 °C por 20 min para extração dos pigmentos.

Após o período de extração, a solução sobrenadante foi então colocada em cubetas com caminho óptico de 1 cm e sua absorbância lida em espectrofotômetro modelo UV-VIS1800 (Shimadzu[®]), considerando como branco o mesmo lote de solução de metanol utilizado para a extração.

A concentração de cl-*a* foi determinada conforme apresentado na Equação 2:

$$\text{cl-}a \text{ (}\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}\text{)} = 12,9447(A_{665} - A_{720}) \quad (2)$$

A concentração de carotenóides totais foi determinada conforme a Equação 3:

$$\text{carotenóides totais } (\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}) = [1000(A_{470} - A_{720}) - 2,86(c1-a (\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}))]/221 \quad (3)$$

3.3.2 Preparação das amostras para análise em LC-MS/MS e UHPLC

Para as análises das cianotoxinas, alíquotas de cada cultura foram coletadas imediatamente após a irradiação e centrifugadas por 10 minutos, com a coleta e armazenamento do pellet para a determinação das MC intracelulares em microtubos de 2 mL e, o sobrenadante armazenado em tubos falcon de 15 mL. Todos os frascos foram previamente pesados e, posteriormente com as amostras, congelados e liofilizados.

Após o período de liofilização, os microtubos e os tubos falcon foram novamente quantificados e a extração das toxinas realizada com 500 μL de solução metanol 70 %: água ultrapura do tipo I 30 % (v/v). Após a adição da solução metanol, a amostra foi sonicada com amplitude de 30 % por três minutos (Soni Omni Disruptor[®]). O extrato foi então filtrado com filtro de seringa em fluoreto de polivinilideno (PVDF) de porosidade 0,22 μm com o sobrenadante armazenado em vials até o momento das análises.

3.3.2.1 Cromatografia líquida de ultra eficiência (UHPLC)

As análises foram realizadas em um LC-20D Shimadzu Prominence sistema (Shimadzu, Kyoto, Japão) equipado com uma matriz de diodos detector (DAD) - SPD M20A acoplado a uma luz de desligamento de tempo quadrupolo (QTOF) espectrômetro de massa (MicroTOF-QII; Bruker Daltonics, MA, EUA) equipado com uma fonte de electrospray e controlado por uma estação de trabalho Bruker Compass / HyStar (JACINAVICIUS, 2021).

3.3.2.2 Quantificação e identificação de MC extra e intracelular

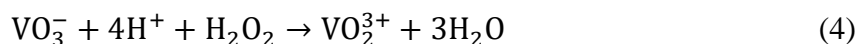
A identificação e quantificação de MC foi realizada por cromatografia líquida de alta performance acoplada a um espectrômetro de massa triplo-quadrupolo (HPLC-QqQ / MS / MS) Agilent 6460.

3.4 Análises físico-químicas

3.4.1 Determinação de peróxido de hidrogênio (H₂O₂)

Embora não tenha sido possível a determinação da concentração de H₂O₂ formada durante o processo de irradiação, ressalta-se que as análises foram realizadas conforme método descrito por NOGUEIRA et al., (2005).

Brevemente, a concentração de H₂O₂ é determinada indiretamente, a partir da reação de H₂O₂ presente na amostra com metavanadato em meio ácido, conforme a Equação 4:



A concentração foi determinada a partir da coloração alaranjada da solução final resultante da formação do cátio peroxivanadio e a leitura da absorbância no comprimento de 450 nm em espectrofotômetro modelo UV-VIS1800 (Shimadzu®).

3.5 Ensaios ecotoxicológicos

3.5.1 Microcrustáceo *Daphnia similis*

Os dafnídeos utilizados nos ensaios de toxicidade foram cultivados no Laboratório de Ensaios Biológicos e Ambientais no Centro de Tecnologia das Radiações – IPEN/CNEN.

O microcrustáceo *Daphnia similis* (Crustacea, Cladocera) (Figura 5) é um organismo planctônico filtrador, de 5 mm a 6 mm de comprimento e importante consumidor primário da cadeia trófica em ambientes dulcícolas. A reprodução é de forma assexuada por partenogênese (RUPERT et al., 2004).

Figura 5 - Microcrustáceo *Daphnia similis* (Crustacea, Cladocera)



Foto: <https://www.flickr.com/photos/pphotoex/23728136373>. Acessado em 01 de abril de 2021.

As culturas matrizes de *Daphnia similis* foram cultivadas sob condições controladas em incubadora modelo Q315M26 (Quimis[®]) em temperatura de $20\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ e fotoperíodo ajustado em 16 h luz: 8 h escuro. Os organismos são mantidos em cristalizadores com 2 L de água de cultivo natural.

A manutenção das culturas ocorreu em duas etapas: diária e semanal. A manutenção diária consistiu na retirada de neonatos e dos exoesqueletos liberados durante as mudas. A alimentação foi realizada com a microalga *Raphidocelis subcapitata* (antigo *Pseudokirchneriella subcapitata*) na concentração de 1 a 5×10^6 células para cada dafinídeo e complementada com a ração líquida (RL) na proporção de $50\text{ }\mu\text{L}\cdot\text{org}^{-1}$. Já a manutenção semanal consistiu na renovação total da água de cultivo em cada cristalizador e posterior alimentação dos organismos seguindo a mesma proporção de algas e RL descritas anteriormente.

3.5.1.1 Água de cultivo e diluição

A água de cultivo e diluição foi coletada na área de proteção de manancial no reservatório de Ribeirão Piraí, no município de Salto- SP, Figura 6.

Figura 6 - Área de proteção de manancial no reservatório de Ribeirão Pirai, Bacia do Rio Jundiá, no município de Salto- SP.



Fonte: autora da dissertação.

A água foi coletada semestralmente e a dureza determinada por titulação e ajustada em $45 \pm 1 \text{ mg CaCO}_3 \cdot \text{L}^{-1}$, conforme a norma técnica L5.124 (CETESB, 1992). Além disso, a cada coleta a viabilidade da água foi analisada, com a exposição de 40 neonatas de *Daphnia similis* com idades entre 6 e 24 h por 24 h, sem alimentação e posterior contabilização de organismos imóveis/mortos. O limite de aceitabilidade para uso da água foi imobilidade/mortalidade igual ou inferior à 10 % do total de organismos expostos.

3.5.1.2 Ensaio com substância de referência e definição de carta-controle

Para os ensaios de sensibilidade foi utilizado como substância de referência o sal cloreto de potássio (KCl). Os organismos-teste foram expostos a cinco concentrações-teste nominais (12,5; 25,0; 50,0; 75,0 e 100 %) e o controle.

Para cada concentração-teste foram montadas quatro réplicas com 10 mL cada uma e adicionados cinco neonatos, com idades entre 6 e 24 h de vida. Os ensaios foram mantidos por 48 h protegidos da luz e temperatura em $20 \text{ }^\circ\text{C} \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$. Ao término de cada ensaio foram contabilizados os números de indivíduos mortos ou imóveis, conforme a norma técnica NBR 12713/2016 (ABNT, 2016). Os ensaios para a elaboração da carta-controle foram conduzidos mensalmente.

Os resultados obtidos foram analisados calculando-se a $CE_{50-48 \text{ h}}$ e seus intervalos de confiança por meio do software GraphPad Prism v. 7.0. A partir dos valores de CE_{50} obtidos foi possível calcular o coeficiente de variação (CV%) com valor máximo de 30 %. Este CV% teve por objetivo verificar a precisão do método utilizado e a qualidade dos dados obtidos.

3.5.1.3 Ensaio de toxicidade aguda

Nesta etapa, os ensaios de toxicidade aguda foram conduzidos com a exposição do microcrustáceo *Daphnia similis* à solução sobrenadante e a suspensão de cianobactérias após o processo de irradiação. Como controle, foram utilizados a água de diluição, meio ASM-1 irradiado e, também, o meio de cultivo ASM-1. Os parâmetros físico-químicos pH, oxigênio dissolvido e condutividade foram verificados no início e final dos ensaios.

Igualmente ao método feito para a carta controle, foram feitas quatro réplicas com 10 mL cada uma e adicionados cinco neonatos, com idades entre 6 e 24 h de vida, para cada concentração-teste. Os ensaios foram mantidos por 48 h protegidos da luz e temperatura em $20\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$. Ao término de cada ensaio foram contabilizados os números de indivíduos mortos/imóveis. Novamente o software GraphPad Prism v. 7.0 foi utilizado para o cálculo da $CE_{50-48\text{ h}}$.

3.5.2 Bactéria marinha *Alivibrio fischeri* (antigo *Vibrio fischeri*)

A bactéria *Alivibrio fischeri* é uma bactéria gram-negativa bioluminescente (POLEZA et al., 2008). Os ensaios de toxicidade com a utilização da bactéria luminescente como organismo-teste tem por objetivo quantificar a intensidade luminosa e verificar o quanto o contaminante analisado interfere em sua atividade metabólica e, dessa maneira, quantificar a toxicidade relativa da amostra a partir da diminuição de sua intensidade luminosa.

Os ensaios de toxicidade seguiram a norma técnica NBR 15411-2 (ABNT, 2012). Para isso, foi utilizado o sistema Microtox (modelo M-500 – Microbics), Figura 7, e a luminescência avaliada nos tempos 0 (I_0) e 15 minutos (I_{15}) de exposição às concentrações-teste.

Figura 7 - Sistema Microtox (Modelo M-500 – Microbics)



Foto: GARCIA, 2020.

Como resultado da toxicidade da amostra, observou-se a porcentagem da inibição de luminescência (%E_(t)) em relação às diluições analisadas, conforme a apresentado nas Equações 5, 6 e 7:

$$f_{(t)} = \frac{I_{(15)}}{I_{(0)}} \quad (5)$$

$$I_{(0)} = f_{(t)} \times I_{(0)} \quad (6)$$

$$\%E_{(t)} = \frac{I_{(0)} - I_{(15)}}{I_{(0)}} \times 100 \quad (7)$$

Sendo: $f_{(t)}$ o fator de correção em determinado tempo (t), $I_{(0)}$ correspondente à luminescência inicial para o branco em $t=0$ e $I_{(15)}$ a luminescência final para o branco após 15 min; $I_{(0)}$ a correção da emissão luminosa calculada a partir do fator de correção, e $I_{(0)}$ a luminescência inicial para a diluição-teste no tempo 0.

Para a validação dos ensaios de toxicidade com a bactéria marinha, ensaios de sensibilidade com a substância de referência fenol foram conduzidos e posteriormente plotados em carta-controle.

3.6 Análise estatística

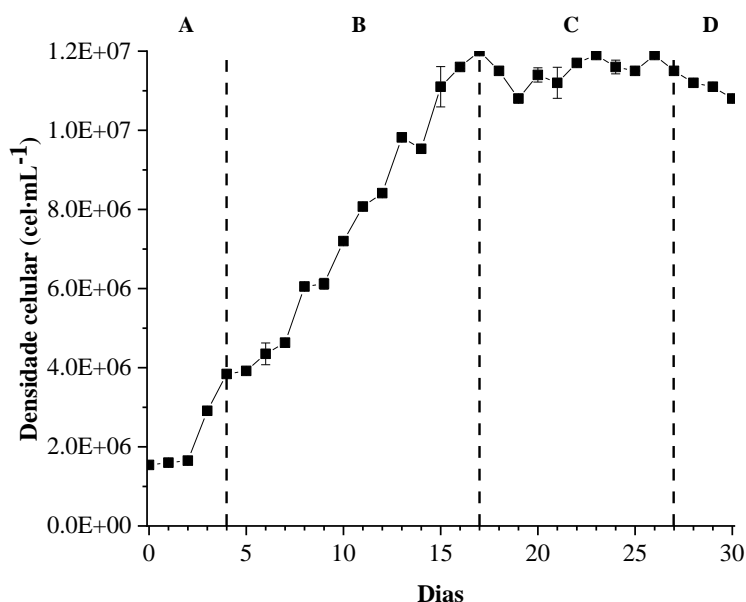
Os dados foram analisados estatisticamente por meio do software GraphPad v7. O teste de Shapiro-Wilks foi utilizado para verificar a normalidade dos dados e quando estes foram categorizados como não-normalizados, foi aplicada a análise de variância (One-way ANOVA) com Teste de Dunnett afim de avaliar as amostras tratadas com o grupo controle. Os testes foram realizados com significância de 95% ($p < 0,05$).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Implementação do cultivo da cianobactéria *Microcystis aeruginosa*

A curva de crescimento para a cianobactéria *Microcystis aeruginosa* foi obtida durante um mês de desenvolvimento, sendo apresentada na Figura 8:

Figura 8 - Curva de crescimento para *M. aeruginosa* em cultivo estabelecido no LEBA - IPEN/CNEN. Os dados são representados pela média de três replicatas (n=3); barras de erro indicam o desvio padrão (dp) de cada conjunto de dados.



Fonte: autora da dissertação.

Para a determinação da curva de crescimento foi utilizado um inóculo com densidade celular inicial de cerca de $1,5 \times 10^6$ cel·mL⁻¹ em erlenmeyer de 500 mL com 250 mL de meio ASM-1, com agitação manual três vezes ao dia.

Com as condições definidas em laboratório e explicitadas no item 3.1 foi possível delimitar quatro fases no crescimento da cianobactéria: a) fase lag, na qual não foi observado o crescimento da cianobactéria e compreendeu o período de inoculação (dia 0) até o dia 4 da cultura; b) fase exponencial, com aumento acentuado do número de células, fase esta delimitada entre os dias 4 e 17; c) fase de desaceleração e estacionária, observada entre os dias 17 e 28, sendo este o último dia que se observou crescimento da cultura. Esta fase representou diminuição no ritmo de crescimento, tornando-se constante o número de células contabilizadas. A última fase (fase de morte) foi observada entre os dias 28 e 30 da cultura, na qual ocorreu o decréscimo na densidade celular, além de mudança da coloração da cultura analisada.

A cepa apresentou densidade celular máxima de cerca de $1,2 \times 10^7$ cél·mL⁻¹ no dia 17 de análise do crescimento. A curva de crescimento obtida neste estudo corrobora com o resultado apresentado por JACINAVICIUS et al., (2016) para a mesma cepa (CCIBt 3454) nos primeiros 17 dias de cultivo, quando utilizados os parâmetros temperatura de 23 °C ± 2 °C, irradiância de 40 – 50 μmol fótons·m⁻²·s⁻¹ e meio de cultivo ASM-1 com pH em 7,4.

As taxas de crescimento por dia e o tempo médio de replicação para a fase exponencial de crescimento (cultivo entre 4 e 17 dias) foram de 0,114 μ·dia⁻¹ e 6,07 G·dia⁻¹, respectivamente. Os valores se mostraram diferentes do obtido por JACINAVICIUS (2010). A autora verificou taxa de crescimento de 0,183 μ·dia⁻¹ e tempo médio de replicação de 3,8 G·dia⁻¹ para a mesma espécie (cepa SPC777) quando a cultura mantida experimentalmente como controle foi exposta nas condições de 23 °C ± 2 °C, irradiância de 40 – 50 μmol fótons·m⁻²·s⁻¹ e meio de cultivo ASM-1 e fotoperíodo de 14 h luz: 10 h escuro.

A partir dos resultados obtidos nesta primeira fase, os ensaios com a irradiação por feixe de elétrons na suspensão de cianobactérias foram definidos.

