

Universidade Federal de Minas Gerais  
Instituto de Ciências Biológicas  
Programa de Pós Graduação em Ecologia, Conservação e Manejo da Vida Silvestre

**TOXICIDADE E REMOÇÃO DE ARSÊNIO PELA  
CIANOBACTÉRIA *Microcystis novacekii***

**FERNANDA AIRES GUEDES FERREIRA**

Belo Horizonte  
2013



Universidade Federal de Minas Gerais  
Instituto de Ciências Biológicas  
Programa de Pós Graduação em Ecologia, Conservação e Manejo da Vida Silvestre

**TOXICIDADE E REMOÇÃO DE ARSÊNIO PELA CIANOBACTÉRIA**  
*Microcystis novacekii*

**FERNANDA AIRES GUEDES FERREIRA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia, Conservação e Manejo da Vida Silvestre do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ecologia, Conservação e Manejo da Vida Silvestre.

Orientador: Francisco Antônio Rodrigues Barbosa  
Co-orientadora: Sérgia Maria Starling Magalhães.

Belo Horizonte

2013

## AGRADECIMENTOS

À Deus que me deu saúde força, coragem e sabedoria para alcançar esta conquista.

Ao meu marido e amor Marquinho, pelo companheirismo, dedicação, paciência e carinho. Seu amor e seus conselhos me deram forças para que eu permanecesse nesta caminhada. Você fez por várias vezes, tudo ser mais feliz!

Aos meus pais, Deusa e Alcebíades, e as minhas irmãs, Camila e Patrícia, que sempre acreditaram e incentivaram a realização de todos os sonhos da minha vida.

Ao meu orientador Francisco Antônio Rodrigues Barbosa por ter me apoiado durante todo mestrado e contribuído com a formação do meu conhecimento científico.

A minha co-orientadora SÉrgia Maria Starling Magalhães pela grande paciência, companheirismo e dedicação. Aprendi muito com sua presença constante nesse trabalho, no desenvolvimento das ideias e inúmeras correções feitas. Foram dois anos de muito crescimento pra mim!

A companheira e amiga de pesquisa Maione Wittig Franco que me ajudou, ensinou e contribuiu imensuravelmente para que esta pesquisa fosse realizada. Muito obrigada por tudo!

A Professora Dr<sup>a</sup> Luzia Valentina Modolo pelo entusiasmo com o projeto, confiança e por ter sempre acreditado na realização desse estudo.

Ao laboratório Limnea (Limnologia, Ecotoxicologia e Ecologia Aquática – UFMG) pela infra-estrutura e acolhimento. Aos colegas do Limnea obrigada por tudo, afinal, foram os grandes momentos de confinamento no laboratório que fizeram amizades e aprendizados para serem lembrados pela vida toda.

A todos os meus alunos e colegas de trabalho da Escola Estadual Manoel Antônio de Sousa, vocês são os maiores incentivadores do meu título de mestre.

Ao Programa de Pós-graduação em Ecologia, Conservação e Manejo da Vida Silvestre (ECMVS) pela oportunidade única de aquisição de conhecimento com excelentes profissionais de Ecologia. Aos secretários Fred e Cristiane pela simpatia, atenção e pela disposição em me ajudarem sempre que precisei.

Ao laboratório de Águas da Farmácia Social (UFMG) e ao laboratório de Fisiologia e Bioquímica de plantas (UFMG) que forneceram estrutura para experimentos importantes desta pesquisa.

Ao Laboratório de Análises Químicas- LAQ do Departamento de Engenharia Metalúrgica e de Materiais (UFMG) e ao Laboratório de Geoquímica do Departamento de Solos da Universidade Federal de Viçosa, onde foram realizadas as análises cromatográficas deste trabalho. Em especial aos laboratoristas Mário e Júlia pela grande paciência em me acompanhar nas inúmeras horas de análises de amostras.

Aos amigos que participaram da minha formação profissional e pessoal. Fernando C. Silva; Raquel Cordeiro e Natália Murta. Em especial a Dirce de Oliveira pela amizade e por me escutar de forma compreensiva durante todas as longas idas e vindas deste mestrado.

Ao Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia (INCT- Aqua) e a CAPES pelo financiamento deste projeto.

“Daqui cem anos não importará:

o tipo de carro que dirigi,

o tipo de casa que morei,

o tipo de roupas que vesti e

nem quanto eu tinha depositado no banco.

Mas o mundo poderá estar um pouquinho melhor, isso porque:

fui importante na proteção da vida e na formação de pessoas:

fui bióloga, fui professora.”

Fernanda Aires Guedes Ferreira

## RESUMO

A elevada toxicidade e potencial de acumulação de arsênio em diversos ambientes têm incentivado pesquisas de métodos de remoção desse íon em águas contaminadas. Cianobactérias apresentam propriedades de interação com íons metálicos que podem ser exploradas visando à recuperação de áreas contaminadas. Para avaliar o potencial de remoção de arsênio destes organismos este estudo teve como objetivo principal, determinar a toxicidade e o potencial de remoção de arsenato (As V) e arsenito (As III) pela cianobactéria *Microcystis novacekii*. Em condições de cultivo em laboratório, culturas da cianobactéria, na fase de crescimento exponencial, foram expostas por 96 horas (teste de toxicidade) e 192 horas (teste de remoção/bioacumulação) à concentrações de As(V)(Na<sub>2</sub>HAsO<sub>4</sub>7H<sub>2</sub>O) em duas séries geométricas: 0,05; 0,5; 5 e 50,0 mg.L<sup>-1</sup> (baixas concentrações) e 500; 900; 1620; 2916 e 5250 mg.L<sup>-1</sup> (altas concentrações). Para As(III) (NaAsO<sub>2</sub>) foram avaliadas as concentrações de 14,7; 26,5; 47,6 e 85,7 mg.L<sup>-1</sup>. A inibição do crescimento foi monitorada diariamente através da avaliação da densidade óptica e pela contagem de células ao microscópio óptico. A quantificação de arsênio bioacumulado na célula, na bainha de mucilagem e removido do meio de cultivo foi determinada por espectrometria de emissão atômica com plasma acoplado indutivamente (EEA-PI) após 2, 96 e 192 horas de exposição. Os resultados de toxicidade mostraram que em baixas concentrações de As(V) não há inibição do crescimento da cianobactéria em relação ao controle (p>0,05). Em concentrações mais altas ocorreu inibição gradativa do crescimento. A forma trivalente mostrou toxicidade mais acentuada para *M. novacekii* do que a forma oxidada (As V) sendo determinados valores de EC<sub>50</sub> de 40,9 mg.L<sup>-1</sup> (As III) e 5164,8 mg.L<sup>-1</sup> (As V). A alta resistência às duas espécies químicas testadas indica a necessidade de estudos complementares visando elucidar os mecanismos de resistência da cianobactéria. Os testes de remoção de arsênio mostraram que *M. novacekii* têm capacidade de acumular arsênio na forma trivalente, independentemente da concentração do metaloide no meio aquoso, acumulando *c.* 3 mg.L<sup>-1</sup> de arsênio. Esta capacidade de bioacumulação não foi, contudo significativa para a forma oxidada. Além disto, a bainha de mucilagem não apresentou papel acumulador de arsênio. Considerando as características físico-químicas descritas para exopolissacarídeos, acredita-se que os grupamentos químicos ionizados existentes nesta camada, podem

dificultar a aproximação de ânions como o As(V), presente no meio aquoso e pH neutro na forma de  $H_2As^-$ , e permitir a penetração da forma molecular neutra de As(III), presente no meio aquoso como H. Os resultados aqui apresentados podem contribuir para o entendimento da dinâmica do arsênio no meio natural e seu impacto sobre o fitoplâncton.

**Palavras-chave:** cianobactérias; arsênio; remoção e toxicidade

## ABSTRACT

The elevated toxicity and potential accumulation of arsenic in different environments have encouraged research methods for removal of these ions from contaminated waters. Cyanobacteria have properties of interaction with metal ions that can be exploited to recover the contaminated areas. To evaluate the potential of these organisms in arsenic removal this study aimed to determine the toxicity and potential removal of arsenate (As V) and arsenite (As III) by the cyanobacterium *Microcystis novacekii*. Under culture conditions in laboratory cultures of cyanobacteria, exponential growth phase were exposed for 96 hours (toxicity test) and 192 hours (test/removal bioaccumulation) at concentrations of As(V)(Na<sub>2</sub>HAsO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O) in two concentrations series: 0.05, 0.5, 5 and 50.0 mg.L<sup>-1</sup> (low concentrations) and 500, 900; 1620; 2916 and 5250 mg.L<sup>-1</sup> (high concentrations). For As (III) (NaAsO<sub>2</sub>) were evaluated concentrations of 14.7, 26.5, 47.6 and 85.7 mg. L<sup>-1</sup>. The inhibition of growth was monitored daily by assessing the optical density and the cell count under optical microscope. Quantification of arsenic bio-accumulated in the cell, the mucilage sheath and removed from the aqueous medium was determined by inductively coupled plasma optical emission spectrometry (ICP-OES) after 2, 96 and 192 hours of exposure. The toxicity results show that low concentrations of As(V) no inhibition of the growth of cyanobacteria was recorded compared to control (p> 0.05), while in higher concentrations occurred progressive inhibition of growth. The trivalent form showed stronger toxicity to *M. novacekii* than the oxidized one. The EC50 values were 40.9 mg.L<sup>-1</sup> (As III) and 5,164.8 mg.L<sup>-1</sup> (As V). The high resistance to both chemical species tested indicate the need for complementary studies to elucidate the mechanisms of resistance of this cyanobacteria. The arsenic removal tests showed that *M. novacekii* showed capacity to accumulate arsenic in the trivalent form, regardless the concentration (p> 0.05) metalloid in the aqueous medium, accumulating *c.* 3 mg.L<sup>-1</sup> of arsenic. This bioaccumulation potential was however not significant to the oxidized form. Furthermore, the mucilage sheath showed no role in accumulating arsenic. Considering the chemical-physical characteristics described for exo-polysaccharides it is believed that ionized chemical groups exist in this layer which can hinder the approach of anions such as As (V) present in the aqueous medium at neutral pH and H<sub>2</sub>As and allow the penetration of neutral molecular form of As (III) present in the aqueous medium as H. These presented

results may contribute to the understanding of the dynamics of arsenic in the natural environment and its impact on phytoplankton cells, particularly cyanobacteria.

Keywords: cyanobacteria; arsenic; removal and toxicity

## SUMÁRIO

RESUMO .....	6
ABSTRACT .....	8
INTRODUÇÃO.....	15
1.1 Objetivos.....	18
REFERENCIAL TEÓRICO.....	19
2.1 Cianobactérias .....	19
2.2 Química e toxicidade do arsênio .....	20
2.3 Bioacumulação/biossorção de arsênio por cianobactérias e microalgas .....	25
2.5 A bainha de mucilagem (exo-polissacarídeos) de cianobactérias .....	28
MATERIAIS E MÉTODOS.....	31
3.1 Crescimento e características morfológicas de <i>M. novacekii</i> em condições normais de cultivo .....	31
3.1.1 <i>Microcystis novacekii</i> .....	31
3.1.2 Manutenção de <i>Microcystis novacekii</i> em condições de cultivo.....	31
3.1.3 Características gerais de <i>Microcystis novacekii</i> .....	32
3.1.4 Técnicas para o acompanhamento do crescimento de <i>Microcystis novacekii</i> .....	33
3.1.5 Curva de crescimento, tempo de geração e taxa de crescimento relativo de <i>M. novacekii</i> .....	33
3.2 Toxicidade do arsênio para cianobactéria <i>Microcystis novacekii</i> .....	34
3.2.1 Cálculo da inibição do crescimento (EC <sub>50</sub> ) .....	36
3.2.2 Avaliação quantitativa de clorofila a .....	37
3.2.3 Análise estatística .....	37
3.3 Bioacumulação de arsênio pela cianobactéria <i>Microcystis novacekii</i> .....	37
3.4 Papel da bainha de mucilagem de <i>Microcystis novacekii</i> na retenção de As(III) .....	40
3.5 Preparação das amostras para determinação do arsênio total.....	41
RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	42

4.1 Crescimento e características morfológicas de <i>M. novacekii</i> em condições normais de cultivo .....	42
4.1.1 Curva de crescimento, taxa de crescimento relativo e tempo de geração de <i>M. novacekii</i> .....	44
4.2 Toxicidade do arsênio para a cianobactéria <i>Microcystis novacekii</i> .....	45
4.3 Bioacumulação de arsênio pela cianobactéria <i>Microcystis novacekii</i> .....	53
CONCLUSões .....	61
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	63

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema das estruturas da parede celular de alga e bactérias. ....	29
Figura 2. Vista panorâmica do lago Dom Helvécio no Parque Estadual do Rio Doce, Minas Gerais, Brasil, local de coleta de <i>Microcystis novacekii</i> . ....	31
Figura 3. Esquema do ensaio de toxicidade.. ....	35
Figura 4. Apresentação final do experimento de remoção de As (V). ....	38
Figura 5. Apresentação final do experimento de remoção de As (III). ....	38
Figura 6: Esquema ilustrativo mostrando metodologia utilizada para separação da bainha de mucilagem de <i>Microcystis novacekii</i> . ....	41
Figura 7. Colônias de <i>Microcystis novacekii</i> . <i>a</i> colônias em processo de senescência, <i>b</i> colônias com células jovens .....	42
Figura 8: Células de <i>Microcystis novacekii</i> , em teste com nanquim, evidenciando a bainha. Aumento de 1000x em microscopia óptica.....	43
Figura 9. Regressão linear simples entre o crescimento monitorado por densidade óptica (680nm) e contagem celular ao microscópio para as culturas de <i>M. novacekii</i> na ausência de arsênio. ....	44
Figura 10. Curva de crescimento de <i>Microcystis novacekii</i> . Densidade média inicial da fase log igual a $7.9 \times 10^5$ e final de $5.7 \times 10^6$ . ....	45
Figura 11. Crescimento de <i>Microcystis novacekii</i> em baixas concentrações de arsênio (V), 0 a $50 \text{ mg.L}^{-1}$ , em 96 h. ....	46
Figura 12. Taxa de crescimento médio de <i>M. novacekii</i> referentes ao controle (n=4) e tratamentos (n=3), durante o teste de toxicidade (96 horas) .....	47
Figura 13. Crescimento de <i>M. novacekii</i> exposta à concentrações crescentes de arsênio. Em <i>a</i> As(III) e em <i>b</i> As(V). ....	48

Figura 14. Percentual de inibição do crescimento de culturas de <i>Microcystis novacekii</i> expostas a concentrações crescentes de arsênio. Em <i>a</i> As(III) e em <i>b</i> As(V). Ensaio de 96 horas. ....	49
Figura 15. Síntese de clorofila-a por <i>Microcystis novacekii</i> exposta a concentrações crescentes de arsênio (III) e (V). Em <i>a</i> As(III) e em <i>b</i> As(V) .....	52
Figura 16: Remoção e bioacumulação de arsênio em mg.L <sup>-1</sup> por <i>Microcystis novacekii</i> . Em <i>a</i> resultados As(III). Em <i>b</i> resultados As(V) na série de concentrações mais altas. ....	57
Figura 17. Avaliação da possível bioacumulação de As(III) e As(V) por <i>M. novacekii</i> . Percentual de bioacumulação de arsênio em relação à concentração inicial e final. Em <i>a</i> resultados As (III); em <i>b</i> resultados As (V).....	58

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Compostos de arsênio e suas características físico-químicas. ....	22
Tabela 2. Propriedades físico-químicas de alguns compostos de arsênio. ....	23
Tabela 3. Níveis de toxicidade de algumas espécies químicas do arsênio. ....	24
Tabela 4. Composição química do meio ASM-1. (GORHAM et al, 1964) ....	32
Tabela 5. Concentrações de Arsênio (III) e (V) para o teste de toxicidade. ....	35
Tabela 6. Concentrações de arsênio em ensaio de biorremocão. ....	39
Tabela 7. Inibição do crescimento da <i>Microcystis novacekii</i> por arsênio. ....	50
Tabela 8. Toxicidade de arsênio para cianobactérias e algas. ....	51
Tabela 9. Taxa de crescimento de <i>Microcystis novacekii</i> após 96 e 192 horas de exposição (final fase log).....	54
Tabela 10. <i>Microcystis novacekii</i> exposta à concentrações crescentes de arsênio (mg.L <sup>-1</sup> ) por 2, 96 e 192 horas. Os dados referem-se a remoção de arsênio observadas no sobrenadante. ....	55
Tabela 11. Distribuição final de arsênio após 192 horas de experimento. ....	56

## INTRODUÇÃO

Os resíduos químicos e biológicos têm afetado diretamente os ecossistemas aquáticos particularmente através da formação de aglomerações populacionais e industriais nas imediações dos rios. O impacto desses resíduos tem se agravado nas últimas décadas em todo o mundo e mesmo sendo aplicadas técnicas para diminuir sua geração os resultados são incipientes (AFONSO, 2003). No Brasil, a maioria dos ecossistemas aquáticos recebe algum tipo de resíduo, sendo que menos de 30% destes recebem tratamento adequado, sendo o restante armazenado em lixões ou lançado nos corpos d'água (TAVARES & BENDASSOLI, 2005).

Apesar da ampla distribuição e disponibilidade de água no território brasileiro, tem sido registradas limitações para sua utilização impostas principalmente por alterações físicas, químicas e microbiológicas. Dentre os vários tipos de resíduos químicos aqueles contendo metais pesados são particularmente preocupantes por não serem biodegradáveis. Uma vez liberados no sistema aquático, seus efeitos podem perpetuar-se por vários ciclos antes de se tornarem biologicamente indisponíveis, o que normalmente ocorre por incorporação em sedimentos orgânicos e inorgânicos (MATSHULLAT, 2000).

O arsênio, desde 1997, vem sendo considerado o elemento mais tóxico à saúde humana segundo a Lista de Prioridade de Substâncias Perigosas da ATSDR (AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCES & DISEASE REGISTRY, 2006). A contaminação do ambiente por arsênio tem despertado a atenção de pesquisadores e órgãos governamentais em muitos países. No ambiente aquático a elevação na concentração de arsênio é resultado do despejo direto de resíduos nos cursos d'água como também por ações antrópicas que liberam o arsênio presente no solo, possibilitando, assim, que esse elemento seja drenado e atinja os rios, lagos e as águas subterrâneas (MANDAI e SUSUKI, 2002).

A poluição por arsênio se tornou um problema grave em todo o mundo nos últimos anos, especialmente em países como Bangladesh, Índia e China (CHOWDHURY *et al.*, 2000; SUN, 2004). No Brasil uma das áreas mais problemáticas quanto à presença de As em águas de consumo humano é a região do Quadrilátero Ferrífero no Estado de Minas Gerais. Os locais de maior impacto são áreas próximas a

minas de ouro, como nos municípios de Nova Lima, Raposos, Mariana e Santa Bárbara (BORBA *et al.*, 2003, 2004a; DESCHAMPS *et al.*, 2003).

A Resolução 357, de 17 de março de 2005 (CONAMA, 2005), estabelece limites entre 0,01 mg. L<sup>-1</sup> a 0,14 mg. L<sup>-1</sup> de As em água, dependendo do tipo de uso. Essa resolução também estabelece o limite máximo de 0,5 mg.L<sup>-1</sup> de As em efluentes. Apesar disso, existem muitas áreas contaminadas, especialmente pelos rejeitos de mineração, que extrapolam estes limites e causam sérios prejuízos ambientais (GRIMALT *et al.*, 1999; DESCHAMPS *et al.*, 2002).

Em águas naturais, o arsênio está presente principalmente na forma de compostos inorgânicos, onde possui as valências III e V (THORNTON e FARAGO, 1997). O resultado disto é sua participação em complexos biológicos, processos químicos e algumas aplicações industriais, como por exemplo, na manufatura de vidros, materiais semicondutores e fotocondutores. (HOWARD, 1993; STUMMEYER, 1996). Compostos contendo arsênio são utilizados, também, no tratamento de algumas doenças e, na agricultura, o arsênio encontra-se nos herbicidas, inseticidas e desfolhantes (BURGUERA, 1993).