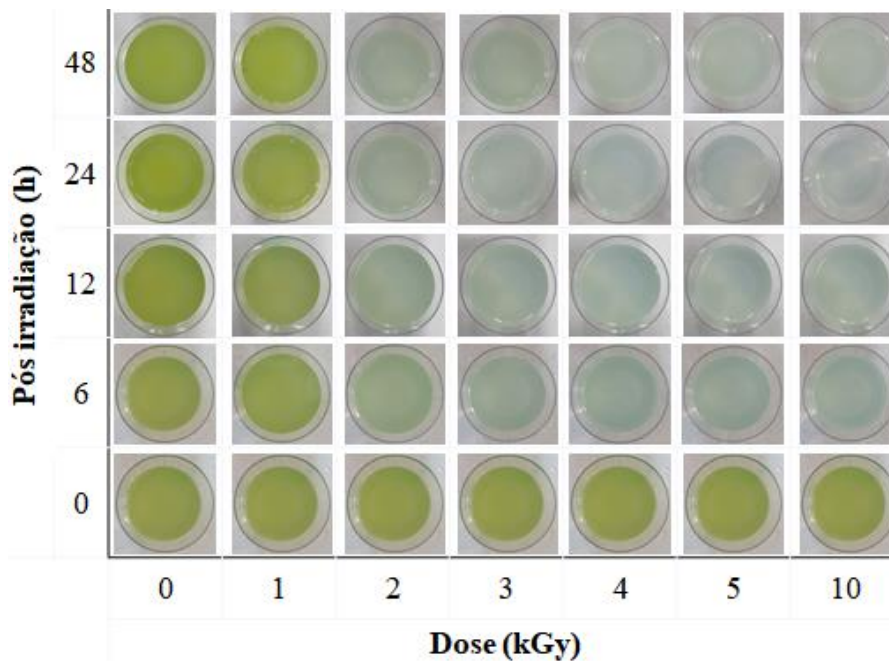
4.2 Irradiação por feixe de elétrons na cianobactéria *Microcystis aeruginosa*

Os resultados obtidos das culturas de *Microcystis aeruginosa* em dois períodos da fase exponencial de crescimento (culturas com 7 e 15 dias de cultivo) foram comparados a fim de estudar o efeito da irradiação por feixe de elétrons. Os pontos de comparação foram: efeito inibidor do crescimento a partir de análises do espectro de absorção das culturas entre os comprimentos de onda 380 e 780 nm; a concentração dos pigmentos cl-*a* e carotenóides totais e, por fim; a toxicidade para o microcrustáceo *Daphnia similis* e a bactéria marinha luminescente *Alivibrio fischeri*. As concentrações de microcistinas intracelulares e extracelulares foram determinados para a cultura com 7 dias.

4.2.1 Influência da irradiação no crescimento da cultura

Na Figura 9 é apresentada a evolução das culturas de *Microcystis aeruginosa* pelo tempo após o processamento por radiação por feixe de elétrons.

Figura 9 - Cultura de *M. aeruginosa* após exposição à radiação por feixe de elétrons. O eixo horizontal é representado pela dose (kGy) e o eixo vertical é o tempo decorrido após a irradiação (h).

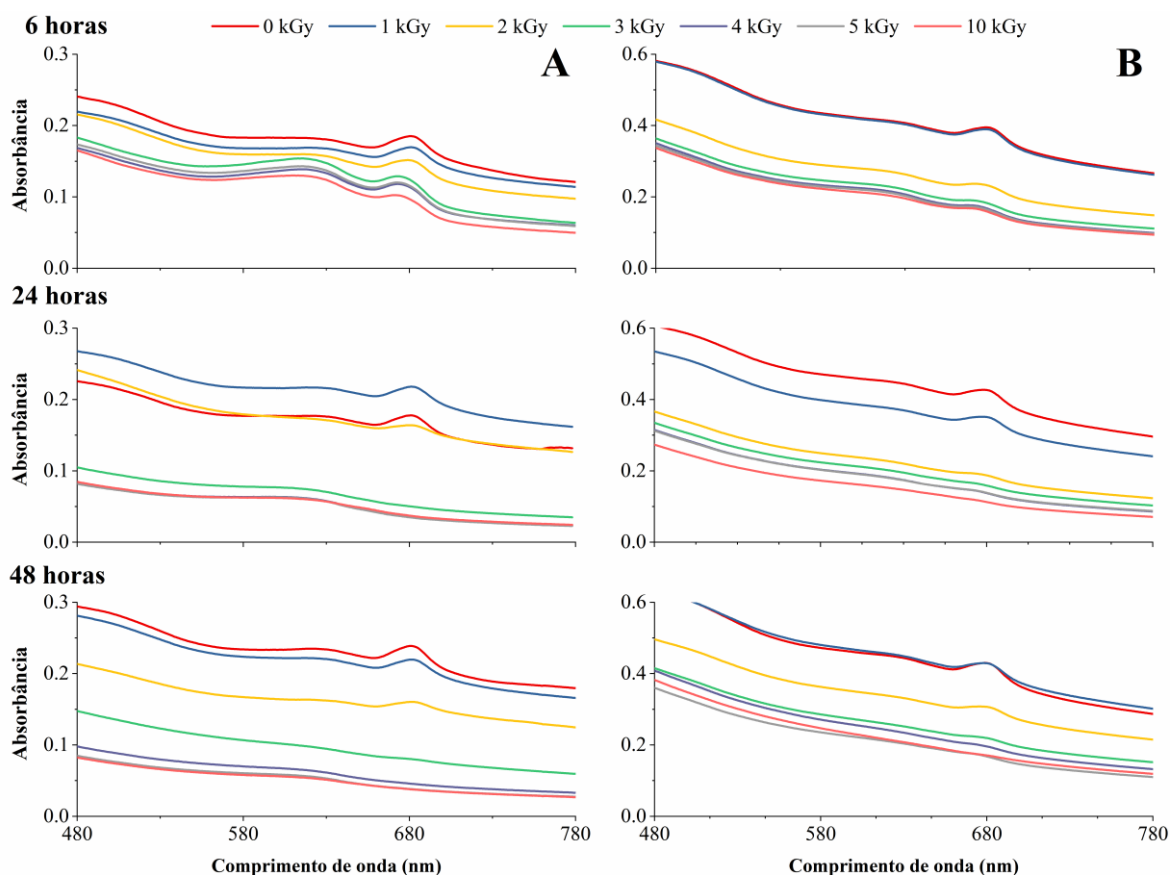


Fonte: autora da dissertação

Embora seja uma análise visual sobre o efeito da irradiação na cultura de *M. aeruginosa*, é possível identificar que, a princípio, a dose de 2 kGy já estabelece possíveis mudanças e degradação de estruturas fotossintéticas, como a clorofila-*a*, principal pigmento e comumente utilizado para o monitoramento de fitoplâncton.

O espectro de absorção entre os comprimentos de onda 480 e 780 nm da cultura de *M. aeruginosa* após a irradiação por feixe de elétrons consta na Figura 10, sendo o resultado da análise de dois períodos da cultura, cultivo com 7 dias (coluna A) e com 15 dias (coluna B).

Figura 10 - Espectro de absorção entre os comprimentos de onda 480 e 780 nm da cultura de *M. aeruginosa* pós irradiação por feixe de elétrons nos tempos de monitoramento 6 h; 24 h e 48 h. A) cultura com 7 dias e B) cultura com 15 dias.



Fonte: autora da dissertação.

Primeiramente, para as amostras analisadas após 6 h do processamento por radiação, na cultura com 7 dias é possível observar a formação de pico de absorção entre os comprimentos de onda 580 e 630 nm entre as doses de 3 e 10 kGy. É possível inferir que essa região do espectro está relacionada à mudança de coloração da cultura, conforme visto na Figura 2. Além disso, nesta mesma região do espectro, está inserida a área compreendida pela absorção de luz dos pigmentos ficobiliproteínas. O mesmo não ocorre quando a cultura com 15 dias é tratada por feixe de elétrons, na qual a dose de 1 kGy possui o mesmo espectro de absorção da amostra controle, não havendo formação de picos de absorção adjacentes ao verificado no comprimento de onda 680 nm. Nas doses de 3 a 10 kGy, comparativamente, o pico de absorção em 680 nm é menos intenso, conforme é apresentado na Figura 11 e discutido mais adiante.

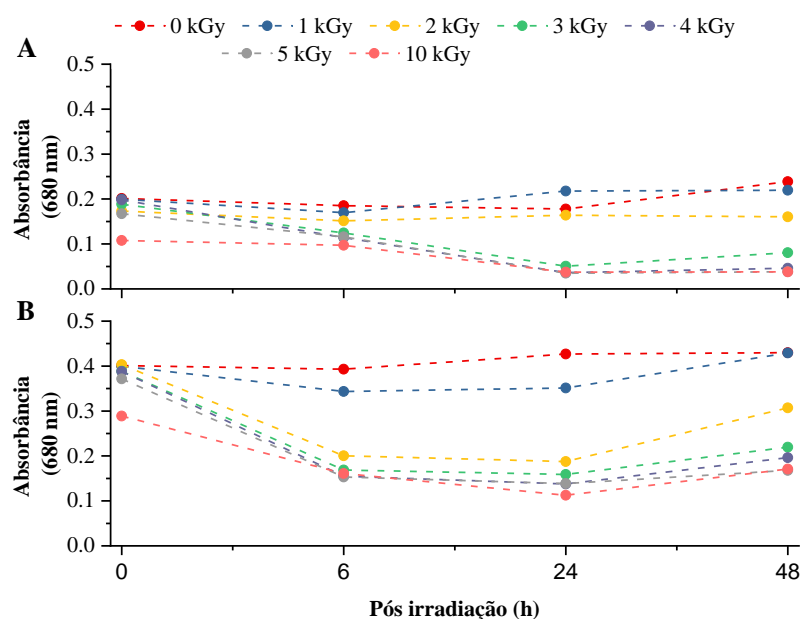
Após 24 h, as culturas tiveram comportamento distinto, sendo que a em 7 dias apresentou espectro de absorção próximos entre as doses 0 (controle) e 2 kGy e o maior registro de pico de absorção para a cultura irradiada com 1 kGy. Já, com o aumento de

dose, entre 3 e 10 kGy, não foi mais possível observar pico máximo de absorção em 680 nm. Já para a cultura em 15 dias, houve decréscimo na absorção para a dose de 1 kGy, e o espectro de absorção na dose de 2 kGy próximo ao observado para as demais doses (entre 3 e 10 kGy).

Apesar dessas diferenças, em ambas culturas ainda foi possível observar pico máximo de absorção em 680 nm para a cultura irradiada com 1 kGy após 48 h da irradiação por feixe de elétrons, com espectros de absorção próximos ou igual ao observado para a amostra controle. A cultura tratada com dose de 2 kGy teve maior aumento na absorção na cultura com 15 dias, enquanto que a cultura com 7 dias praticamente se manteve constante. Nas doses entre 3 e 10 kGy, não houve alteração no padrão do espectro. Pode-se observar, ainda, que os espectros de absorção obtidos corroboram com a análise visual apresentada na Figura 2, indicando inibição da cultura pós tratamento por feixe de elétrons quando empregadas as doses entre 2 e 10 kGy.

A partir do exposto anteriormente, a absorção máxima obtidas para ambas culturas no comprimento de onda de 680 nm pelo período de 48 h após a irradiação por feixe de elétrons é apresentada (Figura 11).

Figura 11 - Absorção máxima no comprimento de onda de 680 nm da cultura de *M. aeruginosa* pós irradiação por feixe de elétrons. A) cultura com 7 dias e B) cultura com 15 dias.



Fonte: autora da dissertação

Pode-se deduzir que com o aumento gradativo das doses de radiação, exceto na amostra tratada com 1 kGy, as células sofreram progressivamente maiores danos ao DNA e seus componentes metabólicos. Tal fato pode ser explicado uma vez que a radiólise da

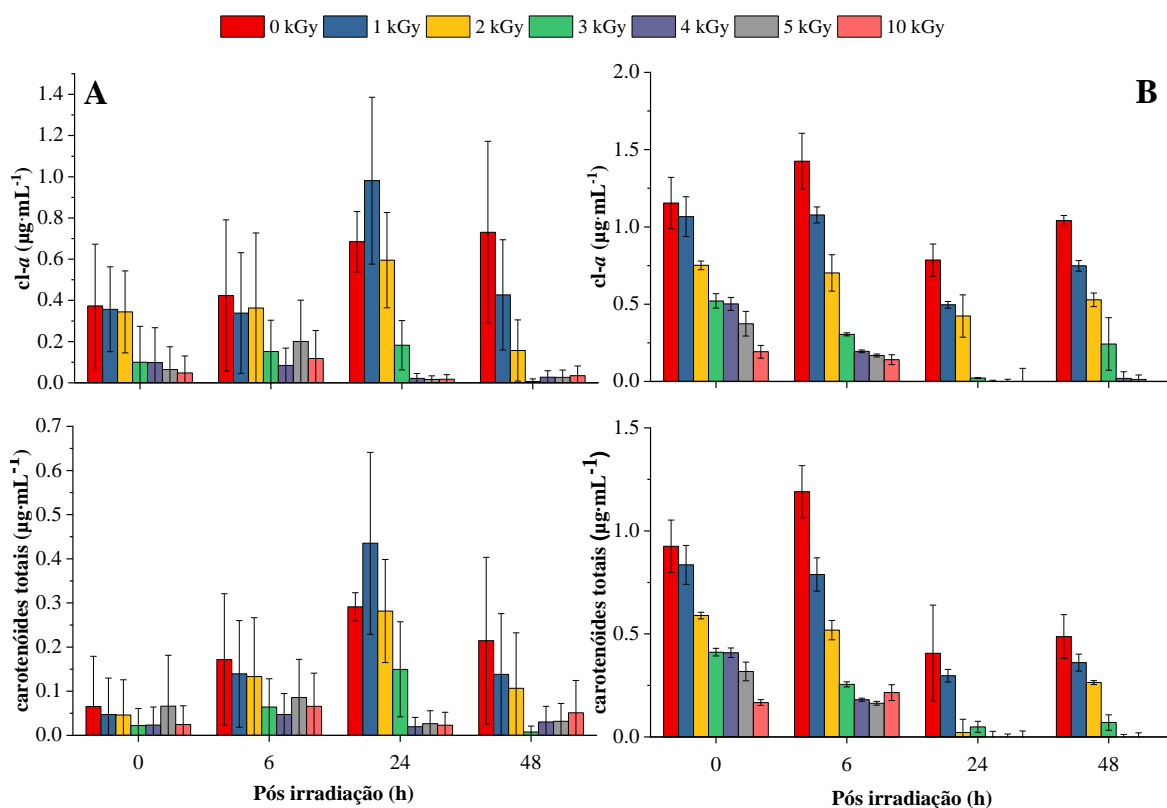
água pode ter apresentado ação direta, agindo diretamente na cadeia de DNA e na quebra direta das estruturas celulares e, também, de maneira indireta, quando os radicais gerados na radiólise da água reagiram com as demais moléculas presentes em solução. Assim, sugere-se que a formação de radicais gerada pela radiação possa ter causado danos reversíveis à cultura, como visto na dose de 1 kGy e irreversíveis, como pôde ser verificado anteriormente a partir dos espectros de absorção das culturas irradiadas com as doses entre 2 e 10 kGy. Dessa forma, nas amostras que receberam uma maior dose de radiação, as culturas de *M.aeruginosa* demoraram mais para se recuperar dos danos sofridos pela ação da radiação ionizante, conseqüentemente ocasionando na redução do pico de absorção e sugerindo a morte da cultura.

4.2.2 Influência da irradiação na produção dos pigmentos fotossintéticos

As cianobactérias possuem uma gama de pigmentos para a absorção em diversas áreas do espectro de radiação, o que as tornam aptas a realizarem os processos de fotossíntese. Dentre eles estão, principalmente, a clorofila-*a*, os carotenóides e as ficobiliproteínas. Vários autores concluíram que estes pigmentos podem ser afetados por radiações ionizantes do tipo UV-C (OU et al., 2012; PHUKAN et al., 2019), raios gama (KANG, 2004; ZHENG et al., 2012) e feixe de elétrons (LIU et al., 2014, 2015).

A Figura 12 apresenta a variação na concentração dos pigmentos *chl-a* e de carotenóides totais nas amostras irradiadas por feixe de elétrons ao longo de 48 h para a cultura com 7 e 15 dias.

Figura 12 - Concentração de clorofila-*a* e carotenóides totais ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) após irradiação por feixe de elétrons na cultura de *M. aeruginosa*. Os dados são representados pela média de três replicatas ($n=3$); barras de erro indicam o desvio padrão (dp) de cada conjunto de dados. A) cultura com 7 dias e B) cultura com 15 dias.



Fonte: autora da dissertação.