De acordo com United States Environmental Protection Agency - USEPA (2000) o consumo de águas poluídas e a ingestão de solos contaminados são os principais modos de intoxicação humana por arsênio, o que resulta em efeitos tóxicos. Esses efeitos são dependentes também do tempo de exposição, o que poderá ocasionar diferentes patologias. Os efeitos podem ser carcinogênicos (ex. câncer de pele, pulmão, próstata, bexiga, rim e fígado) que estão associados à exposição crônica ou não carcinogênicos (ex. patologias cutâneas, gastrintestinais, cardiovasculares, hematológicos, pulmonares, neurológicos, endocrinológicos, reprodutivos e de desenvolvimento como abortos espontâneos e fetos com baixo peso) que podem ser associados à exposições crônicas ou agudas (NRC, 1999; USEPA, 2000; WHO, 2001).

O aumento das concentrações de arsênio nos diversos cursos d'água, associado ao efeito tóxico que depende principalmente de sua forma química, torna evidente a necessidade do desenvolvimento de métodos ou tecnologias capazes de remover o arsênio do meio aquático. Entre os processos de descontaminação ambiental a biossorção por meio de micro-organismos, cianobactérias e algas apresenta algumas vantagens como custo de operação associado relativamente baixo e elevada eficiência na remoção dos contaminantes de efluentes muito diluídos (ARRIBAS, 2009). Assim, Petropulu *et al.*, (1997) demonstraram que organismos marinhos acumulam quantidades

substanciais de arsênio de modo mais eficiente que organismos terrestres, pois em suas vias metabólicas o nitrogênio e o fósforo podem ser facilmente trocados por ele (HOWARD, 1993). Gomes *et al.*, (2007) evidenciaram que cianobactérias e algas podem acumular arsênio intracelularmente.

As cianobactérias apresentam uma ampla tolerância ecológica que contribui para o seu sucesso competitivo, tendo como uma das características marcantes a capacidade de crescimento nos mais variados ambientes, desde fontes termais a oceanos gelados, podendo algumas serem encontradas em ambientes terrestres (DOMITROVIC & FORASTIER, 2005). No entanto, os ambientes mais apropriados para o seu desenvolvimento são os ecossistemas de água doce, particularmente os tropicais, pois estes apresentam condições adequadas às florações destes organismos (CHORUS & BARTRAM, 1999). Estes organismos constituem um dos grupos mais amplamente estudados por ficólogos, limnólogos, bioquímicos, microbiologistas e farmacêuticos do mundo inteiro, por apresentarem importância econômica e para a saúde pública (ARAGÃO, 2011).

Cianobactérias já foram constatadas como biossorventes promissores na remoção de arsênio em ambientes aquáticos (YAMAOKA *et al.*, 1996). Esses organismos apresentam alta taxa de crescimento sendo, portanto, uma fonte renovável e de baixo custo de material adsorvente. Diversos estudos comprovam essa hipótese para diferentes espécies de cianobactérias (HANSEN *et al.*, 2005; SUHENDRAYATNA *et al.*, 1998; ARRIBAS, 2009).

Diante dos problemas ambientais decorrentes da contaminação por metais pesados, especialmente o arsênio, estudos de toxicidade e remoção deste metaloide visam contribuir para o entendimento da dinâmica do arsênio no meio natural e seu impacto sobre o fitoplâncton.

## 1.1 Objetivos

O presente estudo teve por objetivo avaliar a toxicidade e o potencial de interação do arsênio com a cianobactéria *Microcystis novacekii*, em condições de cultivo, em laboratório.

São objetivos específicos:

- Caracterizar o crescimento de *Microcystis novacekii* em condições normais de cultivo, determinando sua curva de crescimento, taxa de crescimento relativo, tempo de geração e características morfológicas.
- Determinar a correlação existente entre duas técnicas de acompanhamento do crescimento de *Microcystis novacekii* (Contagem de células em microscópio óptico e medida da densidade óptica).
- Determinar a toxicidade do arsênio (III) e (V) para *Microcystis novacekii*, estabelecendo a dose que causa 50% de inibição do crescimento ( $EC_{50}$ ).
- Determinar o potencial de remoção de arsênio (III) e (V) pela cianobactéria *Microcystis novacekii*.
- Avaliar o papel da bainha de mucilagem de *Microcystis novacekii* na retenção de arsênio.

## REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Cianobactérias

No Brasil, as primeiras referências sobre a ocorrência de cianobactérias foram relatadas por DROUET (1937, 1938) e KRASSKE (1939, 1951) no século passado. Já nas décadas de 1960 e 1980 poucos trabalhos focalizaram as cianobactérias em ambientes aquáticos continentais no Brasil (ARAGÃO, 2011). A partir de 1990, inúmeros estudos foram desenvolvidos no país, abordando diferentes aspectos, tais como taxonomia morfológica, ecologia, ultraestrutura, análises de toxinas e taxonomia molecular (BITTENCOURT-OLIVEIRA *et al.*, 2007; YUAN *et al.*, 2006; BITTENCOURT-OLIVEIRA & MOLICA, 2003; ARAGÃO, 2011).

As cianobactérias ocupam uma posição taxonômica única, uma vez que combinam um modo autotrófico de crescimento, comum para as células vegetais eucariotas, com um sistema metabólico geralmente considerado bacteriano (SHAHEEN *et al.*, 2007) essa característica, denominada mixotrofia, possibilita às cianobactérias um crescimento não estritamente dependente da intensidade de luz nos cultivos (CHOJNACKA & NOWORYTA, 2004), bem como o uso de variadas fontes de carbono dependendo da aplicação da biomassa produzida e dos recursos disponíveis. Em águas contaminadas com arsênio as cianobactérias geralmente são persistentes na comunidade microbiana (BHATTACHARYA, *et al.*, 2011), suportando crescer sob níveis de arsênio elevados.

*Microcystis* é um gênero colonial, tipicamente planctônico capaz de formar florações em corpos d'água eutrofizados. As colônias podem ser microscópicas ou macroscópicas, esféricas, irregulares ou alongadas e às vezes formadas por sub-colônias. O envelope mucilaginoso é incolor e pode ser amplo ou estreito, difluente ou firme, homogêneo ou com protuberâncias. As células são esféricas com aerótopos e estão arranjadas irregularmente no interior da colônia ou sub-colônia. A divisão celular ocorre por fissão binária em três planos. São conhecidas mundialmente *c.* 25 espécies de *Microcystis*, todas de ambientes aquáticos (Bicudo & Menezes, 2006), sendo que várias delas são produtoras da hepatotoxina microcistina. De acordo com SANT'ANNA & AZEVEDO (2000) e BICUDO & MENEZES (2006) *Microcystis* é o gênero com mais ampla distribuição em território brasileiro e que apresenta a maior incidência de florações em reservatórios de abastecimento público.

### 2.1.1 *Microcystis novacekii*

*Microcystis novacekii* pertence à classe Cyanophyceae, ordem Chroococcales e à família *Microcystaceae*. Esta espécie de cianobactéria foi descrita por (KOMÁREK) Còmper em 1979, sendo distinguida das demais espécies do gênero por possuir colônias pequenas, firmes, não lobadas e compostas por células firmemente agregadas e com uma substância gelatinosa espessa (OTSUKA *et al.*, 2000). *Microcystis novacekii* não faz parte do grupo de cianobactérias bem conhecidas e raramente é citada na literatura em trabalhos de ficologia (HINDÁK, 2006) o que torna de suma importância conhecer as características do ciclo de vida desta espécie.

## 2.2 Química e toxicidade do arsênio

O arsênio elementar foi descrito pela primeira vez por Paracelso por volta de 1520 d.C., tendo sido obtido pela redução de compostos de arsênio (PRADO, 2008). Já o seu isolamento foi descrito em 1250 por Albertus Magnus (SILVA, 2005). A palavra arsênio ao longo da história sempre esteve associada as suas propriedades mortais, sendo considerado um veneno em potencial (WINDHOLZ, 1976). Seu forte potencial de toxicidade está sintetizado inclusive no nome do elemento, derivado provavelmente da palavra grega arsenikós, que significa “forte, viril” ou alternativamente do persa *sar* (ouro), devido à cor dourada de muitos compostos minerais de arsênio (GORBY, 1994 *apud* PRADO *et al.*, 2008).

O arsênio é o 20º elemento mais abundante na crosta terrestre, o 14º na água do mar e o 12º no corpo humano (SILVA, 2005). Classificado como um elemento semi-metálico do grupo V da Tabela periódica, possui número atômico 33, configuração eletrônica [Ar]4s23d104p3, massa atômica 74,92, densidade 5,7 g.cm<sup>3</sup> e sublima a 613°C. Possui três formas alotrópicas: amarela, preta e cinza. (SILVA, 2005).

É importante salientar que *c.* 60% do arsênio liberado no meio é de origem natural, destacando-se as erupções vulcânicas e a lixiviação de rochas ricas em arsênio (BARRA *et al.*, 2000; JAIN & ALI, 2000; MATSCHULLAT *et al.*, 2000; SAKUMA *et al.*, 2003), além dos rejeitos de mineração, visto que esse metaloide é encontrado associado a minérios de ouro, prata, cobalto, níquel, chumbo, cobre e antimônio (JAIN & ALI, 2000; MATSCHULLAT *et al.*, 2000). O arsênio é utilizado na produção de vidros, ligas não ferrosas, produtos eletrônicos, conservação de madeiras e pesticidas (BARRA *et al.*, 2000; JAIN & ALI, 2000; SAKUMA *et al.*, 2003). Compostos contendo arsênio já foram utilizados no tratamento de doenças como anemias (Gontigo,

& Bittencourt, 2005), e atualmente, em pleno século XXI, ressurgiu como uma das drogas empregadas no tratamento da leucemia promielocítica aguda (CASTRO JR *et al.*, 2002; DEGOS, 2003). Na agricultura, o arsênio encontra-se nos herbicidas, inseticidas e desfolhantes.

A presença de arsênio em água faz com que a flora e a fauna marinha contenham resíduos deste metaloide bioacumulado, devido à função de nas vias metabólicas o nitrogênio e o fósforo poderem ser facilmente trocados por ele (STUMMEYER *et al.*, 1996).

O arsênio metálico não ocorre naturalmente no meio. Na crosta terrestre, o arsênio na forma elementar, é pouco abundante. Muito antes que as atividades humanas tivessem algum efeito no balanço natural, o arsênio na forma molecular era distribuído uniformemente através da crosta terrestre nos compartimentos: solo, sedimento, água, ar, e organismos vivos (MANDAL & SUZUKI, 2002). Contudo, raros minerais deste elemento são encontrados, geralmente estão sob a forma de arsenitos, arsenatos e alguns óxidos que podem estar associados a outros metais e a sulfetos como, por exemplo, na arsenopirita que é o mineral de arsênio mais comumente encontrado em áreas de mineração (SMEDLEY & KINNIBURGH, 2002).

Naturalmente, o arsênio ocorre em aproximadamente 200 diferentes formas minerais das quais 60% são arsenatos, 20% sulfetos e sulfossais e os 20% restantes incluem arsenitos, óxidos, silicatos e arsênio elementar (As) (SILVA, 2005). Em meio aquoso o As ocorre principalmente na forma de arsenato e arsenito sendo o pH determinante de suas propriedades (Tabela 1).



2000). Como a biodisponibilidade e os efeitos fisiológicos/ toxicológicos do arsênio dependem de sua forma química, o conhecimento da especiação e transformação no meio ambiente é fundamental, necessitando de métodos adequados para a separação e determinação das espécies de arsênio (QUINÁSIA *et al.*, 1997).

De acordo com Silva (1997), o arsênio sofre vários tipos de reações, tais como: oxi-redução, precipitação-dissolução, adsorção-dessorção e metilação, que controlam a sua mobilização e bioacumulação no ambiente. Teores de arsênio na água ou a sua disponibilidade nos seres vivos é influenciada mais pela sua especiação do que pela quantidade total presente. Na Tabela 2 são apresentadas as propriedades físico-químicas de alguns compostos de arsênio.

**Tabela 2. Propriedades físico-químicas de alguns compostos de arsênio.**

<b>Composto</b>	<b>Fórmula</b>	<b>Peso mol. (g)</b>	<b>cor</b>	<b>Estado físico</b>	<b>Solubilidade em água</b>
<b>Arsênio molecular</b>	As	74,92	cinza	sólido	Insolúvel
<b>Trióxido de As</b>	As <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	197,84	branco	sólido	37g/L (20°C)
<b>Pentóxido de As</b>	As <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	229,84	cinza	sólido	1,5g/L (16°C)
<b>Arsenobetaina</b>	(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> As <sup>+</sup> CH <sub>2</sub> COO <sup>-</sup>	178,06	----	sólido	----
<b>Ácido dimetilarsínico</b>	(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> AsH	138,00	incolor	sólido	660g/L (25°C)
<b>Ácido monometilarsônico</b>	CH <sub>3</sub> AsH <sub>2</sub>	139,97	branco	sólido	solúvel

Fonte: ATSDR, 2000 *apud* Prado (2008).

O arsênio pode ser convertido em diferentes formas ou transformado em compostos insolúveis quando combinado com outros elementos, como por exemplo, o ferro (LEIST *et al.*, 2000).

Em meio biótico o arsênio inorgânico pode ser incorporado ou biotransformado em suas formas orgânicas. As formas orgânicas são, em geral, espécies organometálicas  $\alpha$ -ligadas. Ribofuranosídeos contendo arsênio são predominantes em algas, enquanto que a arsenobetaina é encontrada em outros organismos marinhos. Entretanto, os ribofuranosídeos contendo arsênio e a arsenobetaina não fazem parte do

estoque de arsênio em águas naturais já que o produto excretado por algas e culturas de animais aquáticos parece estar limitado às espécies inorgânicas e metiladas. Por outro lado os ácidos MMA(V) e DMA(V) podem ser detectados em águas naturais. O arsênio inorgânico trivalente [As(OH)3] também está distribuído na hidrosfera, embora seja termodinamicamente muito mais instável que o ácido arsênico [AsO(OH)3] sob condições aeróbicas (Barra *et al.*, 2000).

A toxicidade do arsênio é amplamente relacionada com a sua especiação. É um consenso de que As(III) é mais tóxico do que As(V) para os animais (BYRON, 1967; PETRICK, *et al.*, 2000). No entanto, para micro-algas, sua toxicidade varia muito com as espécies químicas e táxons de algas (KNAUER, 1999; LEVI, 2005).

A toxicidade aguda do arsênio inorgânico ingerido pelo homem aumenta com a solubilidade do composto e com a ingestão crônica. (SAKUMA, 2004). A ordem decrescente de toxicidade dos compostos de arsênio, segundo ANDERSON *et al.*, (1986) e BURGUERA *et al.*, (1991) é a seguinte: arsina (AsH<sub>3</sub>) > arsenito (AsHO<sub>2</sub>) > arseniato ( ) > ácidos alquil-arsênicos (H<sub>2</sub>RAsO<sub>4</sub>) > compostos de arsônio(AsH<sub>4</sub>) > arsênio elementar (As). O arsênio trivalente (arsenito) é 60 vezes mais tóxico do que a forma oxidada pentavalente (arseniato). Os compostos inorgânicos são 100 vezes mais tóxicos do que as formas parcialmente metiladas (MMA e DMA). Arsenobetaína e arsenocolina são de baixa toxicidade (LE *et al.*, 1997).

Na Tabela 3 são apresentados os dados de toxicidade de algumas espécies químicas do arsênio, sendo estes testes realizados com animais.

**Tabela 3. Níveis de toxicidade de algumas espécies químicas do arsênio.**

Espécie química	LD50 (g Kg-1)*
AsH <sub>3</sub>	0,003
As (III)	0,014 (como KAsO <sub>2</sub> ) 0,020 (como As <sub>2</sub> O <sub>3</sub> )
As (V)	0,020
Ácido monometilarsênico	0,7 - 0,8
Ácido dimetilarsínico	0,7 - 2,6
Cátion tetraarsônio	0,89
Óxido trimetilarsínico	10,6
Arsenocolina	>6,5
Arsenobetaína	>10,0

\*LD50 = dose letal para matar 50% de uma população  
Fonte: Barra *et al.*, (1999) apud Silva, (2005).

O consumo de água contaminada por arsênio tem sido apontado como o de maior contribuição à contaminação do ser humano e por esta razão a qualidade de águas superficiais e subterrâneas merece atenção especial em áreas propensas à contaminação (DESCHAMPS, 2003; DUKER *et al.*, 2005). Muitos trabalhos relatam problemas de intoxicação humana causada por contaminação com arsênio. Os casos mais notáveis foram as contaminações ocorridas em Bangladesh (NICKSON *et al.*, 1998), Taiwan (CHEN *et al.*, 1994; SMITH *et al.*, 1995) e no Chile (HOPENHAYN-RICH *et al.*, 1996).

Diante dos riscos decorrentes de acumulação e os efeitos toxicológicos crônicos do arsênio em água potável, os limites recomendados vem sendo revistos. A OMS (Organização Mundial de Saúde) e CNSPM (Comitê Nacional de Saúde e Pesquisa Médica) da Austrália têm recomendado que a Concentração Máxima Permitida (CMP) de arsênio em águas de beber seja de 10 e 7  $\mu\text{g.L}^{-1}$ , respectivamente (NHMCR, 1996). A CMP de arsênio em água de beber também foi reduzida de 50 para 10  $\mu\text{g.L}^{-1}$  pela Comissão Europeia (EUROPEAN COMMISSION DIRECTIVE, 1998). Os Estados Unidos implementaram a CMP recomendada pela OMS para água de beber (EPA, 2000). No Brasil, a concentração máxima permitida é de 10  $\mu\text{g.L}^{-1}$  (BRASIL - Portaria 2914/2011 Ministério da Saúde).

### **2.3 Bioacumulação/biossorção de arsênio por cianobactérias e microalgas**

O desenvolvimento de estratégias tecnológicas para monitoramento e restauração dos ecossistemas contaminados por arsênio tornou-se um desafio para os cientistas ambientais. Dentre as tecnologias empregadas para contornar os problemas gerados em áreas impactadas por arsênio podem ser citadas algumas tecnologias como a troca iônica, osmose reversa, coagulação/filtração, eletrólise reversa e oxidação/filtração (MENDES *et al.*, 2009). Estes processos de remoção de arsênio geralmente envolvem um pré-tratamento de oxidação do As (III), seguido pela adsorção ou co-precipitação do As (V) formado, usando adsorventes ou coagulantes (EPA, 2000). A remoção de elevadas quantidades de arsênio é normalmente conseguida por meio das técnicas de precipitação, retenção membrana e permuta iônica. No entanto, estas técnicas são muitas vezes incompletas, dispendiosas, operacionalmente complexas e geram produtos residuais que podem ser tóxicos em concentrações elevadas (SHARMA *et al.*, 2011). Em vista de tais limitações, o uso de microalgas e cianobactérias como bioacumuladoras

de metais pesados fornece uma alternativa interessante para tratamento de águas residuais (GARBISU & HALL, 1993; MEHTA & GAUR, 2005).

Segundo Vidotti *et al.*, (2004) bioacumulação é o nome genérico do processo de captação e retenção de uma substância (contaminante) por um organismo a partir de qualquer fonte (água, sedimento, outro organismo), via qualquer rota (dieta, pele) e se constitui em efeito nocivo quando induz resposta biológica adversa. O termo bioacumulação tem sido aplicado quando organismos vivos estão envolvidos e bioabsorção é o termo mais adotado para o uso de organismos inativos (AKSU *et al.*, 1999).