Primeiramente para a cultura com 7 dias, a concentração média de *cl-a* para a amostra controle (0 kGy) foi de 0,373 para 0,731 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ durante o período de 48 h, indicando o aumento na biomassa e crescimento da cultura. Na amostra tratada com 1 kGy, após 24 h, a concentração média de *cl-a* foi maior do que o valor registrado para a amostras controle no mesmo período, 0,685 e 0,981 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, respectivamente. Este fato corrobora com o que foi observado a partir do espectro de absorção da cultura (Figuras 10 e 11).

Na literatura, há estudos que relacionam o uso de baixas doses de radiação ionizante ao aumento na concentração de *cl-a*, corroborando com o apresentado no presente estudo. PONGSRI et al., (2021) relataram que limões tratados com irradiação de feixe de elétrons com dose 1 kGy e logo após mantidos sob armazenamento, entre os dias 10 e 25, a atividade da clorofilase foi menor do que o observado nas amostras controle e tratadas com 0,5 kGy. Indicando que, a dose de 1 kGy pode inibir a degradação de *cl-a* e manter as características do fruto por mais tempo. O estudo sugere que logo após a

irradiação esta dose pode suprimir temporariamente a atividade da clorofilase, responsável pela degradação de *chl-a* e, conseqüentemente, aumentar o teor de *chl-a*, conforme observado na Figura 12.

Resultado semelhante também foi observado por PHUKAN et al., (2019), os quais verificaram que a concentração de *chl-a* teve aumento significativo após 3 dias da exposição à radiação UV-C nas doses de 6 e 12 mJ·cm⁻² (cerca de 11,3 e 18,7%, respectivamente). Após 7 dias da exposição, a dose de 12 mJ·cm⁻² resultou no aumento de *chl-a* em 23,81 %. No mesmo período e dose, a concentração de carotenóides aumentou 20,41 %. OU et al., (2012) demonstraram que sob várias dosagens de UV-C (140 e 4200 mJ·cm⁻²), as capacidades fotossintéticas de *Microcystis aeruginosa* foram reduzidas com o aumento da radiação, acompanhadas por lise celular.

Para a dose de 2 kGy, a variação de *chl-a* apresentou aumento em sua concentração, porém, menor do que o observado na amostra controle. Para as demais doses, após 24 h da irradiação por feixe de elétrons, houve diminuição significativa na concentração de *chl-a* nas doses entre 3 e 10 kGy. Para os carotenóides totais, houve comportamento similar ao apresentado pela *chl-a*, com valor máximo de 0,291 µg·mL⁻¹ do pigmento em 24 h do início das análises. Tal comportamento pode ser uma resposta ao estresse oxidativo gerado pelo processo de irradiação, uma vez que os carotenóides além de serem pigmentos auxiliares na fotossíntese, têm atuação como antioxidantes, garantindo a proteção celular contra os danos provocados pela irradiação.

Comparativamente aos resultados obtidos na cianobactéria cultivadas por 15 dias, a amostra controle (0 kGy) apresentou oscilação nas concentrações de *chl-a* e carotenóides totais durante o período de análise, com valores dos pigmentos em 1,15 e 0,925 µg·mL⁻¹, respectivamente, no início das análises e atingindo 1,04 e 0,487 µg·mL⁻¹ em 48 h. A variação se deve ao fato de que o período de cultura analisado compreende o final da fase exponencial e início da estabilização. Em estudo de LYCK (2004) foi verificado que as células de *Microcystis aeruginosa* na fase estacionária tardia continham até duas vezes a quantidade de MC por cotas celulares em fase exponencial. Além disso havia, ainda, as maiores cotas de proteína, carboidratos e clorofila comparativamente ao encontrado na fase exponencial. Já nas culturas irradiadas por feixe de elétrons, ao contrário do observado na cultura com 7 dias, houve redução nas concentrações de *chl-a* e carotenóides totais para todas as doses testadas, inclusive nas amostras tratadas com 1 kGy.

Quando são comparados os resultados aqui obtidos com estudos utilizando a radiação por feixe de elétrons e gama, o presente trabalho se mostra mais promissor. LIU

et al., (2014) observaram uma diminuição da cultura em 91 e 84% para 4,0 e 5,0 kGy, respectivamente, após 11 dias do tratamento por feixe de elétrons. Já a taxa de fotossíntese diminuiu significativamente com doses entre 2 e 5 kGy. KANG (2004) obteve uma diminuição de 40% na atividade fotossintética para *Microcystis* sp. após a cultura ser irradiada com 3 kGy, porém o autor não especifica para qual período de tempo decorrido após a irradiação o resultado foi alcançado.

De modo geral, a diminuição significativa da concentração dos pigmentos fotosintéticos sugere-se que o aumento da dose de radiação por feixe de elétrons tenha comprometido as estruturas celulares e fotossintéticas da cianobactéria. Diversos pigmentos, como clorofilas, carotenóides e ficocianinas desempenham papéis importantes nos processos fotossintéticos e, também, na proteção celular, como é o caso dos carotenóides totais.

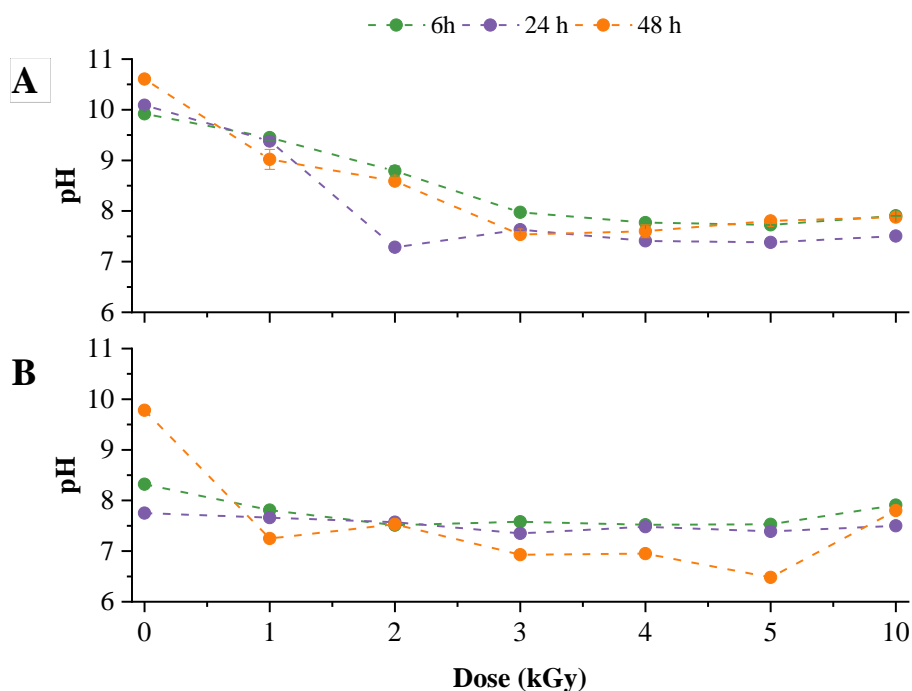
Sugere-se que a geração dos radicais decorrentes do processo de radiólise contribuam na geração do estresse oxidativo e, como observado na dose de 1 kGy ocorra o aumento da proteção celular e conseqüente aumento na concentração de carotenóides totais. O aumento crescente da dose e a geração de radicais induz a célula ao processo de apoptose devido aos efeitos da quebra de proteínas e de componentes vitais para os processos celulares. DE VOS et al., (1989) demonstraram que a célula sob estresse, o oxigênio (O_2) singlete (radical também formado em POA e na radiólise da água) se acumula nos pigmentos clorofila e acessórios, podendo interromper seriamente o metabolismo por meio de danos oxidativos aos componentes celulares. Além disso, DEMMING (1990) demonstrou que os carotenóides têm capacidade de proteger a estrutura fotossintética de foto-danos, podendo realizar a eliminação de O_2 singlete, o qual pode causar danos oxidativos aos pigmentos, proteínas e estruturas fotossintéticas.

Os aspectos físico-químicos das culturas após o processamento por radiação por feixe de elétrons serão abordados adiante.

4.2.3 Influência da irradiação nos parâmetros físico-químicos

A irradiação por feixe de elétrons também modificou parâmetros físico-químicos na cianobactéria *M. aeruginosa* suspensa em meio ASM-1, conforme apresentado na Figura 13.

Figura 13 - pH das cianobactérias *M. aeruginosa* suspensas em meio ASM-1 após irradiação por feixe de elétrons. A) cultura com 7 dias e B) cultura com 15 dias. Os dados são representados pela média de três replicatas (n=3); barras de erro indicam o desvio padrão (dp) de cada conjunto de dados.



Fonte: autora da dissertação.

Durante os ensaios, alterações no pH das cianobactérias suspensas em meio ASM-1 após a irradiação por feixe de elétrons foram observadas. Na amostra controle, o pH teve tendência de crescimento, com valores de 10,61 e 9,78 após 48 h para as culturas de 7 e 15 dias, respectivamente. Deduz-se que os valores de pH observados nas amostras controle decorre da aeração das culturas ocorrida antes das análises. De acordo com WARD (1985) culturas de *Synechococcus leopoliensis* em que ocorreram a injeção de ar apresentaram valores de pH superiores a 9 em 4 dias de crescimento. O resultado foi decorrente do aumento na densidade celular e deficiência de CO_2 dissolvido nas culturas analisadas. Aumento no pH da cultura estática também foi observado quando comparado ao pH de cultura semi-contínua de *Dolichospermum doliolum*, na qual não foi observado quaisquer oscilações em relação ao pH (TRIPATHI et al., 2009).

Nas culturas irradiadas por feixe de elétrons, houve diminuição de pH do meio com o aumento da dose. A diminuição de pH é resultante da geração de H_2O_2 (embora não detectável pelo método utilizado no presente estudo), íons H_3O^+ e possível geração de ácidos como sub-produtos da irradiação. É possível notar que a cultura com 15 dias sofreu maior variação de pH em 48 h do monitoramento atingindo, dentre todas as respostas à irradiação, o menor valor de pH encontrado na dose de 5 kGy (6,48). É importante notar

que após as irradiações, embora na cultura com 15 dias a variação de pH tenha se mostrado mais acentuada após 48 h da irradiação, a partir da dose de 3 kGy o valor de pH de ambas culturas teve comportamento estável, mantendo-se dentro do intervalo de 7,5 a 8,5. Isso pode indicar que a radiação por feixe de elétrons teve um efeito máximo na alteração de pH dessas soluções até a dose de 2 kGy. Além disso, a irradiação por feixe de elétrons se mostrou como um processo estável e manteve uma faixa adequada de pH ao final do processo, não sendo necessários quaisquer ajustes de pH. Isso resulta em menor custo e facilidade de operação.

Estudos em águas continentais eutrofizadas mostraram que essas são alcalinas, com valores de pH excedendo 8,0 (LIU et al., 2020). Este fator é de suma importância para a eficiência da radiólise da água e na geração de radicais que atuam na degradação das toxinas e na inibição de *M. aeruginosa*. De acordo com LIU et al., (2020), a geração dos radicais promovida pela radiólise da água reage com o oxigênio dissolvido presente nas amostras diminuindo a concentração de CO₂ com consequente diminuição do pH.

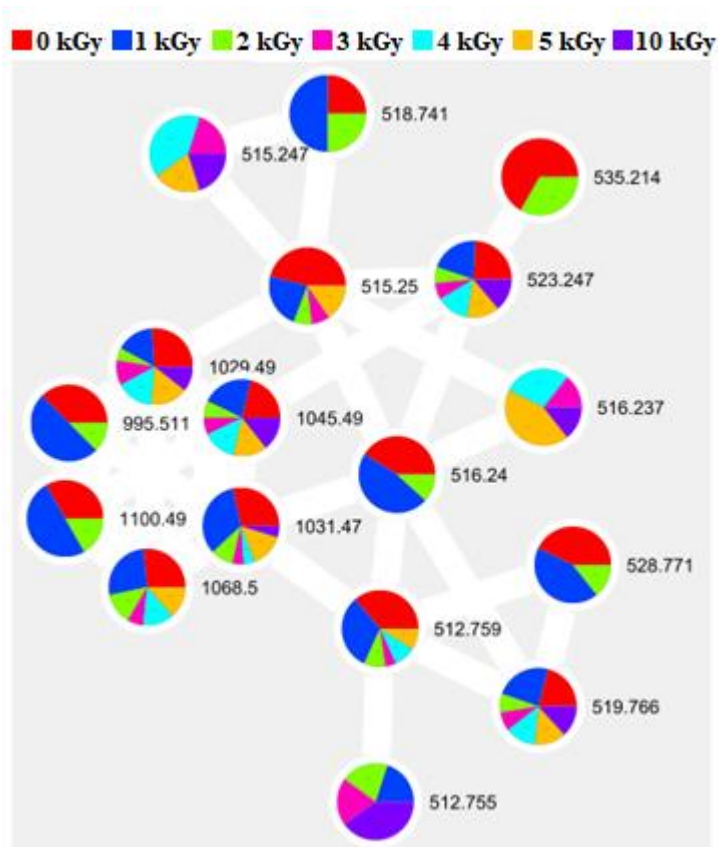
A diminuição no pH neste trabalho corrobora com o que foi verificado por LIU et al., (2020), no qual os autores observaram um decréscimo do valor do pH na suspensão de *M. aeruginosa* irradiadas por feixe de elétrons. De acordo com o estudo, após um dia do processo por radiação, as culturas irradiadas com doses entre 2 e 5 kGy apresentaram pH entre 8,0 e 8,25, valores estes próximos aos encontrados no presente trabalho. Os autores ainda ressaltaram que, o monitoramento das culturas pelo período de 7 dias após o processo de radiação, a cultura irradiada com a dose de 1 kGy embora tenha apresentado valores de pH menores do que o grupo controle, a fotossíntese aumentou para a amostra em questão. Tal análise também corrobora com os resultados apresentados anteriormente para os pigmentos fotossintéticos aqui analisados.

4.2.4 Influência da irradiação nos metabólitos secundários

4.2.4.1 MC intracelulares

A análise por redes metabolômicas permitiu observar o grupo molecular para microcistinas intracelulares para as diferentes doses de radiação por feixe de elétrons, conforme apresentado na Figura 14.

Figura 14 - Agrupamento de MC formado pela análise de GNPS com base nos espectros de fragmentação MS / MS obtidos das amostras intracelulares nas culturas de *M. aeruginosa* após exposição à irradiação por feixe de elétrons. Os íons $[M + H]^+$ e $[M + 2H]^{2+}$ estão representados no agrupamento.



Fonte: autora da dissertação.

Resumidamente, a análise metabolômica pode ser definida como a análise qualitativa e quantitativa da diversa gama de metabólitos, reunindo a maior quantidade possível de informações metabólicas de um organismo ou de um sistema biológico (RAMOS et al., 2019).

As redes moleculares são representações de conjuntos de dados de espectros de massa gerados a partir da similaridade entre esses espectros. Inicialmente, os espectros MS/MS que possuem razão de massa e carga (m/z) quase idênticos são combinados e, a partir deles, calcula-se a média para formar espectros de 'consenso', cada um dos quais é representado graficamente na rede como um nodo circular. Os espectros são então comparados e seus nodos correspondentes na rede são vinculados a arestas com base em sua similaridade estrutural (WANG et al., 2016).

Neste estudo, o algoritmo GNPS (do inglês Global Natural Products Social Molecular Networking) comparou automaticamente os espectros MS/MS obtidos para cada amostra intracelular e extracelular após a irradiação por feixe de elétrons, agrupando-os

com moléculas com massa idêntica e fragmentação padrão. A ligação entre as moléculas agrupadas seguiu uma classificação de cosseno de 0,65.

Dessa maneira, por meio das razões de massa para carga (m/z) foram identificadas as diversas variantes de MC. As MC já são extensivamente analisadas em literatura sobre seu modo de ação e são largamente reconhecidas por serem produzidas pela espécie *Microcystis aeruginosa*. Neste estudo *in silico*, houve o agrupamento de 17 íons, dos quais variantes foram identificadas e passíveis de quantificação, as quais serão abordadas adiante.