O processo de bioabsorção/bioacumulação por células vivas parece ocorrer em duas fases. A primeira fase ocorre de forma independente de energia, aparentemente por atração eletrostática entre os cátions metálicos e os ânions da parede celular. Essa etapa é chamada de bioabsorção ou etapa rápida. A segunda fase é dependente de energia e ocorre por captação ativa promovendo a internalização do metal ou bioacumulação e é denominada etapa lenta (VEGLIO e BEOLCHINI, 1997; DAVIS *et al.*, 2003; CHEN e PAN, 2005).

De acordo com Vidotti e colaboradores (2004), a bioacumulação por algas desempenha três funções de importância ecológica significativa:

i) nos organismos, a bioacumulação reflete-se na alteração da concentração do contaminante no seu sítio de ação. Assim, a extensão com que ocorre a bioacumulação em um organismo pode ser utilizada como um parâmetro útil em uma avaliação ecotoxicológica dos sistemas naturais.

ii) a bioacumulação de uma substância potencialmente tóxica pode torná-la, ao menos temporariamente, indisponível para outros organismos; ao ocorrer a acumulação de uma espécie contaminante por um determinado organismo, este contaminante torna-se presente no sistema aquático em menor concentração e portanto, para os demais organismos a ocorrência da bioacumulação pelas algas implica em maior resistência ao efeito tóxico.

iii) A bioacumulação de compostos orgânicos persistentes ou de metais pode ser um fator importante no transporte físico da substância potencialmente tóxica e na acumulação na cadeia alimentar pelos organismos consumidores superiores, onde inclui-se o homem.

A capacidade demonstrada pelas algas e cianobactérias de diferentes espécies para captar e acumular íons metálicos depende do organismo propriamente dito e das

espécies consideradas. No caso da biossorção de arsênio, algumas algas reduzem o As(V) e o transformam em diferentes ribosídeos arsênicos.

Admite-se que o As(V) seja absorvido devido a sua similaridade com o fosfato que é essencial para as algas (WOLFE-SIMON *et al.*, 2010). O arsenato é um análogo do fosfato e se encontra em muitos habitats aquáticos em concentrações semelhantes às de fosfato (ANDREAE, 1978; SEYDEL, 1972). Alguns autores acreditam que o arsênio é capturado do meio, pelas algas por meio da cadeia alimentar, sendo transformado a arsenobetaína via MMA e DMA através da biometilação (KNAUER *et al.*, 2011). A arsenobetaína é um composto orgânico formado pela desintoxicação do arseniato fitotóxico através de biometilação (BARRA *et al.*, 2000).

Em alguns estudos com algas e cianobactérias verifica-se que estas são capazes de acumular arsênio, além de apresentar resistência ao metalóide. A alga verde, *Chlorella vulgaris*, cultivada em meio aquoso, apresentou após 24 horas de incubação  $0.610 \text{ mg.g}^{-1}$  de As(III) (SUHENDRAYATNA *et al.* 1999). Hansen *et al.* (2005) avaliaram a capacidade da alga *Lessonia nigrescens* em remover o As(V) de soluções aquosas em diferentes pHs, sendo suas capacidades máximas de biossorção de  $45,2 \text{ mg.g}^{-1}$  (pH 2,5);  $33,3 \text{ mg.g}^{-1}$  (pH 4,5) e  $28,2 \text{ mg.g}^{-1}$  (pH 6,5). Arribas (2009) averiguou o potencial de *Pelvetia canaliculata* para remoção de arsênio(V) e encontrou capacidade de biossorção de 8,55 mg de arsênio por grama de biossorvente.

Além da espécie estudada, o desempenho das algas e cianobactérias como sorventes biológicos de arsênio depende também da quantidade de biomassa, do pH da solução e da cinética da reação, além de outros fatores, como a competição pelos sítios de ligação. A adsorção ocorre tanto na parede celular, principalmente exopolissacarídeos, ou pela ligação citoplasmática por fitoquelatinas e metalotioneínas (YEE *et al.* 2004; GONG *et al.* 2005; EL-SHEEKH *et al.* 2005)

Estudos recentes demonstram que o arsênio na forma química de arsenito penetra nas células, em pH do meio neutro, através de aquagliceroporinas (proteínas de transporte de glicerol) existentes em cianobactérias, bactérias, leveduras e mamíferos e que a sua toxicidade é dependente da capacidade que o metaloide apresenta em se ligar a grupos sulfidrilas existentes nos resíduos de cisteína das proteínas, inativando-as.

Devido à interferência do arsênio nos processos biológicos, diferentes organismos desenvolveram sistemas de detoxificação para este semimetal. Dois sistemas são descritos na literatura, o primeiro, que é o principal meio de detoxificação em mamíferos, é através da metilação tanto do arsenato quanto do arsenito. Neste

processo de detoxificação, a glutatona reduz o arsenato à arsenito que pode então, através de uma metiltransferase, receber um grupo metil da S-adenosilmetionina (STOLZ; BASU; OREMLAND, 2002).

O segundo sistema é encontrado tanto em procariotos (JI *et al.*, 1994) quanto em eucariotos (MUKHOPADHYAY; SHI; ROSEN, 2000; ZHOU *et al.*, 2004). Neste sistema ocorre a conversão do As (V) a As (III) por meio de enzimas conhecidas como arsenato redutases (ArsC). Em ensaios *in vitro* esta conversão é feita em um sistema de oxi-redução no qual o Fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina (NADPH) é oxidado a NADP. [sugiro citar abreviado e incluir em siglas e abreviaturas ou então colocar por extenso o que é NADP. Outra possibilidade é mudar a redação “Em ensaios *in vitro* esta conversão é feita em um sistema de oxi-redução via Fosfato do dinucleótido de nicotinamida e adenina (NADPH)].

## **2.5 A bainha de mucilagem (exo-polissacarídeos) de cianobactérias**

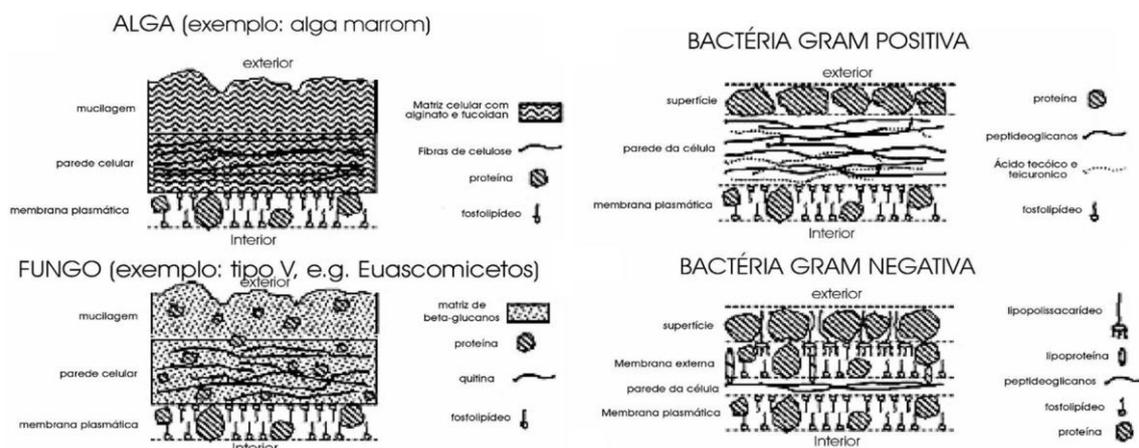
Muitas cianobactérias produzem exopolímeros que são de natureza polissacarídica, conhecidos como exopolissacarídeos ou bainha de mucilagem (DE PHILIPPIS & VINCENZINI, 1998). O papel ecológico desta bainha inclui proteção contra dessecação, salinidade, radiação ultravioleta e predação, além de aumentar a disponibilidade de captação de luz e nutrientes, permitir fixação biológica de nitrogênio (impedindo a entrada de oxigênio no heterocito) e movimento (delta) e no estabelecimento de associação simbiótica com outros organismos (DE PHILIPPIS E VINCENZINI, 1998; DE PHILIPPIS *et al.*, 2003; PEREIRA *et al.*, 2009). Mais de uma centena de linhagens de cianobactérias, pertencentes a 22 gêneros são conhecidos por produzir bainhas de mucilagem (DE PHILIPPIS *et al.*, 2001), sendo a cianobactéria *Microcystis novacekii* um exemplo de espécie que apresenta produção dessa bainha mucilagínosa (KOMÁREK *et al.*, 2002).

Os exopolissacarídeos de cianobactérias são caracterizados por uma grande variedade tanto em número (2 a 10) como em tipo de monossacarídeos constitutivos (várias combinações de açúcares neutros ou ácidos). A maioria dos polímeros apresenta natureza aniônica, devido à presença de ácidos urônicos e/ou grupos carregados tais como piruvil ou sulfato. Adicionalmente, alguns podem também apresentar moléculas polipeptídicas e substituintes acetil, causando complexidade estrutural maior (DE PHILIPPIS & VINCENZINI, 1998).

Além de apresentarem propriedades físico-químicas que trazem vantagens para sua utilização industrial na forma convencional, a natureza aniônica dos EPS de cianobactérias os tornam interessantes para aplicações no campo da biorremediação para a remoção de metais tóxicos de águas poluídas (SINGH *et al.*, 1999). No entanto, existe uma grande falta de conhecimento sobre a função e relacionamento estrutura-função desses polímeros em cianobactérias (OTERO & VINCENZINI, 2003).

A parede celular das cianobactérias apresenta muitos grupos funcionais que proporcionam uma carga negativa na superfície da célula, tais como hidroxilas (-OH), fosfatos ( $\text{PO}_3\text{O}^{2-}$ ), aminas (- $\text{NH}_2$ ), carboxilas (-COOH), sulfidrilas (-SH), (YEE *et al.*, 2004; GONG *et al.*, 2005; EL-SHEEKH *et al.*, 2005). Entre estes, as carboxilas (COOH) são amplamente implicadas em processos de bioissorção. Cada grupo funcional tem uma constante de dissociação específica (pka) e dissocia-se dependendo do pH do meio onde se encontram (MEHTA GAURE, 2005).

É bem caracterizado que a parede celular dos micro-organismos consiste principalmente de polissacarídeos, proteínas e lipídeos. Na Figura 1 pode ser observada a estrutura da parede celular de alguns tipos de micro-organismos contendo numerosos grupos funcionais, tais como carboxilatos, hidroxilas, tióis, sulfonatos, fosfatos, aminas e imidazólicos, os quais se ligam a íons metálicos (VIEIRA & VOLESKY, 2000).



**Figura 1. Esquema das estruturas da parede celular de alga e bactérias.**

**Fonte: VIEIRA e VOLESKY, 2000.**

Pradham *et al.*, (2007) identificaram vários grupos funcionais na superfície de *Microcystis* utilizando espectrometria no infravermelho. Foram observados picos de absorção característicos de íons carboxilatos, de hidroxilas, um dos principais

componentes dos polissacarídeos presentes na membrana celular, de amidas, de carbonilas e grupos carboxílicos presentes nos carboidratos.

As ligações entre o metal e os grupos ligantes ocorrem geralmente por complexação e por interação eletrostática. Desse modo, a concentração de grupos carregados negativamente é responsável pelas interações e determina o potencial da espécie para a biossorção (VEGLIO & BEOLCHINI, 1997; VOLESKY, 2001; DAVIS *et al.*, 2003). Os biopolímeros dos EPS, devido a sua natureza aniônica, apresentam uma grande capacidade de interagir fortemente com cátions, tendo um papel importante no sequestro ou imobilização de íons metálicos, que são essenciais ou perigosos para as cianobactérias (DE PHILIPPIS & VINCENZINI, 1998). Singh e colaboradores (1999) relataram estímulo de biossíntese de exopolissacarídeo em *Nostoc spongiaeforme* pelos cátions Cu, Ni ou Hg.

Mandal e colaboradores (2007), ao estudar a interação da mucilagem de sementes de *Hyptis suaveolens* (L.) Poit com arsenato perceberam que a absorção de arsênio pela mucilagem varia com o pH do meio, sendo a eficiência de remoção máxima em pH 3,5-4,5. A diminuição da adsorção com o aumento do pH foi justificada pela interação entre o arsenato e íons hidroxilas (OH<sup>-</sup>) da mucilagem.

A inexistência de estudos com a *M. novacekii* justificam a investigação do papel de sua extensa camada mucilagínosa com os diferentes compostos de arsênio.

## MATERIAIS E MÉTODOS

### 3.1 Crescimento e características morfológicas de *M. novacekii* em condições normais de cultivo

#### 3.1.1 *Microcystis novacekii*

A espécie foi isolada a partir das coletas de água na lagoa Dom Helvécio, no Parque Estadual do Rio Doce – Minas Gerais (42°, 35', 595''; 19°, 46', 419'') (Figura 2) e mantida no Laboratório de Limnologia, Ecotoxicologia e Ecologia Aquática (LIMNEA) do Departamento de Biologia Geral/ Instituto de Ciências Biológicas/ Universidade Federal de Minas Gerais.



**Figura 2. Vista panorâmica do lago Dom Helvécio no Parque Estadual do Rio Doce, Minas Gerais, Brasil, local de coleta de *Microcystis novacekii*. Foto da autora.**

#### 3.1.2 Manutenção de *Microcystis novacekii* em condições de cultivo

As culturas são mantidas em câmaras de germinação com temperatura de  $21.0^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  e fotoperíodo 12h claro/12h escuro, sob intensidades luminosas entre  $30\text{-}86 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ . A cianobactéria é cultivada no meio ASM-1 (Tabela 4). As culturas estanques são mantidas em erlemeyers de 125ml com 100ml de meio de cultura. Estudo não publicado do Laboratório de Limnologia, Ecotoxicologia e Ecologia Aquática – LIMNEA - ICB/UFMG fez a avaliação genética da cepa de *Microcystis novacekii* isolada do PERD e concluiu que a mesma não está produzindo toxinas, tratando-se,

portanto, de cepa não toxigênica. Esses resultados foram confirmados pela aplicação da técnica de imuno-ensaio (ELISA) para detecção de microcistina no Laboratório Metropolitano da COPASA (Companhia de Saneamento de Minas Gerais S/A).

**Tabela 4. Composição química do meio ASM-1. (GORHAM et al, 1964)**

<b>Solução estoque A</b>	
NaNO <sub>3</sub>	1,70g
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,49g
MgCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,41g
CaCl <sub>2</sub> .2 H <sub>2</sub> O ou CaCl <sub>2</sub> anidro	0,29g ou 0,219g
Água bi-deionizada	200mL
<b>Solução estoque B</b>	
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> anidro ou KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .3H <sub>2</sub> O	0,87g ou 1,14g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .12H <sub>2</sub> O	1,78g
Água bi-deionizada	100mL
<b>Solução estoque C</b>	
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	2,48g
MnCl <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	1,39g
FeCl <sub>3</sub> .6H <sub>2</sub> O	1,08g
ZnCl <sub>2</sub>	0,335g
CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,019g
CuCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,0014g
Água bi-deionizada	100mL
<b>Solução estoque D</b>	
EDTA Na <sub>2</sub> –	1,86g
Água bi-deionizada	100 mL
<b>Volume das soluções estoque para completar 1 L de meio</b>	
	20 mL da solução A
	2,0 mL da solução B
	0,1 mL da solução C
	0,4 mL da solução D

### 3.1.3 Características gerais de *Microcystis novacekii*

Para conhecer as características morfológicas da cepa em estudo foram realizadas no fim da fase logarítmica de crescimento, medições do diâmetro celular usando o microscópio óptico e programa AXIO VISION RELEASE 4.8. As amostras foram analisadas na presença e ausência de nanquim, reagente utilizado para destacar a mucilagem.

### **3.1.4 Técnicas para o acompanhamento do crescimento de *Microcystis novacekii***

Culturas de *Microcystis novacekii* em meio ASM-1 foram incubadas a  $25,0 \pm 2,0^\circ\text{C}$ , fotoperíodo de 12 horas (claro/escuro), sob iluminação fluorescente branca/fria de intensidade  $30\text{-}86 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , durante 5 dias, sendo retiradas diariamente duas alíquotas (3 mL), após homogeneização, para contagem do número de células ao microscópio óptico e para a medida da  $\text{DO}_{680}$  em espectrofotômetro. Todos os experimentos foram feitos em triplicata.

Os dados referentes à contagem de células e absorbância foram plotados em gráfico e por regressão linear estabeleceu-se a correlação entre as variáveis.

#### **a) Contagem de células em microscópio óptico**

Foi transferido 1 mL da cultura da cianobactéria coletada após homogeneização do meio para um tubo falcon, acrescentaram-se duas gotas de solução de lugol. Manteve-se ao abrigo da luz por 30 minutos. A digestão da mucilagem, quando necessária, foi obtida pela adição de  $500\mu\text{L}$  de NaOH (1N).

Após homogeneização em agitador tipo *vortex*, por 30 segundos, a amostra foi transferida para câmara de contagem Fuchs-Rosenthal e após sedimentação das células (10 minutos) estas foram contadas em microscópio óptico. Foram contadas todas as células presentes nos campos até que se obtivesse 400 células, sendo estimada a densidade da cultura (células/mL).

#### **b) Densidade óptica**

A densidade óptica foi determinada em amostras de 3,0 mL de cultura, retirados após homogeneização, transferidos para cubetas de quartzo com caminho óptico de 10mm. As amostras foram analisadas em espectrofotômetro UV/Visível Hitachi U-200 em comprimento de onda de 680nm, conforme Fiovarante, *et al.*, (2010) e Ribeiro *et al.*, (2010). O branco foi registrado pela medida da absorbância do meio ASM-1 sem a adição do arsênio e da cianobactéria.

### **3.1.5 Curva de crescimento, tempo de geração e taxa de crescimento relativo de *M. novacekii***

O crescimento da cianobactéria foi monitorado por contagem de células, durante 15 dias. As amostras foram coletadas diariamente em trélicas. As taxas de crescimento

( $\mu \cdot \text{dia}^{-1}$ ) e o tempo de duplicação ( $\text{g} \cdot \text{dia}^{-1}$ ) para a fase exponencial da espécie foram estabelecidos. A taxa foi calculada como a média das contagens das quatro amostras ( $n=4$ ), segundo as fórmulas apresentadas por FOGG & THAKE (1987):

$$\mu = (\text{Ln}N - \text{Ln}N_0) \cdot (t - t_0)^{-1}$$

$$G = \ln 2 \cdot \mu^{-1}$$

Onde:

$\mu$  é a velocidade específica de crescimento.

G é o tempo de duplicação celular, calculado a partir de  $\mu$ .

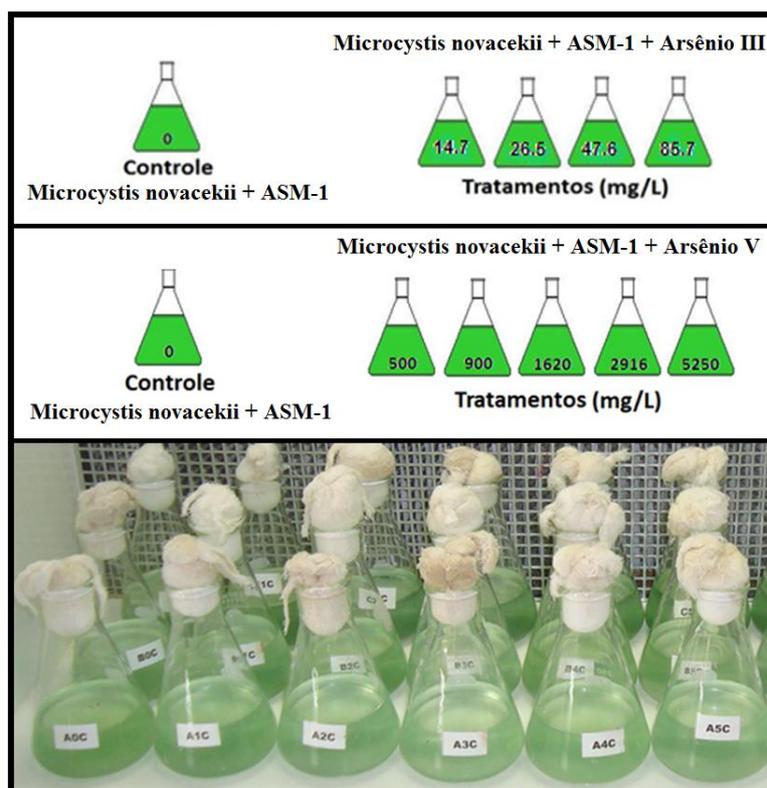
$N_0$  é o número inicial de células.  $\text{mL}^{-1}$  no tempo inicial  $t_0$ .