Além disso, a rede molecular obtida foi anotada usando-se a ferramenta *in silico Dereplicator*, já presente no sistema GNPS. Esta ferramenta possibilitou a notação dos compostos naturais peptídicos presentes nos dados MS/MS, grupo na qual estão inseridas as MC.

Assim, a partir dessa ferramenta foi possível identificar e refinar os resultados adquiridos de MC e comparados aos dados presentes na literatura, conforme apresentado na Tabela 5.

Tabela 5 - Compostos verificados por LC-MS/MS e identificados via ferramenta Dereplicator e comparados com a literatura nas amostras intracelulares após irradiação por feixe de elétrons.

Microcistina	Fórmula molecular	massa peptídica	m/z calculada	[M+H]⁺ literatura	Δ m/z
MC-FR	C ₅₂ H ₇₃ N ₁₀ O ₁₂	1028.53	1029.49	1029.5404	0.0504
MC-YR	C ₅₂ H ₇₃ N ₁₀ O ₁₃	1044.53	1045.49	1045.5353	0.0453
MC-LR	C ₄₉ H ₇₅ N ₁₀ O ₁₂	994.549	995.511	-	-
MC-WR	C ₅₄ H ₇₄ N ₁₁ O ₁₂	1067.54	1068.5	1068.5513	0.0513
MC-7-(L-Serine) analogue	-	998.544	951.457	-	-
MC-RR	C ₄₉ H ₇₆ N ₁₃ O ₁₂	1037.57	1038.53	1038.5731	0.0431
[D-Asp3, (E)-Dhb7]MC-HtyR	C ₅₂ H ₇₃ N ₁₀ O ₁₃	1044.53	1031.47	1045.5353	14.0653
MC-M(O)R	C ₄₈ H ₇₃ N ₁₀ O ₁₃ S	1028.5	1100.5	1029.5074	70.9926
MC-LL	C ₄₉ H ₇₄ N ₇ O ₁₂	951.532	430.195 (M+2H) ²⁺	952.539	92.149
MC 3-D-Aspartic acid analogue	-	1023.55	512.759 (M+2H) ²⁺	-	-
MC 2-L-Homoisoleucine analogue	-	1008.56	515.25 (M+2H) ²⁺	-	-
MC-LM	C ₄₈ H ₇₂ N ₇ O ₁₂ S	969.488	480.776 (M+2H) ²⁺	970.4954	8.9434
MC 2-L-Homoisoleucine analogue	-	1008.56	523.247 (M+2H) ²⁺	-	-

Fonte: autora da dissertação.

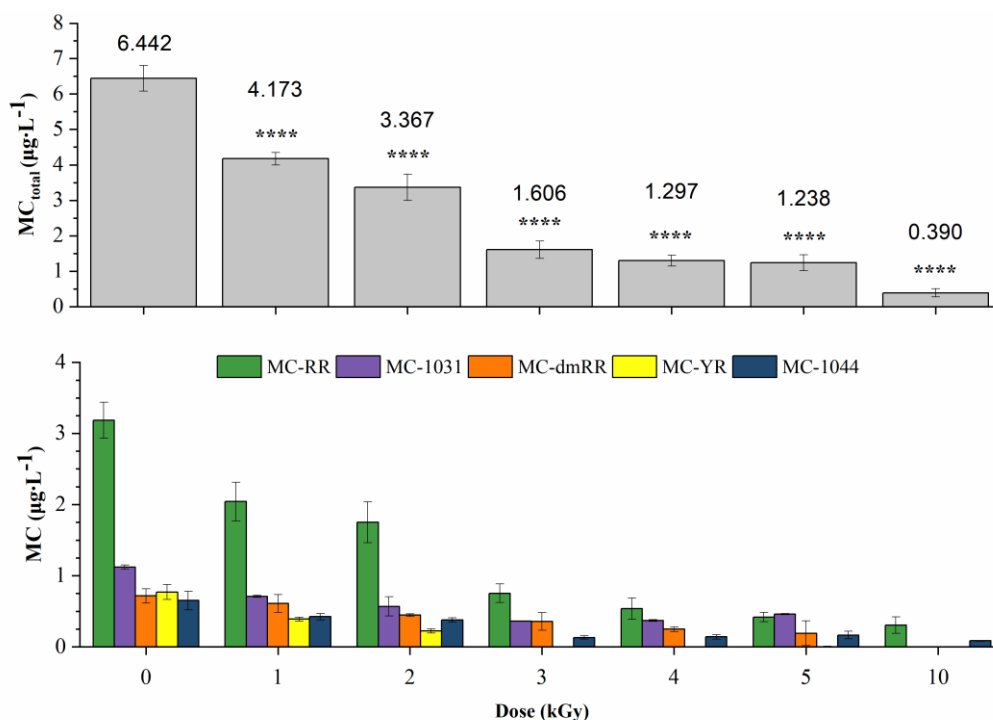
A cianobactéria *M. aeruginosa* produz diversos compostos peptídicos os quais diferenciam-se devido à pequenas mudanças em sua estrutura, dentro os quais incluem-se as MC. Neste estudo, como dito anteriormente, dos 17 nodos observados, foi possível identificar 13 variantes de MC.

As variantes de MC apresentadas na Tabela 5 e suas razões m/z nos nodos agrupados e mostrados na Figura 14 permitiu inferir, de maneira qualitativa, que a irradiação por feixe de elétrons degradou significativamente grande parte das MC presentes nas células. Assim, das 13 variantes, os tipos MC-LR e MC-M(O)R sofreram degradação total já na dose de 3 kGy. Outra observação interessante foram os resultados qualitativos na degradação das toxinas na dose de 1 kGy: as concentrações se mostraram iguais ou próximas aos da amostra controle, podendo enfatizar os resultados já apresentados no presente estudo, nos quais foram demonstrados que esta dose de radiação não afeta de maneira significativa no crescimento e também, possivelmente, na produção destes metabólitos.

Outro ponto analisado foi a diferença da massa considerada pelo modelo para a classificação dos peptídeos e os valores descritos em literatura. Para isso, foram considerados as classificações das variantes de MC e os valores de razão m/z realizados por levantamento bibliográfico realizado por SPOOF E CATHERINE (2016). Assim, foi possível verificar a variação na massa dentre a massa experimental e o presente em literatura para o efeito de comparação e variações nos resultados obtidos.

Já na abordagem quantitativa, para avaliar o efeito da radiação por feixe de elétrons nas MC, a concentração de seis variantes foi identificada e quantificada nas amostras intracelulares e extracelulares nas culturas cultivadas por 7 dias e irradiadas por feixe de elétrons. As concentrações médias da MC total e das variantes de MC intracelulares nas amostras controle e irradiadas com feixe de elétrons são apresentadas na Figura 15.

Figura 15 - Concentração das MC intracelulares nas amostras controle e tratadas por feixe de elétrons logo após o processo de irradiação: (a) MC intracelulares totais e (b) variantes de MC intracelulares. Os dados são representados pela média de três amostras (n=3); barras de erro indicam o desvio padrão (dp) de cada conjunto de dados, $p < 0,0000,1$ (****).



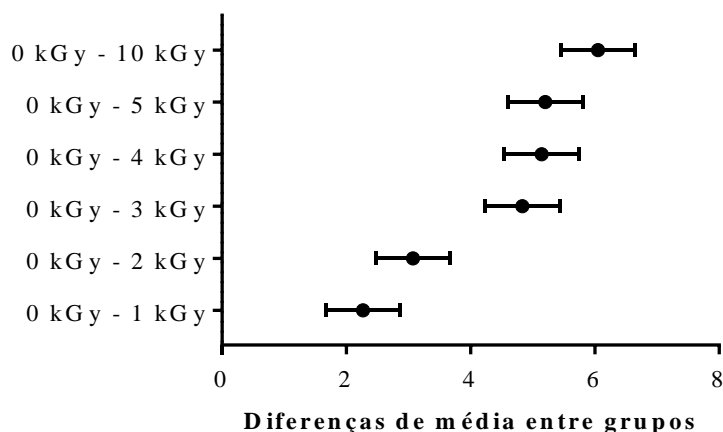
Fonte: autora da dissertação.

Primeiramente para o controle, foram quantificadas as variantes MC-RR, MC-1031, MC-dmRR, MC-YR e MC-1044. A variante MC-RR apresentou a concentração média dentre todas aquelas que foram analisadas, com valor de $3,185 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, correspondendo à 49,44 % da concentração média de MC total ($6,442 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$). Em seguida, a segunda variante mais observada foi a MC-1031, correspondendo à 17,37 % da MC total. As demais variantes correspondem à cerca de 33,19 % da MC total intracelular.

Em geral, as culturas irradiadas por feixe de elétrons apresentaram diminuição na concentração média da MC total com o aumento da dose. Na cultura irradiada com 1 kGy, embora MC-RR tenha se mostrado predominante após um tratamento de feixe de elétrons dentre todas as variantes, houve diminuição de cerca de 35,93 % de sua concentração intracelular em relação ao controle. Para a mesma cultura, as variantes MC-YR e MC-LR apresentaram concentrações próximas de $0,389$ e $0,424 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, respectivamente. A ocorrência de MC-YR intracelular não é observada a partir da dose de 3 kGy, indicando degradação de 100% (concentração final abaixo do limite de detecção) a partir da dose mencionada. A variante MC-dmRR foi completamente degradada somente na última dose testada (10 kGy).

De acordo com os resultados do teste one-way ANOVA para os grupos de MC total intracelular e o controle, todas as doses por feixe de elétrons mostraram desempenho significativamente diferente do controle (0 kGy) com $p < 0,001$. A Figura 16 mostra a diferença de médias entre os grupos (controle e dose) analisados utilizando o intervalo de confiança de 95 %.

Figura 16 - Intervalo de confiança de 95 % (Dunnett) em relação à amostra controle (0 kGy).



Fonte: autora da dissertação.

Pode-se afirmar que há aumento significativo nas diferenças de médias entre grupos em relação ao controle com o aumento da dose empregada na cultura de cianobactérias de *M. aeruginosa*. Há tendência de crescimento com o aumento da dose em relação as diferenças entre as médias. Porém, pode-se notar que as doses de 3, 4 e 5 kGy apresentam diferenças médias relativamente próximas, ou seja, com a mesma tendência de resultados na degradação da toxina intracelular.

CORAL et al., (2013) observaram que culturas de *Dolichospermum flos-aquae* apresentaram aumento de carbono orgânico dissolvido (COD) em solução durante a ozonização. Tal resultado pode estar relacionado a dois fatores: tamanho celular, resultando na maior liberação de compostos intracelulares ou maior quantidade de biomassa celular disponível para oxidação. Além disso, os autores observaram que o aumento na dose de ozônio para 4 mg L^{-1} não aumentou a concentração de COD, o qual pode-se deduzir que doses menores já são suficientes para a máxima degradação do conteúdo celular. No mesmo estudo, os autores também concluíram que nas culturas de *M. aeruginosa* o aumento na concentração de ozônio (0,5 para 2 mg L^{-1}) não resultou em aumento na concentração de COD, indicando que para essa espécie baixas dosagens também são suficientes para a completa oxidação do conteúdo celular.

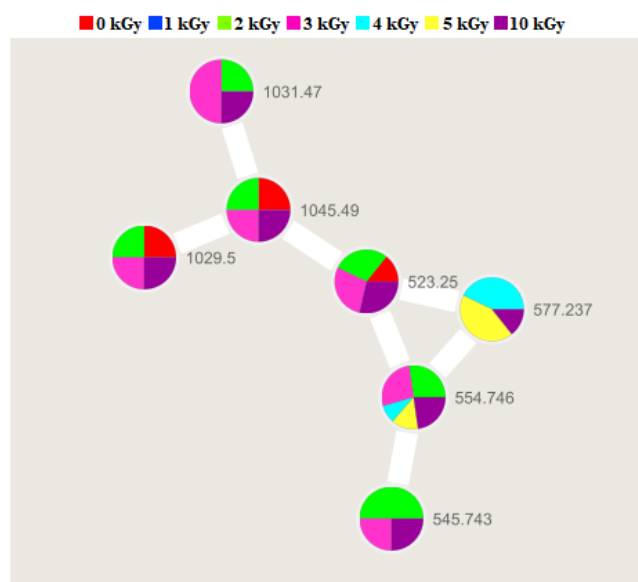
O uso de agentes oxidantes para o tratamento de cianobactérias deve-se atentar à dose utilizada, uma vez que estes processos atingem primariamente as glicoproteínas da parede celular e da membrana plasmática, glicolipídeos ou certos aminoácidos (CORAL et al., 2013). O aumento na dosagem de agentes oxidantes, sem o conhecimento prévio, pode acarretar no aumento da concentração extracelular de compostos metabólitos, inclusive alguns potencialmente tóxicos, afetando diretamente na qualidade da água e toxicidade da água para diversos organismos.

A seguir serão apresentados e discutidos as MC extracelulares identificadas em cada cultura irradiada por feixe de elétrons e as implicações do aumento da dose de radiação em cada um dos resultados obtidos.

4.2.4.2 MC extracelulares

Possíveis mudanças nos sobrenadantes de cada cultura irradiada por feixe de elétrons foram estudadas a partir dos espectros gerados por MS/MS e análise *in silico*. Os compostos identificados nesta análise estão apresentados na Figura 17.

Figura 17 – Agrupamento de MC formado pela análise de GNPS com base nos espectros de fragmentação MS / MS obtidos das amostras extracelulares nas culturas de *M. aeruginosa* após exposição à irradiação por feixe de elétrons. Os íons $[M + H]^+$ e $[M + 2H]^{2+}$ estão representados no agrupamento



Fonte: autora da dissertação.

A partir dos agrupamentos de espectros análise por redes metabolômicas permitiu observar o grupo molecular para MC extracelulares para as diferentes doses de radiação por feixe de elétrons, conforme apresentado na Tabela 6. Neste grupo de amostras

extracelulares, do agrupamento dos 7 nodos foi possível identificar 3 variantes de MC que são apresentados na Tabela 6.

Tabela 6 - Compostos verificados por LC-MS/MS e identificados via ferramenta Dereplicator e comparados com a literatura nas amostras extracelulares após irradiação por feixe de elétrons.

Microcistina	Fórmula	massa	<i>m/z</i>	[M+H] ⁺	Δ <i>m/z</i>
	molecular	peptídica	calculada	literatura	
MC-FR	C ₅₂ H ₇₃ N ₁₀ O ₁₂	1028.53	1029.49	1029.5404	0.0504
MC-YR	C ₅₂ H ₇₃ N ₁₀ O ₁₃	1044.53	1045.49	1045.5353	0.0453
MC 3-D-Aspartic acid analogue	-	1023.55	512.759	-	-

Fonte: autora da dissertação.

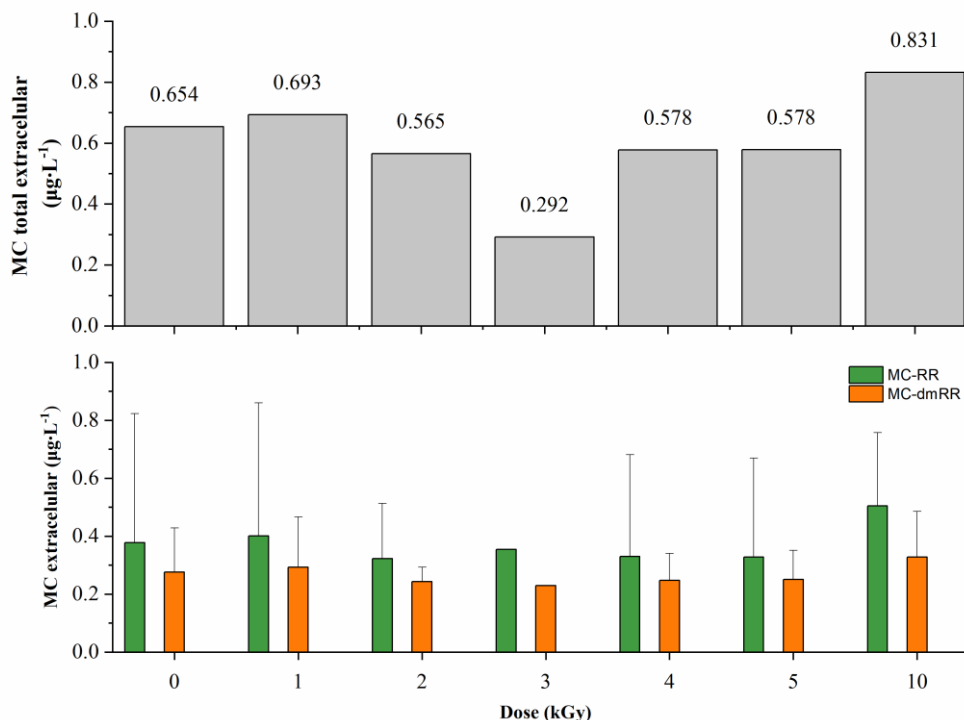
As variantes de MC apresentadas na Tabela 6 e suas razões *m/z* nos nodos agrupados e mostrados na Figura 17 permitiu inferir, de maneira qualitativa, que a presença de MC nas amostras extracelulares foi semelhante quando comparada a amostra controle e as irradiadas por feixe de elétrons.

Nesta análise, cabe analisar que a variante MC-YR (*m/z* 1045,49) apresentou concentração extracelular relativamente igual para todas as doses de radiação comparativamente à amostra controle. O mesmo foi observado para a variante MC-FR (*m/z* 1029,49).

NATUMI e JANSSEN, (2020) estudaram a produção de cianopeptídeos e MC e a relação nos efeitos dos estágios de crescimento e disponibilidade de nutrientes. Foi observado que do total de cianopeptídeos em *M. aeruginosa* as ciclâmidas corresponderam a cerca de 82 %, as cianopeptolinas à 14% e as MC à 4%. No mesmo estudo, os autores observaram que as concentrações desses cianopeptídeos estavam ligados à determinada fase de crescimento e à disponibilidade de nutriente no meio, a partir da relação N/P.

Na abordagem experimental das MC extracelulares, as concentrações médias da MC total e das variantes de MC extracelulares nas amostras de controle e irradiadas com feixe de elétrons são apresentadas na Figura 18.

Figura 18 - Concentração das MC extracelulares nas amostras controle e tratadas por feixe de elétrons logo após o processo de irradiação: (a) MC extracelulares totais e (b) variantes de MC extracelulares. Os dados são representados pela média de três amostras (n=3); barras de erro indicam o desvio padrão (dp) de cada conjunto de dados.

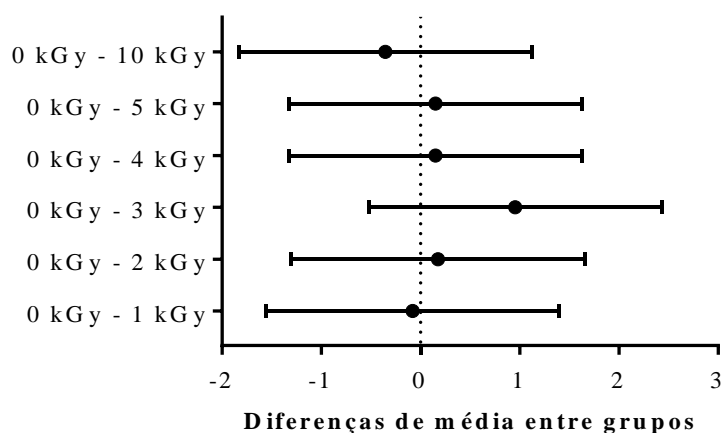


Fonte: autora da dissertação

De modo geral, nos sobrenadantes da cultura controle e irradiadas por feixe de elétrons foram identificadas e quantificadas somente duas variantes: MC-RR e MC-dmRR. No controle, a variante MC-RR apresentou concentração média de $0,378 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, correspondendo à 57,81 % da concentração média de MC total ($0,654 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$).

Diferentemente do observado para as MC intracelulares, como efeito imediato a irradiação por feixe de elétrons não alterou a concentração média de MC total com o aumento da dose. De acordo com os resultados do teste One-way ANOVA para os grupos de MC total extracelular e o controle, todas as doses por feixe de elétrons mostraram desempenho não significativamente diferente do controle (0 kGy). A Figura 19 mostra a diferença de médias entre os grupos (controle e dose) analisados utilizando o intervalo de confiança de 95 %.

Figura 19 - Intervalo de confiança de 95 % (Dunnett) em relação à amostra controle (0 kGy) para a MC total extracelular.



Fonte: autora da dissertação

Estatisticamente, não há diferença significativa na média em relação ao controle com o aumento da dose empregada na cultura de cianobactérias de *M. aeruginosa*. Dessa forma, em exceção à dose de 3 kGy, a qual apresenta maior diferença entre a concentração média de MC total quantificada bem como as diferenças superiores e inferiores determinadas pelo intervalo de confiança de 95 % com relação ao controle, as demais doses estão dentro dos limites obtidos para o controle.

4.3 Influência da irradiação por feixe de elétrons na toxicidade

4.3.1 Microcústáceo *Daphnia similis*

A partir das análises dos diversos compostos metabólicos identificados nas amostras intracelulares e extracelulares, foram realizados ensaios de toxicidade com o cladóceros *Daphnia similis* com exposição à cultura de cianobactérias e ao sobrenadante de cada cultura para analisar possíveis respostas distintas do organismo-teste. Assim, foram realizados ensaios de toxicidade com *Daphnia similis* em quatro grupos de amostras, a saber: culturas de *M. aeruginosa* cultivadas por 7 e 15 dias nas fases exponenciais com e sem irradiação por feixe de elétrons e os sobrenadantes (porção da solução sem a biomassa das cianobactérias) das culturas nas mesmas fases exponenciais e mesmas condições de tratamento.

Para as culturas controle e irradiadas com feixe de elétrons com 7 dias, os resultados de CE_{50} (48 h), os limites inferiores (L.I.) e superiores (L.S.) do intervalo de confiança de 95 % e o coeficiente de correlação (R) para cada um dos ensaios são apresentados na Tabela 7.

Tabela 7 - Valores de CE_{50-48 h} (%), limite inferior L.I. (%) e limite superior L.S. (%) e coeficiente de correlação (R) das culturas de *M. aeruginosa* (cultivo de 7 dias) com e sem tratamento por irradiação por feixe de elétrons nos ensaios de toxicidade com *Daphnia similis*. Os dados são representados pela média de três amostras (n=3) e o desvio padrão (dp) de cada conjunto de dados.

Dose (kGy)	Ensaio	CE_{50-48 h} (%)	L.I. (%)	L.S. (%)	R
0 (controle)	1	1,711	-	-	0,973
	2	2,014	-	2,283	0,940
	3	2,123	1,869	2,367	0,950
	Média ± dp	1,949 ± 0,213	1,869	2,325	
1	1	1,629	1,559	1,795	0,944
	2	1,889	1,659	2,161	0,907
	3	2,206	1,891	2,590	0,885
	Média ± dp	1,908 ± 0,289	1,703 ± 0,170	2,182 ± 0,398	
2	1	2,583	2,294	-	0,931
	2	2,742	2,441	-	0,928
	3	2,754	2,310	3,271	0,884
	Média ± dp	2,693 ± 0,095	2,348 ± 0,081	3,271	-
3	1	51,42	44,67	-	0,809
	2	51,19	-	-	0,918
	3	51,50	-	-	0,967
	Média ± dp	51,37 ± 0,161	44,670	-	
4	1	25,23	-	-	0,950
	2	22,19	19,81	24,760	0,965
	3	35,28	28,25	43,380	0,866
	Média ± dp	27,567 ± 6,851	24,03 ± 5,968	34,070 ± 13,16	
5	1	17,67	-	-	0,983
	2	14,51	-	17,26	0,940
	3	13,56	11,68	15,65	0,916
	Média ± dp	15,247 ± 2,152	11,680	16,455	
10	1	27,80	-	33,40	0,887
	2	25,02	16,97	33,93	0,775
	3	29,71	-	-	0,964
	Média ± dp	27,51 ± 2,358	16,97	33,665	

Fonte: autora da dissertação.

Para as cianobactérias cultivadas por 15 dias irradiadas com feixe de elétrons os resultados de CE₅₀ (48 h), os limites inferiores (L.I.) e superiores (L.S.) do intervalo de confiança de 95 % e o coeficiente de relação (R) são apresentados na Tabela 8.

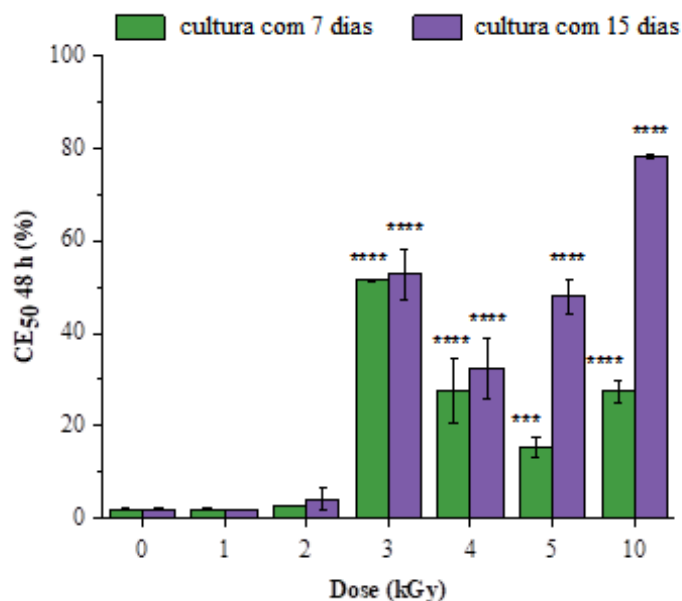
Tabela 8 - Valores de CE_{50-48 h} (%), limite inferior L.I. (%) e limite superior L.S. (%) e coeficiente de relação (R) das culturas de *M. aeruginosa* (cultivo por 15 dias) com e sem tratamento por irradiação por feixe de elétrons nos ensaios de toxicidade com *Daphnia similis*. Os dados são representados pela média de três amostras (n=3) e o desvio padrão (dp) de cada conjunto de dados.

Dose (kGy)	Ensaio	CE _{50-48 h} (%)	L.I. (%)	L.S. (%)	R
0 (controle)	1	2,095	1,846	2,386	0,916
	2	2,083	1,836	2,362	0,915
	3	1,862	1,537	2,282	0,819
	Média ± dp	2,013 ± 0,131	1,740 ± 0,176	2,343 ± 0,054	
1	1	1,731	1,557	1,939	0,933
	2	1,936	1,703	2,212	0,912
	3	1,923	1,675	2,215	0,896
	Média ± dp	1,863 ± 0,115	1,645 ± 0,077	2,122 ± 0,158	
2	1	6,695	2,747	15,50	0,369
	2	2,481	1,958	3,229	0,798
	3	3,418	2,539	4,658	0,787
	Média ± dp	4,198 ± 2,213	2,415 ± 0,409	7,796 ± 6,71	
3	1	54,55	49,11	-	0,648
	2	46,58	34,85	59,55	0,763
	3	57,06	42,63	69,41	0,640
	Média ± dp	52,73 ± 5,472	42,19 ± 7,14	64,48 ± 6,972	
4	1	36,78	30,57	43,97	0,898
	2	24,98	21,76	28,61	0,949
	3	35,38	28,95	42,74	0,892
	Média ± dp	32,38 ± 6,447	27,09 ± 4,689	38,44 ± 8,535	
5	1	47,31	39,52	55,64	0,867
	2	44,77	38,15	51,95	0,895
	3	52,10	44,27	59,81	0,862
	Média ± dp	48,06 ± 3,722	40,65 ± 3,212	55,80 ± 3,932	
10	1	78,34	-	-	0,924
	2	77,69	-	82,07	0,923
	3	78,35	-	-	0,912
	Média ± dp	78,13 ± 0,378	-	-	

Fonte: autora da dissertação.

A Figura 20 apresenta uma comparação das CE₅₀ (48h) médias obtidos para cada dose de radiação nos diferentes tempos de cultura de *M. aeruginosa*.

Figura 20 - Concentração efetiva em 50% dos organismos (CE_{50}) após exposição de 48 h nas culturas controle (0 kGy) e tratadas por feixe de elétrons logo após o processo de irradiação: nas culturas com 7 (verde) e 15 dias (roxo). Os dados são representados pela média de três amostras ($n=3$); barras de erro indicam o desvio padrão (dp) de cada conjunto de dados. $p<0,001$ (***) e $p<0,0001$ (****).



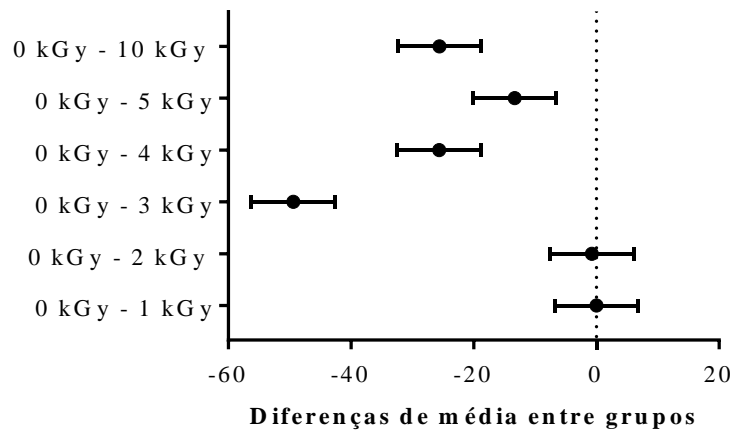
Fonte: autora da dissertação.

Os neonatos de *D. similis* expostos por 48 h às culturas apresentaram dois comportamentos distintos. As doses de 1 e 2 kGy não tiveram diferença com o valor médio obtido na amostra controle. Isso pode ser deduzido com os resultados de crescimento da cultura e dos pigmentos fotossintéticos analisados no presente estudo e apresentados anteriormente. Na dose de 1 kGy, a cultura não teve diferença significativa em seu desenvolvimento após o processamento por radiação, atingindo no período de 48 h crescimento próximo ao obtido pelo controle

Comparações através do teste One-way ANOVA indicaram que houve diferenças estatisticamente significativas na faixa de dose 3, 4, 5 e 10 kGy nas culturas de *M. aeruginosa* (valor $p<0,001$).

A Figura 21 apresenta a diferença de médias entre os grupos (controle e dose) analisados utilizando o intervalo de confiança de 95 % quando avaliado os valores médios de CE_{50} obtidos nos ensaios de toxicidade com *Daphnia similis* quando irradiadas as culturas de *M. aeruginosa* cultivadas por 7 dias.

Figura 21 - Intervalo de confiança de 95 % (Dunnett) das CE₅₀ (48 h) dos ensaios de toxicidade com *Daphnia similis* em culturas cultivadas por 7 dias.

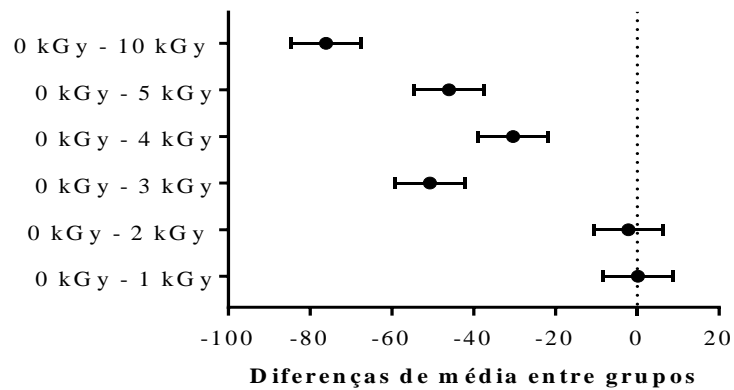


Fonte: autora da dissertação.