$N$  é o número final de células.  $\text{mL}^{-1}$  no tempo  $t$ .

### 3.2 Toxicidade do arsênio para cianobactéria *Microcystis novacekii*

Testes de toxicidade de arsênio III e V para a cianobactéria *Microcystis novacekii* foram realizados seguindo o protocolo OECD 201 *Freshwater Alga and Cyanobacteria, Growth Inhibition Test* (2006).

Em erlemeyers de 250 mL, contendo 150mL do meio de cultura ASM-1, adicionaram-se 3mL do inóculo, em fase exponencial de crescimento, obtendo-se culturas de  $10^5$  células/mL. Todos os frascos foram mantidos a temperatura de  $25,0 \pm 2,0$  °C, fotoperíodo constante, iluminação por luz fluorescente branca/fria de intensidade 3500 lx e agitação contínua de aproximadamente 100 rpm. Os frascos foram distribuídos aleatoriamente na mesa agitadora, sendo as posições alteradas diariamente, de modo a diminuir possíveis diferenças de luminosidade e temperatura no crescimento da cianobactéria. Todas as concentrações-testes foram avaliadas em triplicata e o controle em quadruplicatas (Figura 3).



**Figura 3. Esquema do ensaio de toxicidade. Controle (n=4) e tratamentos (n=3). Foto da autora.**

No início da fase logarítmica do crescimento de *Microcystis novacekii* foram adicionados à cultura volumes pré-definidos de solução estoque de arsênio (diluído em meio ASM-1 e pH ajustado para  $\pm 7.5$ ) de forma a obter as concentrações finais descritas na Tabela 5, determinadas por uma série geométrica de razão 1.8.

**Tabela 5. Concentrações de Arsênio (III) e (V) para o teste de toxicidade.**

Ensaio toxicidade Arsênio		
Arsênio (III) (As <sub>2</sub> O <sub>3</sub> ) (µg/L)	Arsênio V (Na <sub>2</sub> HAsO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O) (µg/L)	
	Altas concentrações	Baixas concentrações
14.7	500	0.05
26.5	900	0.5
47.6	1620	5
85.7	2916	50
	5250	

As concentrações utilizadas foram baseadas em experimentos anteriores. O crescimento das culturas testes e controle foram monitorados diariamente, durante 96 horas, pela medida da densidade óptica a 680nm.

### 3.2.1 Cálculo da inibição do crescimento ( $EC_{50}$ )

Os resultados do crescimento obtidos em 96 horas de experimento foram utilizados para calcular os valores da  $EC_{50}$  (dose de arsênio que inibe 50% do crescimento) para *Microcystis novacekii* usando análise por regressão linear da concentração do metaloide (ln) pela porcentagem de inibição.

A taxa média de crescimento para um período específico (96 horas) foi calculada a partir da taxa de crescimento da cianobactéria em função do tempo (equação 1). O calculo foi realizado para todas as concentrações.

---

Onde:

$\mu_{i-j}$  é a média específica de crescimento do período  $i$  a  $j$ ;

$X_i$  é a medida do crescimento no tempo  $i$ ;

$X_j$  é a medida do crescimento no tempo  $j$ ;

$t_i$  tempo inicial;

$t_j$  tempo final.

Para calcular a porcentagem de inibição de crescimento referente a cada concentração testada, aplicou-se a equação 2:

---

Onde:

%I, é a porcentagem de inibição na taxa de crescimento (referente àquela concentração);

$\mu_c$  é a taxa de crescimento médio do grupo controle;

$\mu_t$  é a taxa de crescimento médio para a concentração avaliada.

A concentração de arsênio que levou a 50% de inibição foi estabelecida por interpolação gráfica, utilizando-se a equação da reta.

### 3.2.2 Avaliação quantitativa de clorofila a

Após 96 horas de exposição ao arsênio, amostras contendo 10 mL foram retiradas de cada tratamento e centrifugadas a 2000 rpm durante 10 minutos a 25 °C. Foram adicionados 3mL de metanol (100%) ao precipitado, o material foi agitado vigorosamente em agitador manual (Vortex) durante 30 segundos. Colocou-se a amostra durante 24 horas no escuro à temperatura ambiente ( $\pm 25$  °C) e procedeu-se a nova centrifugação nas mesmas condições anteriores. A concentração de clorofila a foi determinada a partir da absorvância do sobrenadante em 663 nm, sendo descontado o espalhamento de luz observado no branco. A concentração de clorofila a foi determinada a partir da equação 3 (Meeks & Castenholz, 1971 modificado por Fiore, 2000).

Onde:

: coeficiente de absorvidade para a clorofila a extraída com metanol ( $\alpha = 12,7$ ).

### 3.2.3 Análise estatística

Para comparar o padrão de crescimento entre os tratamentos foi usada análise de covariância. Diferenças nas curvas de crescimento foram consideradas significativas quando  $p < 0,05$ , comparado ao controle. ANOVA unifatorial e teste de Tukey foram feitos para determinar a diferença significativa entre controle e tratamentos.

### 3.3 Bioacumulação de arsênio pela cianobactéria *Microcystis novacekii*

Os testes de bioacumulação foram realizados nas mesmas condições descritas no item 3.2.

As mesmas concentrações utilizadas nos frascos teste (com cultura), também foram avaliadas sem presença da cianobactéria (Figura 4 e 5).

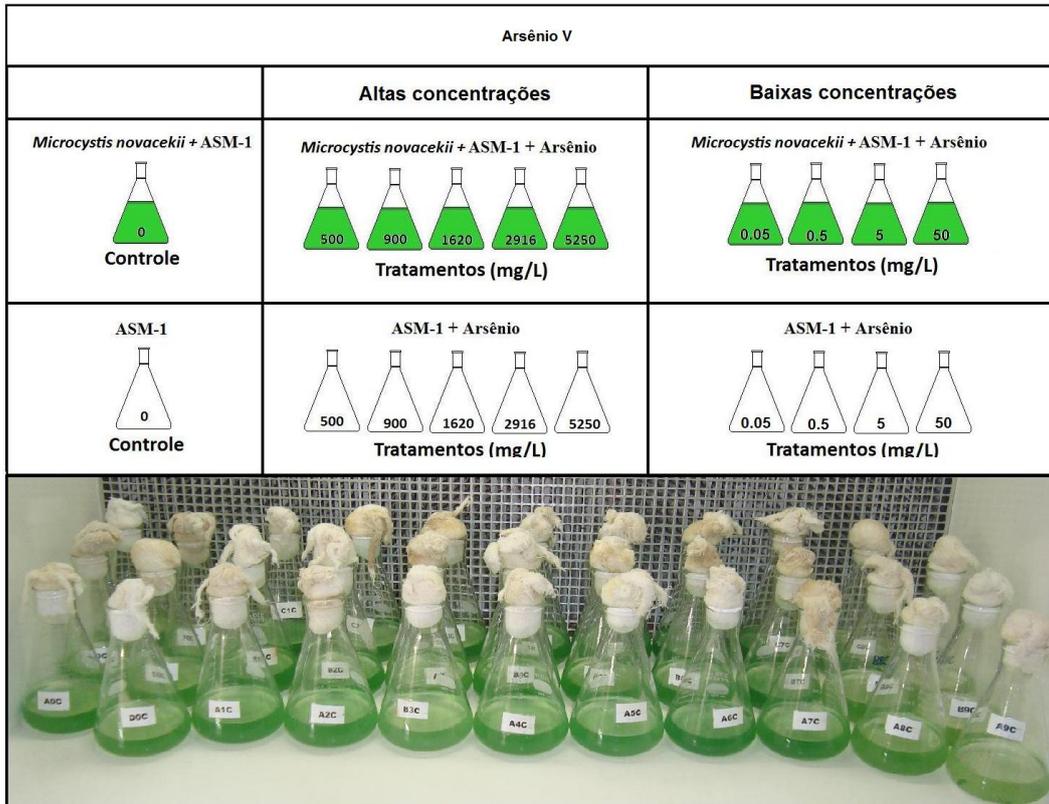


Figura 4. Apresentação final do experimento de remoção de As (V).

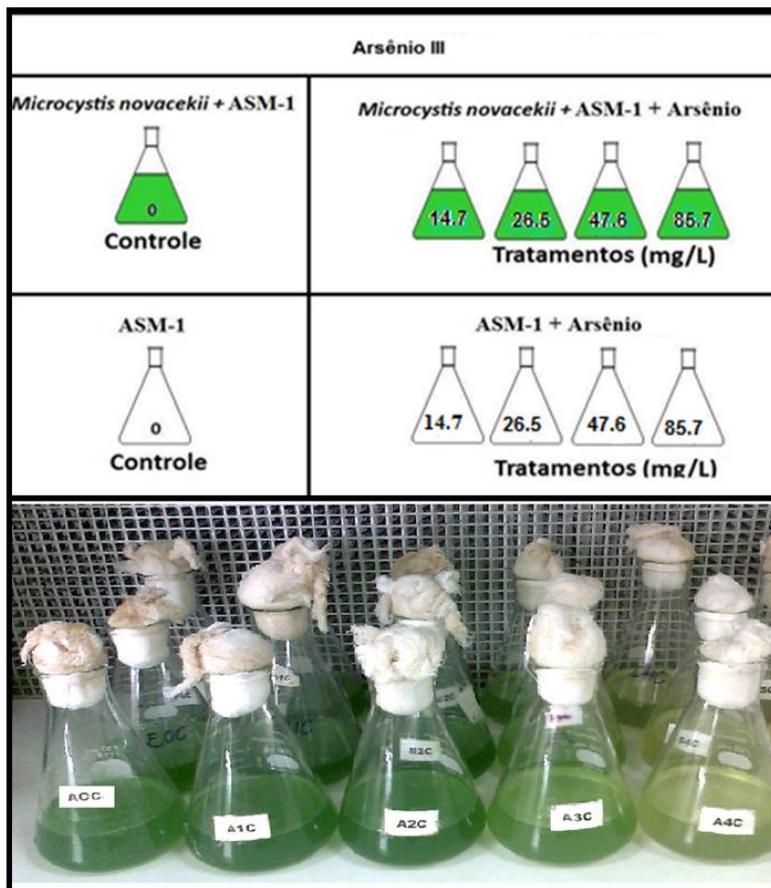


Figura 5. Apresentação final do experimento de remoção de As (III).