Estatisticamente, não há diferença significativa na média das CE₅₀ em relação ao controle quando analisados os ensaios de ecotoxicidade das culturas irradiadas com doses de 1 e 2 kGy. Essa pequena desigualdade na diferença entre as médias de CE₅₀ nas doses de radiação 1 e 2 kGy está representada graficamente como próximo ao 0 no eixo de diferença de média entre grupos. Ainda neste grupo amostral, a dose de 3 kGy apresentou a maior diferença entre a CE₅₀ com relação ao controle (0 kGy). Assim, como o valor da CE₅₀ (48 h) médio foi muito maior do que o obtido para a amostra controle, estes se encontram na região negativa do gráfico. Região esta que também abrange a comparação das doses de 4, 5 e 10 kGy.

Na Figura 22 é apresentada a diferença de médias entre os grupos controle e dose, em relação aos valores médios de CE₅₀ obtidos nos ensaios de toxicidade com *Daphnia similis* quando irradiadas as culturas de *M. aeruginosa* com 15 dias.

Figura 22 - Intervalo de confiança de 95 % (Dunnett) das CE_{50} (48 h) dos ensaios de toxicidade com *Daphnia similis* em culturas com 15 dias.

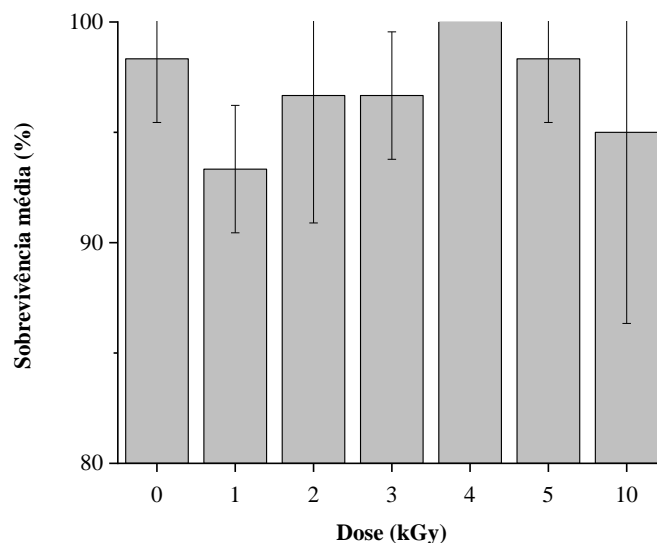


Fonte: autora da dissertação.

Quando analisado estatisticamente os resultados de ecotoxicidade das culturas de *M. aeruginosa* irradiadas por feixe de elétrons, novamente, não houve diferença significativa nas médias das CE_{50} quando analisadas as doses de 1 e 2 kGy. Esse grupo amostral mostrou comportamento ecotoxicológico semelhante à cultura com 7 dias. Porém, aqui, a dose de 10 kGy apresentou a maior diferença entre a CE_{50} com relação ao controle (0 kGy).

Em geral, quando o microcrustáceo *Daphnia similis* foi exposto ao sobrenadante das culturas de *M. aeruginosa* em crescimento por 7 dias, esta amostra não apresentou efeito agudo aos organismos, mesmo na concentração de 100 % para todas as doses de radiação utilizadas (Figura 23).

Figura 23 - Sobrevivência média (%) de *Daphnia similis* à concentração de 100 % do sobrenadante das culturas de *M. aeruginosa*, com 7 dias, após irradiação por feixe de elétrons. Os dados são representados pela média de três amostras (n=3); barras de erro indicam o desvio padrão (dp) de cada conjunto de dados.

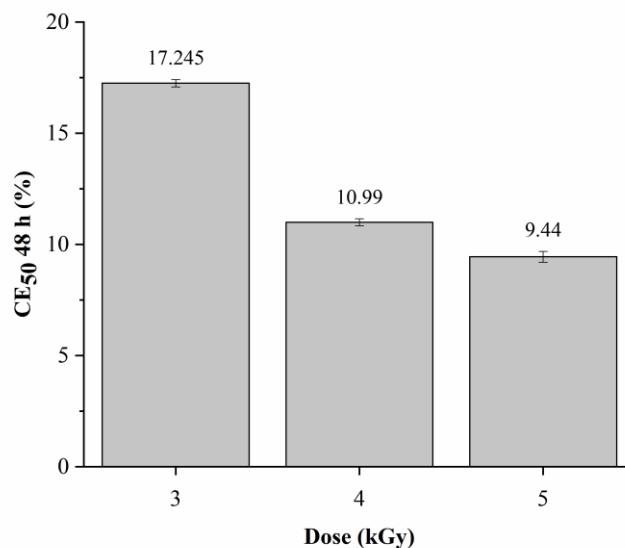


Fonte: autora da dissertação.

A sobrevivência média dos neonatos nas concentrações nominais de 100 % para todos os sobrenadantes em todas as doses de irradiação oscilaram entre 93,33 % (dose de 1 kGy) e 100 % (dose de 4 kGy). Pode-se deduzir que o sobrenadante não se mostrou tóxico aos organismos mesmo com a concentração de MC determinadas para as amostras tratadas por feixe de elétrons e, também, para a cultura controle. De acordo com LYCK (2004) as maiores concentrações de metabólitos, incluindo as microcistinas, carboidratos, proteínas, dentre outros, estão em maior concentração no final da fase exponencial e estabilização da cultura. Fato este pode ter contribuído para a não letalidade de *Daphnia similis* à esse sobrenadante.

A exposição de *Daphnia similis* ao sobrenadante à cultura com 15 dias foi realizada e o gráfico de CE₅₀ (48 h) é apresentado na Figura 24.

Figura 24 - Concentração efetiva em 50 % dos organismos (CE_{50}) após exposição de 48 h ao sobrenadante das culturas de *M. aeruginosa*, cultivo com 15 dias, após irradiação por feixe de elétrons. Os dados são representados pela média de três amostras (n=3); barras de erro indicam o desvio padrão (dp) de cada conjunto de dados.



Fonte: autora da dissertação.

As amostras sobrenadantes das culturas com 15 dias se mostraram mais tóxicas quando comparadas à cultura em início da fase exponencial. Vale notar que o sobrenadante das amostras controle (0 kGy), 1 e 2 kGy não apresentaram efeito agudo à *Daphnia similis*. Porém, houve aumento na toxicidade com o aumento da dose de radiação. A diferença de toxicidade quando comparada as fases das culturas indicam que a exposição de *Daphnia similis* e sua tolerância aos compostos observados no sobrenadante e nas concentrações encontradas são fatores determinantes para a toxicidade.

Os resultados obtidos no presente estudo corroboram com diversos estudos ecotoxicológicos na exposição de espécies do zooplâncton à cianobactérias tóxicas. Neste caso, quando os organismos-modelo são expostos à culturas de cianobactérias ou extratos brutos obtidos de florações tóxicas. LIRA et al., (2017) observaram que suspensão de células liofilizadas das cianobactérias *Microcystis aeruginosa* e *Cylindrospermopsis raciborskii* com concentrações das toxinas MC e STX entre $1 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ para MC e $3 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, respectivamente, não resultaram em mortalidade significativa para *Ceriodaphnia dubia*.

MOHAMED et al., (2018) avaliaram por 10 dias o efeito da ingestão da cianobactéria *M. aeruginosa* no copépode *Cyclops vicinus*. Os autores verificaram que o copépode apresentou alta taxa de pastejo, o qual variou de acordo com a densidade celular de *M. aeruginosa*. Além disso, embora a produção de MC pela cianobactéria tenha

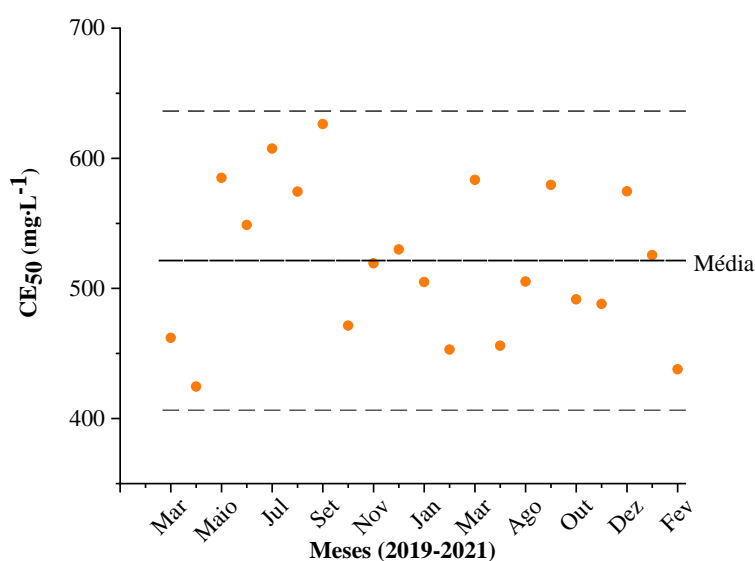
aumentado durante o período do experimento em relação à cultura controle, reafirmando que a produção de cianotoxinas pode ser uma tática de defesa contra a predação, os copépodes expostos não apresentaram mortalidade nem diminuição na taxa de crescimento durante o experimento.

ESTERHUIZEN-LONDT et al., (2016) investigaram os efeitos de extratos brutos de florações e misturas de cianotoxinas obtidas comercialmente para analisar os efeitos no estresse oxidativo em *Daphnia pulex*. Foi observado que embora não tenha sido observado mortalidade dos organismos, o extrato bruto de floração se mostrou mais tóxico em relação ao estresse oxidativo nos dafnídeos, resultando em peroxidação lipídica, redução da atividade das enzimas antioxidantes e, também, maior tempo de recuperação para diminuir o aumento da concentração celular de peróxido de hidrogênio.

4.3.2 Carta controle

A Figura 25 apresenta a carta controle com os ensaios de sensibilidade do microcrustáceo *Daphnia similis* à substância de referência cloreto de potássio (KCl). O coeficiente de variação (CV%) obtido para os meses analisados foi de 11,02 %, valor inferior aos 30 % recomendado pela agência de proteção ambiental canadense (Environment Canada, 1990).

Figura 25 - Carta controle de sensibilidade para o cladócero *Daphnia similis* à substância de referência KCl.



Fonte: autora da dissertação.

A realização mensal dos ensaios de sensibilidade à substância de referência atua como controle da qualidade e confiabilidade dos dados obtidos nos ensaios de

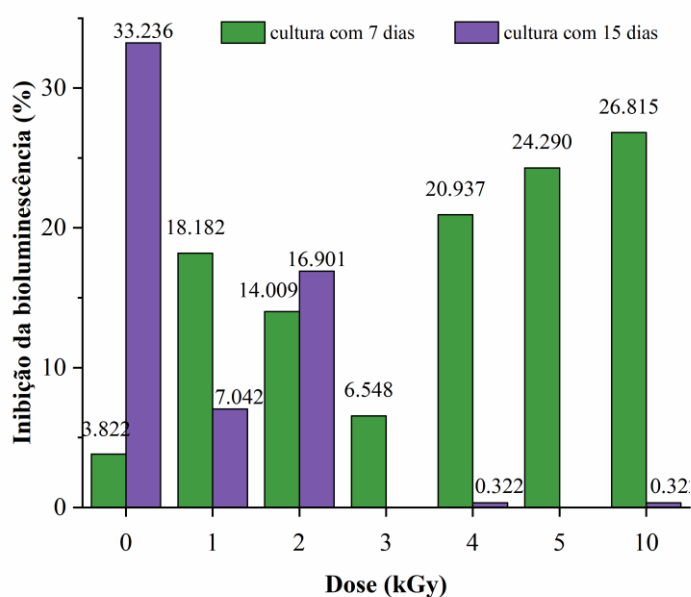
toxicidade. A partir dos resultados obtidos foi confeccionada a carta-control (ou gráfico-control) com a média e limites superiores e inferiores, relacionados duas vezes o desvio padrão acima e abaixo da média, respectivamente. Dessa forma, todos os ensaios de toxicidade relacionados para o presente estudo foram validados a partir da carta-control.

4.3.3 Bactéria marinha luminescente *Alivibrio fischeri*

Primeiramente, para garantir a confiabilidade dos dados gerados nesta etapa da pesquisa, foi realizado o ensaio com a substância de referência fenol. Desse modo, a exposição da bactéria à substância gerou como resultado o valor médio de CE50 – 15 min igual à $17,95 \pm 2,15$ %. A análise deste valor em carta-control garantiu a viabilidade dos ensaios de toxicidade, os quais serão apresentados e discutidos a seguir.

A bactéria marinha luminescente *Alivibrio fischeri* foi exposta ao sobrenadante das culturas de *M. aeruginosa* cultivadas por 7 e 15 dias. Como não houve efeito na luminescência em baixas concentrações, o percentual de inibição da luminescência foi determinado para a concentração de 81,90 %, em todas as doses de radiação utilizadas (Figura 26).

Figura 26 - Percentual de inibição na luminescência da bactéria *Alivibrio fischeri* quando exposta as amostras sobrenadantes das culturas cultivadas por 7 e 15 dias com e sem tratamento por feixe de elétrons.



Fonte: autora da dissertação.

A toxicidade das culturas de *M. aeruginosa* não foi possível de ser determinada para *Alivibrio fischeri*. Assim, somente as amostras sobrenadantes de cada uma das

culturas após o tratamento por feixe de elétrons foram analisadas e apresentaram efeito adverso à bactéria marinha, como mostrado na Figura 25.

Nesses dois grupos de amostras (sobrenadantes das culturas de 7 e 15 dias), o percentual da inibição da luminescência na cultura de 7 dias foi muito menor do que o apresentado pela cultura de 15 dias, 3,82 e 33,24 %, respectivamente. Porém, nas amostras que receberam a dose de radiação, na cultura de 15 dias não foram observados efeitos na luminescência da bactéria nas culturas irradiadas nas doses de 3 e 5 kGy, enquanto que à exceção do controle, os maiores percentuais na inibição foram nas doses de 1 e 2 kGy. Já na cultura de 7 dias, o percentual de inibição foi mais expressivo, com maior valor registrado na dose de 10 kGy (26,81 %). D'ORS et al., (2012) utilizaram o extrato bruto de oito culturas de *M. aeruginosa* para comparar os resultados ecotoxicológicos dos métodos ELISA e Microtox®. Os resultados por Microtox® mostraram que os extratos brutos puderam ser divididos em três grupos, classificados de acordo com os valores de CE₅₀ 15 min obtidos para cada um dos extratos celulares das culturas de *M. aeruginosa*. Os resultados mostraram boa correlação com os resultados determinados por teste ELISA.

LÓPEZ FLORES et al., (2010) observaram que os resultados negativos de toxicidade na exposição de *Alivibrio fischeri* às florações tóxicas de cianobactérias pode ser deduzida pela ausência de compostos tóxicos na água, explicação que possa ser estendida a avaliação do sobrenadante da cultura com 7 dias no presente estudo. Além disso, outra possível explicação pode ser devido à baixa toxicidade dos compostos resultantes das florações à bactéria marinha.

A partir dos resultados aqui expostos, têm-se a comparação entre aplicabilidade da irradiação por feixe de elétrons na degradação de cianotoxinas e na inibição do aumento da biomassa da cianobactéria *Microcystis aeruginosa* aos demais processos utilizados para o tratamento destes poluentes. Desse modo, WESTRICK et al., (2010) apresentou uma revisão sobre os diversos processos para a remoção/inibição de cianobactérias e cianotoxinas aplicados no tratamento de água. De acordo com os autores, a adição de oxidantes em uma das etapas de tratamento da água, como por exemplo o cloro, pode promover, no caso da presença de grandes densidades celulares, a lise celular e consequente liberação de diversos metabólitos, dentre eles as cianotoxinas, piorando a qualidade da água que está sendo tratada. Uma outra problemática envolvendo o uso deste composto é a alta toxicidade desta produto já em sua manipulação e, também, na possível formação de subprodutos altamente tóxicos.

Ainda de acordo com os mesmos autores, quando avaliada a eficiência do tratamento convencional para as cianotoxinas extracelulares, o processo mais comumente utilizado é o carvão ativado (WESTRICK et al., 2010). Há basicamente dois tipos de carvão ativado que são usados no tratamento de água, um na forma de pó e o outro na forma granular (CAG). Quando na forma de pó, é utilizado para tratar contaminantes transitórios, sendo um tratamento temporário. Já o CAG é colocado em leitos fixos, com o objetivo de reduzir matéria orgânica natural, além de remover sabor e odor de diversos compostos e adsorver compostos orgânicos sintéticos de origem industrial (WESTRICK et al., 2010). É importante ressaltar que a eficiência do processo de adsorção é altamente dependente do conteúdo presente no meio a ser tratado. De acordo com ABBAS et al., 2020, a eficiência do carvão ativado no tratamento de cianotoxinas é influenciada pela concentração de matéria orgânica (MO) presente na água, uma vez que a MO possui uma cadeia carbônica longa, o que influencia na adsorção de cadeiras curtas, como as cianotoxinas.

Quando analisado o tratamento aplicado no Brasil, de acordo com manual disponibilizado pela Fundação Nacional de Saúde (FUNASA), o guia atesta que embora o carvão ativado seja capaz de remover cianotoxinas quando utilizado como processo de tratamento único ou de forma combinada com o tratamento convencional, este material se mostra seletivo ao tipo de cianotoxina. Dessa maneira, as hepatotoxinas e neurotoxinas são melhor removidas quando há a utilização do CAG enquanto que o carvão ativado em pó não se mostra eficaz quando usado para as mesmas cianotoxinas mencionadas (BRASIL, 2014). Além disso, o uso deste material durante a ocorrência de florações de cianobactérias e na concentração de cianotoxinas implica no aumento de custo no tratamento da água.

Dessa maneira, a utilização do processo de tratamento por radiação se mostra mais vantajoso e econômico quando há evidências de florações de cianobactérias e presença de cianotoxinas. De acordo com Hossain et al., (2018) o custo é estimado em cerca de US\$ 0,041 para cada m³, considerando um tratamento de 200.000 m³ de água por dia. Ainda neste valor, estão sendo considerados os custos de operação, capacidade e o descarte da água tratada. Além disso, baixas dosagens de radiação podem ocasionar a inibição e inativação de microrganismos, garantindo uma maior qualidade sanitária da água tratada.

5 CONCLUSÃO

A irradiação por feixe de elétrons apresentou diminuição considerável no crescimento e desenvolvimento da cultura de *M. aeruginosa*.

Durante o período de monitoramento de 48 h após o processamento por radiação, as concentrações de clorofila-*a* e carotenóides totais tiveram significativa diminuição com o aumento na dose de radiação. Porém, na dose de 1 kGy houve, para ambas culturas, aumento na concentração dos pigmentos em relação ao controle devido à inibição da atividade de clorofilase.

Os efeitos nos parâmetro físico-químicos indicaram diminuição de pH com o aumento da dose nas culturas irradiadas por feixe de elétrons. Também foi possível observar que a partir da dose de 3 kGy os valores de pH de ambas culturas se mantiveram estáveis, mantendo-se dentro do intervalo de pH (7,5 a 8,5), indicando que a radiação por feixe de elétrons teve efeito máximo na alteração nesta solução até a dose de 2 kGy.

O tratamento por feixe de elétrons se mostrou eficiente na degradação de MC intracelulares, bem como para diversos metabólitos que foram identificados por análise metabolômica e posteriormente por espectros de LC-MS/MS. Além disso, a radiação ionizante teve efeito nas microcistinas analisadas qualitativamente por meio de espectrometria de massa. Já nas amostras extracelulares, a concentração média de MC total extracelular não sofreu variação com a irradiação.

Em relação aos ensaios ecotoxicológicos para *Daphnia similis*, os resultados se mostraram estatisticamente significativos a partir da dose de 3 kGy. Vale ressaltar que a toxicidade apresentou significativa diferença quando analisados os sobrenadantes de cada cultura irradiada nas diferentes doses. Dessa maneira, a cultura com 7 dias teve percentual médio de sobrevivência acima de 90 % em todas as doses de radiação testadas. Já os ensaios de toxicidade com *Alivibrio fischeri*, a menor inibição na luminescência foi observada a partir da dose de 3 kGy com a cianobactéria com cultivo de 15 dias.

Os resultados permitem apontar que a irradiação por feixe de elétrons se mostrou uma tecnologia eficaz para a inibição do crescimento de *M. aeruginosa* com resultados significativos na diminuição da concentração de MC total intracelular já na dose de 1 kGy. Dessa maneira, mostra-se viável no tratamento desta espécie largamente conhecida e identificada em florações tóxicas de cianobactérias e produtora de toxinas potencialmente tóxicas ao ser humano e a diversos organismos.

6 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Sugere-se para trabalhos futuros o uso da radiação ionizante por feixe de elétrons em amostras reais de florações de cianobactérias, uma vez que os constituintes da água influenciam na eficiência da irradiação.

É necessário ensaios ecotoxicológicos que analisem efeitos no sistema reprodutivo e de crescimento nos organismos-testes por meio de ensaios de toxicidade crônica, uma vez que a exposição à determinada concentração da toxina ou à cianobactéria não ocasionou a letalidade dos organismos testados.

7 REFERÊNCIAS

- ABBAS, T.; KAJJUMBA, G. W.; EJJADA, M.; MASRURA, S. U.; MARTI, E. J.; KHAN, E.; JONES-LEPP, T. L. Recent advancements in the removal of cyanotoxins from water using conventional and modified adsorbents—a contemporary review. *Water*, v. 12, n. 10, p. 2756, 2020.
- ANDREEVA, N. A.; MELNIKOV, V. V.; SNARSKAYA, D. D. The Role of Cyanobacteria in Marine Ecosystems. *Russian Journal of Marine Biology*, v. 46, n. 3, p. 154–165, 2020.
- ANDRES, M. S.; REID, R. P. Growth morphologies of modern marine stromatolites: a case study from Highborne Cay, Bahamas. *Sedimentary Geology*, v. 185, n. 3–4, p. 319–328, 2006.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. *Ecotoxicologia aquática - Toxicidade aguda - Método de ensaio com Daphnia spp (Crustacea, Cladocera)*. Rio de Janeiro: ABNT, 2016. (NBR 12713): [s.n.], [S.d.]
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. *Ecotoxicologia aquática — Determinação do efeito inibitório de amostras aquosas sobre a emissão da bioluminescência de Vibrio fischeri (ensaio de bactéria luminescente)*. Rio de Janeiro: ABNT, 2012. (NBR 15411-2): [s.n.], [S.d.]
- BABU, D. S.; SRIVASTAVA, V.; NIDHEESH, P. V.; KUMAR, M. S. Detoxification of water and wastewater by advanced oxidation processes. *Science of the Total Environment*, v. 696, p. 133961, 2019.
- BORRELY, S. I.; CRUZ, A. C.; DEL MASTRO, N. L.; SAMPA, M. H. O.; SOMESSARI, E. S. Radiation processing of sewage and sludge. A review. *Progress in Nuclear Energy*, v. 33, n. 1–2, p. 3–21, 1998.
- BOUAÏCHA, N.; MILES, C. O.; BEACH, D. G.; LABIDI, Z.; DJABRI, A.; BENAYACHE, N. Y.; NGUYEN-QUANG, T. Structural diversity, characterization and toxicology of microcystins. *Toxins*, v.11, n. 12, p. 714, 2019.
- BRASIL. PORTARIA GM/MS Nº 888, DE 4 DE MAIO DE 2021. Altera o Anexo XX da Portaria de Consolidação GM/MS nº 5, de 28 de setembro de 2017, para dispor sobre os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade.
- BRASIL. Fundação Nacional de Saúde (FUNASA). Manual de Controle da Qualidade da Água para Técnicos que Trabalham em ETAS. Ministério da Saúde, Fundação Nacional de Saúde. – Brasília: Funasa, 2014. 112 p

BÜDEL, B.; WILLIAMS, W. J.; REICHENBERGER, H. Annual net primary productivity of a cyanobacteria-dominated biological soil crust in the Gulf Savannah, Queensland, Australia. *Biogeosciences*, v. 15, n. 2, p. 491–505, 2018.

BURATTI, F. M.; MANGANELLI, M.; VICHI, S.; STEFANELLI, M.; SCARDALA, S.; TESTAI, E.; FUNARI, E. Cyanotoxins: producing organisms, occurrence, toxicity, mechanism of action and human health toxicological risk evaluation. *Archives of toxicology*, v. 91, n. 3, p. 1049–1130, 2017.

CALVO, W. A. P.; DUARTE, C. L.; MACHADO, L. D. B.; MANZOLI, J. E.; GERALDO, A. B. C.; KODAMA, Y.; SILVA, L. G. A.; PINO, E. S.; SOMESSARI, E. S. R.; SILVEIRA, C. G. Electron beam accelerators—trends in radiation processing technology for industrial and environmental applications in Latin America and the Caribbean. *Radiation Physics and Chemistry*, v. 81, n. 8, p. 1276–1281, 2012.

CARMICHAEL, W. W. Cyanobacteria secondary metabolites—the cyanotoxins. *Journal of applied bacteriology*, v. 72, n. 6, p. 445–459, 1992.

CHERNOFF, N.; HILL, D.; LANG, J.; SCHMID, J.; LE, T.; FARTHING, A.; HUANG, H. The comparative toxicity of 10 microcystin congeners administered orally to mice: clinical effects and organ toxicity. *Toxins*, v. 12, n. 6, p. 403, 2020.

CHMIELEWSKI, A. Application of ionizing radiation to environment protection. *Nukleonika*, v. 50, p. 17–24, 2005.

CHORUS, I.; WELKER, M. *Toxic cyanobacteria in water: a guide to their public health consequences, monitoring and management*. [S.l.]: Taylor & Francis, 2021.

COMPANHIA AMBIENTAL DO ESTADO DE SÃO PAULO. *Determinação da dureza total em águas - método titulométrico do EDTA: método de ensaio*. São Paulo: CETESB, 1992. (L5.124): [s.n.], [S.d.]

CONAMA, R. 357/2005. *Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências*, 2005.

CORAL, L. A.; ZAMYADI, A.; BARBEAU, B.; BASSETTI, F. J.; LAPOLLI, F. R.; PREVOST, M. Oxidation of *Microcystis aeruginosa* and *Anabaena flos-aquae* by ozone: Impacts on cell integrity and chlorination by-product formation. *Water research*, v. 47, n. 9, p. 2983–2994, 2013.

CULLEN, A.; PEARSON, L. A.; MAZMOUZ, R.; LIU, T., SOERİYADI, A. H.; ONGLEY, S. E.; NEILAN, B. A. Heterologous expression and biochemical characterisation of cyanotoxin biosynthesis pathways. *Natural product reports*, v. 36, n. 8,

p. 1117-1136, 2019.

D'ORS, A.; BARTOLOMÉ, M. C.; SÁNCHEZ-FORTÚN, S. Importance of strain type to predict the toxicological risk associated with *Microcystis aeruginosa* blooms: comparison of Microtox® analysis and immunoassay. *Journal of water and health*, v. 10, n. 2, p. 256–261, 2012.

DE VOS, C. H. R.; SCHAT, H.; VOOIJS, R.; ERNST, W. H. O. Copper-induced damage to the permeability barrier in roots of *Silene cucubalus*. *Journal of plant physiology*, v. 135, n. 2, p. 164–169, 1989.

DEMAY, J.; BERNARD, C.; REINHARDT, A.; MARIE, B. Natural products from cyanobacteria: focus on beneficial activities. *Marine drugs*, v. 17, n. 6, p. 320, 2019.

DEMOTT, W. R.; ZHANG, Q.; CARMICHAEL, W. W. Effects of toxic cyanobacteria and purified toxins on the survival and feeding of a copepod and three species of *Daphnia*. *Limnology and Oceanography*, v. 36, n. 7, p. 1346–1357, 1991.

DOKULIL, M. T.; TEUBNER, K. Cyanobacterial dominance in lakes. *Hydrobiologia*, v. 438, n. 1, p. 1–12, 2000.

DUY, T. N.; LAM, P. K. S.; SHAW, G. R.; CONNELL, D. W. Toxicology and risk assessment of freshwater cyanobacterial (blue-green algal) toxins in water. *Reviews of environmental contamination and toxicology*, p. 113–185, 2000.

EPA, U. S. Cyanobacteria and Cyanotoxins: Information for Drinking Water Systems. 2014.

ESTERHUIZEN-LONDT, M.; VON SCHNEHEN, M.; KÜHN, S.; PFLUGMACHER, S. Oxidative stress responses in the animal model, *Daphnia pulex* exposed to a natural bloom extract versus artificial cyanotoxin mixtures. *Aquatic Toxicology*, v. 179, p. 151–157, 2016.

FERBER, L. R.; LEVINE, S. N.; LINI, A.; LIVINGSTON, G. P. Do cyanobacteria dominate in eutrophic lakes because they fix atmospheric nitrogen? *Freshwater Biology*, v. 49, n. 6, p. 690–708, 2004.

FERRÃO-FILHO, A. D. S.; KOZLOWSKY-SUZUKI, B. Cyanotoxins: bioaccumulation and effects on aquatic animals. *Marine drugs*, v. 9, n.12, p. 2729-2772, 2011.

FOGG, G. E.; THAKE, B. *Algal cultures and phytoplankton ecology*. [S.l.]: Univ of Wisconsin Press, 1987.

FOLCIK, A. M.; PILLAI, S. D. A critical review of ionizing irradiation technologies for the remediation of waters containing Microcystin-LR and *M. aeruginosa*. *Radiation Physics and Chemistry*, p. 109128, 2020.

GARCIA, V. S. G.; ROSA, J. M.; BORRELY, S. I. Toxicity and color reduction of a textile effluent containing reactive red 239 dye by electron beam irradiation. *Radiation Physics and Chemistry*, v. 172, p. 108765, 2020.

GARCIA, V. S. G. **Emprego de acelerador de elétrons para a redução da toxicidade de efluente têxtil e de produtos químicos aplicados durante o tingimento do algodão.** 2020. 128 p. Tese (Doutorado em Tecnologia Nuclear) Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo. Disponível em <<http://www.teses.usp.br>> Acesso em 05 maio 2021.

GEHRINGER, P.; ESCHWEILER, H.; SZINOVATZ, W.; FIEDLER, H.; STEINER, R.; SONNECK, G. Radiation-induced OH radical generation and its use for groundwater remediation. *Radiation Physics and Chemistry*, v. 42, n. 4–6, p. 711–714, 1993.

GER, K. A.; TEH, S. J.; GOLDMAN, C. R. Microcystin-LR toxicity on dominant copepods *Eurytemora affinis* and *Pseudodiaptomus forbesi* of the upper San Francisco Estuary. *Science of the Total Environment*, v. 407, n. 17, p. 4852–4857, 2009.

GORHAM, P.; MCLACHLAN, J.; HAMMER, U. T.; KIM, W. K. Isolation and culture of toxic strains of *Anabaena flos-aquae* (Lyngb.) de Bréb: With Plate 7, 1 figure and 3 tables in the text. *Internationale Vereinigung für theoretische und angewandte Limnologie: Verhandlungen*, v. 15, n. 2, p. 796-804, 1964.

GURBUZ, F.; UZUNMEHMETOĞLU, O. Y.; DILER, Ö.; METCALF, J. S.; CODD, G. A. Occurrence of microcystins in water, bloom, sediment and fish from a public water supply. *Science of The Total Environment*, v. 562, p. 860–868, 2016.

HARDY, F. J.; JOHNSON, A.; HAMEL, K.; PREECE, E. Cyanotoxin bioaccumulation in freshwater fish, Washington State, USA. *Environmental monitoring and assessment*, v. 187, n.11, p. 1-15, 2015.

HARPER, D. M. *Eutrophication of freshwaters*. [S.l.]: Springer, 1992.

HERRERA, N. A.; ECHEVERRI, L. F.; FERRAO-FILHO, A. S. Effects of phytoplankton extracts containing the toxin microcystin-LR on the survival and reproduction of cladocerans. *Toxicon*, v. 95, p. 38–45, 2015.

HOSSAIN, K.; MARUTHI, Y. A.; DAS, N. L.; RAWAT, K. P.; SARMA, K. S. S. Irradiation of wastewater with electron beam is a key to sustainable smart/green cities: a review. *Applied water science*, v.8, n. 1, p. 1-11, 2008.

HU, Z.; LI, Y.; HAO, J. Study on the acute toxicity of microcystin-LR on *Hydra magnipapillata*. *Agricultural Science & Technology-Hunan*, v. 12, n. 10, p. 1525–1527, 2011.

- JACINAVICIUS, F. R. *Efeitos da temperatura, irradiância e competição no crescimento e na produção de cianotoxinas da cepa SPC777 – Microcystis aeruginosa (Kützing) Kützing (Cyanobacteria)*. 2010. Dissertação (mestrado) Instituto de Botânica.
- JACINAVICIUS, F. R.; CARNEIRO, R. L.; SANT'ANNA C. L.; RIGONATO, J.; CARVALHO, L. R. Phenotypic plasticity and negative allelopathy in *Microcystis* strains. *Annals of Microbiology*, v. 66, n. 3, p. 1265–1276, 2016.
- JACINAVICIUS, F. R.; GERALDES, V.; CRNKOVIC, C. M.; DELBAJE, E.; FIORE, M. F.; PINTO, E. Effect of ultraviolet radiation on the metabolomic profiles of potentially toxic cyanobacteria. *FEMS Microbiology Ecology*, v. 97, n. 1, p. f1aa243, 2021.
- KANG, H. Feasibility test to control algal bloom using electron beam irradiation. *Status of industrial scale radiation treatment of wastewater and its future*, p. 87, 2004.
- KIM, Y.; PONOMAREV, A. V. Low-dose electron beam treatment of red tide blooms microalgae. *Radiation Physics and Chemistry*, v. 179, p. 109201, 2021.
- KOMÁREK, J.; JOHANSEN, J. R. Filamentous cyanobacteria. *Freshwater Algae of North America*. [S.l.]: Elsevier, 2015. p. 135–235.
- KOMÁREK, J.; KAŠTOVSKÝ, J.; MAREŠ, J.; JOHANSEN, J. R. Taxonomic classification of cyanoprokaryotes (cyanobacterial genera) 2014, using a polyphasic approach. *Preslia*, v. 86, n. 4, p. 295–335, 2014.
- KURUCZ, C. N.; WAITE, T. D.; COOPER, W. J. The Miami electron beam research facility: a large scale wastewater treatment application. *Radiation Physics and Chemistry*, v. 45, n. 2, p. 299–308, 1995.
- LIRA, V. S.; MOREIRA, I. C.; TONELLO, P. S.; VIEIRA, A. A. H.; FRACÁCIO, R. Evaluation of the Ecotoxicological Effects of *Microcystis aeruginosa* and *Cylindrospermopsis raciborskii* on *Ceriodaphnia dubia* Before and After Treatment with Ultrasound. *Water, Air, & Soil Pollution*, v. 228, n. 1, p. 49, 2017.
- LIU, S.; ZHAO, Y.; JIANG, W.; WU, M.; MA, F. Inactivation of *Microcystis aeruginosa* by electron beam irradiation. *Water, Air, & Soil Pollution*, v. 225, n. 9, p. 1–6, 2014.
- LIU, S.; ZHAO, Y.; MA, F.; MA, L.; O'SHEA, K.; ZHAO, C.; HU, X.; WU, M. Control of *Microcystis aeruginosa* growth and associated microcystin cyanotoxin remediation by electron beam irradiation (EBI). *RSC Advances*, v. 5, n. 40, p. 31292–31297, 2015.
- LIU, S.; TAN, Y.; MA, F.; FU, H.; ZHANG, Y. Effects of electron beam irradiation on proteins and exopolysaccharide production and changes in *Microcystis aeruginosa*. *International Journal of Radiation Biology*, v. 96, n. 5, p. 689–696, 2020.
- LÓPEZ FLORES, R.; BOIX, D.; BADOSA, A.; BRUCET, S.; QUINTANA POU, X. D.;

- QUINTANA POU, X. Is Microtox® toxicity related to potentially harmful algae proliferation in Mediterranean salt marshes? *Limnetica*, v. 29, n. 2, p. 257–268, 2010.
- 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, n. 7, p. 727–736, 2004.
- MOHAMED, Z. A.; BAKR, A. A.; GHRAMH, H. A. Grazing of the copepod *Cyclops vicinus* on toxic *Microcystis aeruginosa*: potential for controlling cyanobacterial blooms and transfer of toxins. *Oceanological and Hydrobiological Studies*, v. 47, n. 3, p. 296–302, 2018.
- NATUMI, R.; JANSSEN, E. M.-L. Cyanopeptide co-production dynamics beyond microcystins and effects of growth stages and nutrient availability. *Environmental science & technology*, v. 54, n. 10, p. 6063–6072, 2020.
- NHMRC, N. Australian drinking water guidelines. *Commonwealth of Australia*, 2011.
- NIZAN, S.; DIMENTMAN, C.; SHILO, M. Acute toxic effects of the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* on *Daphnia magna* 1. *Limnology and oceanography*, v. 31, n. 3, p. 497–502, 1986.
- NOGUEIRA, R. F. P.; OLIVEIRA, M. C.; PATERLINI, W. C. Simple and fast spectrophotometric determination of H₂O₂ in photo-Fenton reactions using metavanadate. *Talanta*, v. 66, n. 1, p. 86–91, 2005.
- OREN, A. Cyanobacteria in hypersaline environments: biodiversity and physiological properties. *Biodiversity and Conservation*, v. 24, n. 4, p. 781–798, 2015.
- ORTIZ-REYES, E.; ANEX, R. P. A life cycle impact assessment method for freshwater eutrophication due to the transport of phosphorus from agricultural production. *Journal of cleaner production*, v. 177, p. 474–482, 2018.
- OU, H.; GAO, N.; DENG, Y.; QIAO, J.; WANG, H. Immediate and long-term impacts of UV-C irradiation on photosynthetic capacity, survival and microcystin-LR release risk of *Microcystis aeruginosa*. *Water research*, v. 46, n. 4, p. 1241–1250, 2012.
- PAERL, H. W. Marine plankton. *Ecology of cyanobacteria II*. [S.l.]: Springer, 2012. p. 127–153.
- PHUKAN, T.; RAI, A. N.; SYIEM, M. B. Unstandardized UV-C dose used for killing harmful cyanobacteria may instead initiate accelerated growth in the target organisms. *Ecotoxicology and environmental safety*, v. 181, p. 274–283, 2019.
- POLEZA, F.; SOUZA, R. C.; STRAMOSK, C. A.; RORIG, L. R.; RESGALLA JR, C. Avaliação da toxicidade aguda para o organismo-teste *Vibrio fischeri* dos principais

herbicidas e inseticidas aplicados na lavoura de arroz irrigado dos estados de Santa Catarina e Rio Grande do Sul. *Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente*, v. 18, , 2008.

PONGSRI, R.; AIAMLA-OR, S.; SRILAONG, V.; UTHAIRATANAKIJ, A.; JITAREERAT, P. Impact of electron-beam irradiation combined with shellac coating on the suppression of chlorophyll degradation and water loss of lime fruit during storage. *Postharvest Biology and Technology*, v. 172, p. 111364, 2021.

PRASATH, B. B.; SANTHANAM, P.; NANDAKUMAR, R.; JAYALAKSHMI, T. Detection of Cyanotoxins of Cyanobacterial (*Microcystis aeruginosa*) Strain Using Microtox® Bioluminescence Bioassay. In: *Basic and Applied Phytoplankton Biology*. Springer, Singapore, 2019. p. 211-219.

RAMANATHAN, G.; SUGUMAR, R.; JEEVERATHINAM, A.; RAJARATHINAM, K. Studies of Cyanobacterial distribution in estuary region of southeastern coast of Tamilnadu, India. *J Algal Biomass Utiln*, v. 4, n. 3, p. 26–34, 2013.

RAMOS, A. E. F.; EVANNO, L.; POUPON, E.; CHAMPY, P.; BENIDDIR, M. A. Natural products targeting strategies involving molecular networking: Different manners, one goal. *Natural product reports*, v. 36; n 7, p. 960-980, 2019.

RIZZO, L. Bioassays as a tool for evaluating advanced oxidation processes in water and wastewater treatment. *Water research*, v. 45, n. 15, p. 4311–4340, 2011.

RUPERT, E. E.; FOX, R. S.; BARNES, R. D. Invertebrate Zoology: A functional evolutionary approach. *Brooks/Cole, Belmont, CA*, 2004.

SAINI, D. K.; PABBI, S.; SHUKLA, P. Cyanobacterial pigments: Perspectives and biotechnological approaches. *Food and chemical toxicology*, v. 120, p. 616–624, 2018.

SAMPA, M. H. O.; BORRELY, S. I.; SILVA, B. L.; VIEIRA, J. M.; RELA, P. R.; CALVO, W. A. P.; NIETO, R. C.; DUARTE, C. L.; PEREZ, H. E. B.; SOMESSARI, E. S. The use of electron beam accelerator for the treatment of drinking water and wastewater in Brazil. *Radiation Physics and Chemistry*, v. 46, n. 4–6, p. 1143–1146, 1995.

SANSEVERINO, I.; ANTÓNIO, D. C.; LOOS, R.; LETTIERI, T. Cyanotoxins: methods and approaches for their analysis and detection. *Centre, JR, Ed*, 2017.

SANT'ANNA, C. L.; AZEVEDO, M. T. de P.; WERNER, V. R.; DOGO, C. R.; RIOS, F. R.; CARVALHO, L. R. De. Review of toxic species of Cyanobacteria in Brazil. *Algological studies*, v. 126, n. 1, p. 251–265, 2008.

SANT'ANNA, C. L.; MELCHER, S. S.; CARVALHO, M. D. C.; GELMEGO, M. P.; AZEVEDO, M. T. D. P. (2007). Planktic Cyanobacteria from upper Tietê basin reservoirs,

SP, Brazil. *Brazilian Journal of Botany*, 30, 1-17.

SCARLETT, K. R.; KIM, S.; LOVIN, L. M.; CHATTERJEE, S.; SCOTT, J. T.; BROOKS, B. W. Global scanning of cylindrospermopsin: Critical review and analysis of aquatic occurrence, bioaccumulation, toxicity and health hazards. *Science of The Total Environment*, v. 738, p. 139807, 2020.

SCHIRRMEISTER, B. E.; ANTONELLI, A.; BAGHERI, H. C. The origin of multicellularity in cyanobacteria. *BMC evolutionary biology*, v. 11, n. 1, p. 1–21, 2011.

SCHOPF, J. W. The fossil record: tracing the roots of the cyanobacterial lineage. *The ecology of cyanobacteria*. [S.l.]: Springer, 2000. p. 13–35.

SCOTT, B. R. Radiation toxicology, ionizing and nonionizing. 2014.

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

SHESTAKOV, S. V; KARBYSHEVA, E. A. The origin and evolution of cyanobacteria. *Biology Bulletin Reviews*, v. 7, n. 4, p. 259–272, 2017.

SILVA, V. H. O.; DOS SANTOS BATISTA, A. P.; TEIXEIRA, A. C. S. C.; BORRELY, S. I. Degradation and acute toxicity removal of the antidepressant Fluoxetine (Prozac®) in aqueous systems by electron beam irradiation. *Environmental Science and Pollution Research*, v. 23, n. 12, p. 11927–11936, 2016.

SIVONEN, K. Cyanobacterial toxins. Encyclopedia of microbiology. *Elsevier*, p. 290–307, 2009.

SIVONEN, K.; JONES, G. Cyanobacterial toxins. in I. Chorus and J. Bartram (eds.), *Toxic Cyanobacteria in Water: a Guide to their Public Health Consequences, Monitoring and Management*, Spon, London, United Kingdom, p. 41-111, 1999.

SMIETANKO-CHMIELEWSKA, D. K.; CHMIELEWSKI, A. G. Application of ionizing radiation for metal nanoclusters synthesis. 2011.

SPOOF, L.; CATHERINE, A. Appendix 3: Tables of microcystins and nodularins. *Handbook of cyanobacterial monitoring and cyanotoxin analysis*, p. 526-537, 2016.

SUN, S.; ZHENG, C.; SHI, X. Effect of paternal exposure to microcystin-LR on testicular dysfunction, reproduction, and offspring immune response in the oriental river prawn (*Macrobrachium nipponense*). *Aquaculture*, v. 534, p. 736332, 2021.

SVIRČEV, Z.; DROBAC, D.; TOKODI, N.; MIJOVIĆ, B.; CODD, G. A.; MERILUOTO, J. Toxicology of microcystins with reference to cases of human intoxications and

epidemiological investigations of exposures to cyanobacteria and cyanotoxins. *Archives of toxicology*, v. 91, n. 2, p. 621–650, 2017.

SVRCEK, C.; SMITH, D. W. Cyanobacteria toxins and the current state of knowledge on water treatment options: a review. *Journal of Environmental Engineering and Science*, v. 3, n. 3, p. 155–185, 2004.

TOMINAGA, F. K.; DOS SANTOS BATISTA, A. P.; TEIXEIRA, A. C. S. C.; BORRELY, S. I. Degradation of diclofenac by electron beam irradiation: Toxicity removal, by-products identification and effect of another pharmaceutical compound. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, v. 6, n. 4, p. 4605–4611, 2018.

TRIPATHI, B. N.; KASANA, R.; SINGH, V.; BHATT, I.; SINGH, A.; SHARMA, V.; GAUR, J. P. Carotenoids and pH of the culture medium play an important role in displaying metal stress in batch and semi-continuous cultures of *Anabaena doliolum*. In: ANNALES DE LIMNOLOGIE-INTERNATIONAL JOURNAL OF LIMNOLOGY, 2009, v. 45, p. 119–125.

UDAYAN, A.; ARUMUGAM, M.; PANDEY, A. Nutraceuticals from algae and cyanobacteria. *Algal Green Chemistry*. [S.l.]: Elsevier, 2017. p. 65–89.

VAN DER MERWE, D. Freshwater cyanotoxins. *Biomarkers in Toxicology*. [S.l.]: Elsevier, 2014. p. 539–548.

VAN DONK, E.; IANORA, A.; VOS, M. Induced defences in marine and freshwater phytoplankton: a review. *Hydrobiologia*, v. 668, n. 1, p. 3–19, 2011.

WANG, M.; CARVER, J. J.; PHELAN, V. V.; SANCHEZ, L. M.; GARG, N.; PENG, Y.; [...]; BANDEIRA, N. Sharing and community curation of mass spectrometry data with Global Natural Products Social Molecular Networking. *Nature biotechnology*, v.34, n.8, p. 828-837, 2016.

WARD, B. Control of pH and inorganic carbon in batch cultures of cyanobacteria. *Biotechnology letters*, v. 7, n. 2, p. 87–92, 1985.

WARD, D. M.; CASTENHOLZ, R. W.; MILLER, S. R. Cyanobacteria in geothermal habitats. *Ecology of cyanobacteria II*. [S.l.]: Springer, 2012. p. 39–63.

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, n.5, p.1705-1714, 2010.

WOOD, R. Acute animal and human poisonings from cyanotoxin exposure—A review of the literature. *Environment international*, v. 91, p. 276–282, 2016.

WOODS, R. J. Radiation chemistry and its application to environmental pollution.

Environmental applications of ionizing radiation, p. 1, 1998.

ZAGATTO, P. A.; BERTOLETTI, E. *Ecotoxicologia aquática: princípios e aplicações*. [S.l.]: Rima São Carlos, 2008. v. 478.

ZAVŘEL, T.; SINETOVA, M. A.; ČERVENÝ, J. Measurement of chlorophyll a and carotenoids concentration in cyanobacteria. *Bio-protocol*, v. 5, n. 9, p. e1467–e1467, 2015.

ZHENG, B.; ZHENG, Z.; ZHANG, J.; LUO, X.; LIU, Q.; WANG, J.; ZHAO, Y. The removal of *Microcystis aeruginosa* in water by gamma-ray irradiation. *Separation and purification technology*, v. 85, p. 165–170, 2012.