No quarto dia de crescimento (início fase logarítmica) de *Microcystis novacekii* foram adicionados às culturas volumes pré-definidos de solução estoque de arsênio (diluído em meio ASM-1 e pH ajustado para  $\pm 7.5$ ) de forma a obter as concentrações finais descritas na Tabela 6.

**Tabela 6. Concentrações de arsênio em ensaio de biorremocão.**

Ensaio Bioacumulação As (V) ( $\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) ( $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ )		Ensaio Bioacumulação As (III) ( $\text{AsO}_3$ ) ( $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ )
Baixas concentrações (condições naturais)	Altas concentrações (condições de toxicidade)	Altas concentrações (condições de toxicidade)
0.05	500	14.7
0.5	900	26.5
5	1620	47.6
50	2916	85.7
	5250	

O crescimento das culturas controle e das culturas teste, após a inserção de arsênio, foi monitorado em dias alternados, pela medida da densidade óptica a 680nm. Com 0, 96 e 192 horas foram retiradas, após homogeneização da cultura, alíquotas de 10 ml dos testes e controles. Estas foram centrifugadas a 2800 rpm, temperatura de 20°C por 15 minutos. Separou-se o sobrenadante do precipitado (biomassa) para determinar a quantidade de arsênio total presente no sobrenadante e biorremovida nas células (96 horas). A quantificação de arsênio tanto no sobrenadante quanto no precipitado (pellet) foi realizada por espectrometria de emissão atômica por plasma acoplado indutivamente (ICP-OES), usando-se um espectrofotômetro modelo *Perkin Elmer Optima 4300 DV*.

O percentual de remoção de arsênio do meio aquoso em 96 e 192 horas de exposição foi calculado por meio da equação 4. O percentual de arsênio incorporado pela biomassa celular (192 horas) foi obtido a partir da equação 5.

Onde:

é o percentual de arsênio removido do meio aquoso num determinado período de tempo;

é o percentual de arsênio incorporado na biomassa algal;

é a média aritmética da concentração de arsênio adicionada no meio aquoso no tempo i;

é a média aritmética da concentração de arsênio encontrada no meio aquoso no tempo j;

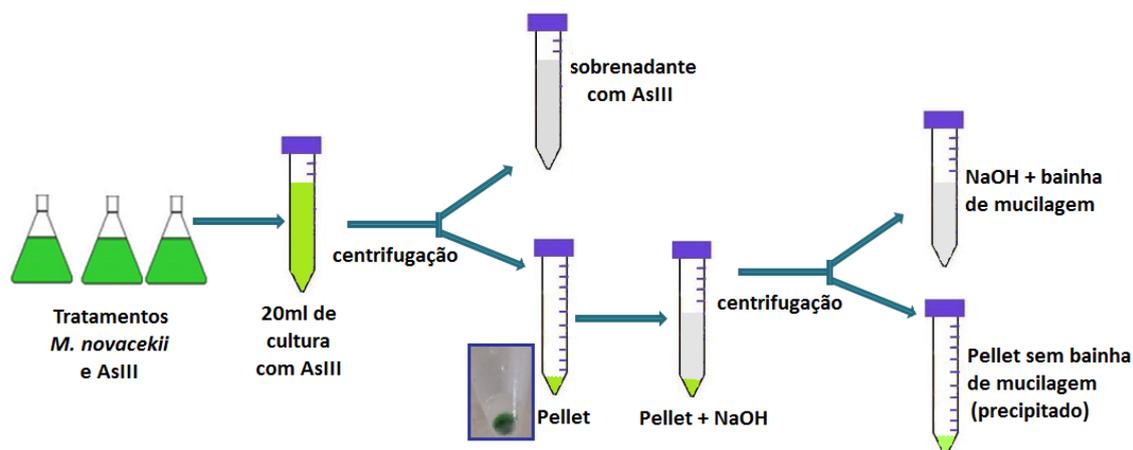
é a média aritmética da concentração de arsênio encontrada na biomassa celular.

Para verificar as diferenças dos dados usou-se o teste ANOVA Fatorial com variáveis independentes. O teste de tukey foi feito para verificar diferença entre tratamentos, usando-se  $p > 0.05$ .

### **3.4 Papel da bainha de mucilagem de *Microcystis novacekii* na retenção de As(III)**

O teste foi realizado seguindo o mesmo método descrito no item 3.2 e 3.3, para experimentos de toxicidade e bioacumulação, respectivamente. A concentração  $14.7 \text{ mg.L}^{-1}$  foi escolhida por apresentar o menor percentual de inibição de crescimento de *M. novacekii* para a série geométrica testada.

No final da fase de crescimento logarítmico de *M. novacekii* (192 horas) foram coletados 20mL de cultura celular e centrifugados a 4000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o material precipitado foi lavado com água destilada e centrifugado nas mesmas condições. Esse procedimento foi repetido por duas vezes. Ao material precipitado final, adicionaram-se 8ml de NaOH 2N. A mistura foi mantida em agitação lenta por 2 horas, seguido por centrifugação a 4000 rpm por 15 minutos. Separou-se a fração correspondente ao sobrenadante e o precipitado, conforme esquema ilustrativo mostrado na figura 6. O mesmo procedimento foi realizado sem adicionar NaOH separando-se o sobrenadante e o precipitado.



**Figura 6: Esquema ilustrativo mostrando metodologia utilizada para separação da bainha de mucilagem de *Microcystis novacekii*.**

O percentual de arsênio retido na bainha de mucilagem e bioacumulado pela biomassa celular foi obtido a partir da equação 6.

### 3.5 Preparação das amostras para determinação do arsênio total.

#### a) Preparação do meio aquoso (sobrenadante)

Os sobrenadantes foram filtrados em filtro de 0,45 $\mu$ m (Millipore), fixados com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> em pH 2,0 As(V) e HCl 0.8% v.v As(III) e conservados até análise, conforme (BARRA *et al.*, 2000).

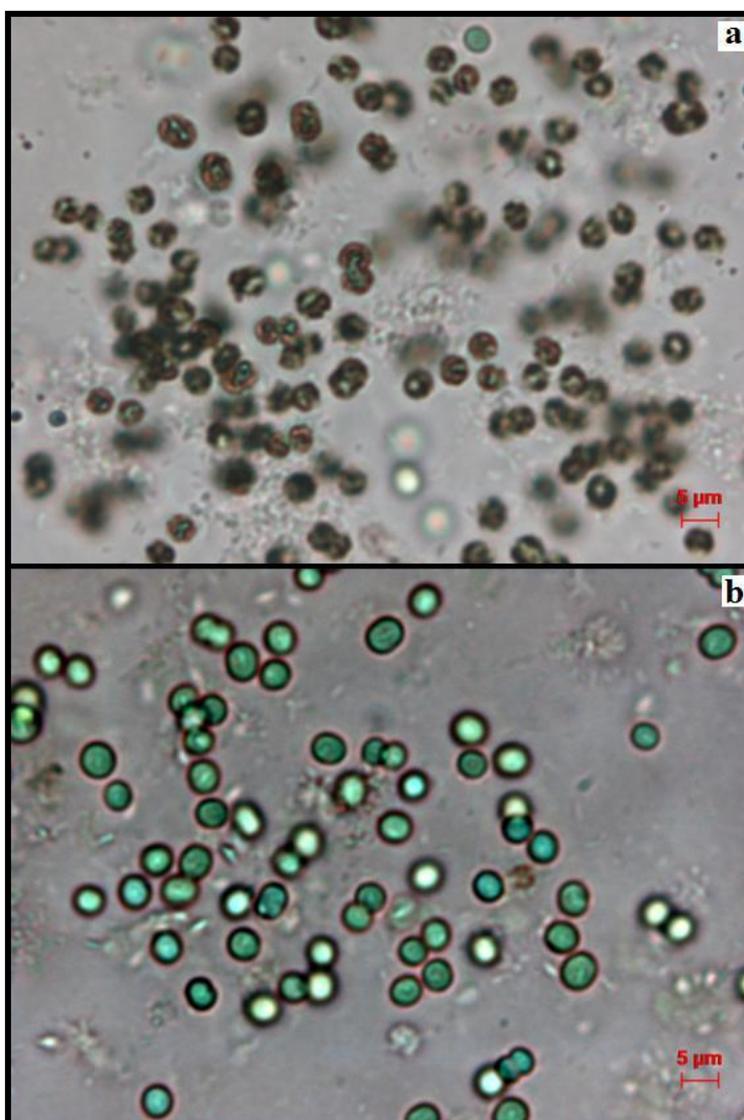
#### b) Preparação da biomassa (pellet)

A digestão da biomassa algal foi realizada conforme metodologia de Truus *et al* (2007). Colocou-se em tubos de polietileno o pellet obtido para 10 ml de amostra de *Microcystis novacekii*, 3 ml de HNO<sub>3</sub> concentrado (96%) e 1 ml de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30%). Os tubos foram aquecidos em um sistema de reação de micro-ondas acelerado (marca ETHOS 1–Advanced microwave digestion system/Modelo Milstone). Sendo a amostra digerida por 30 minutos a 200 °C, potência de 45bar. Após o processo o volume foi ajustado para 25 ml com água Milli-Q. As amostras digeridas foram analisadas quantitativamente para arsênio total usando ICP-OES.

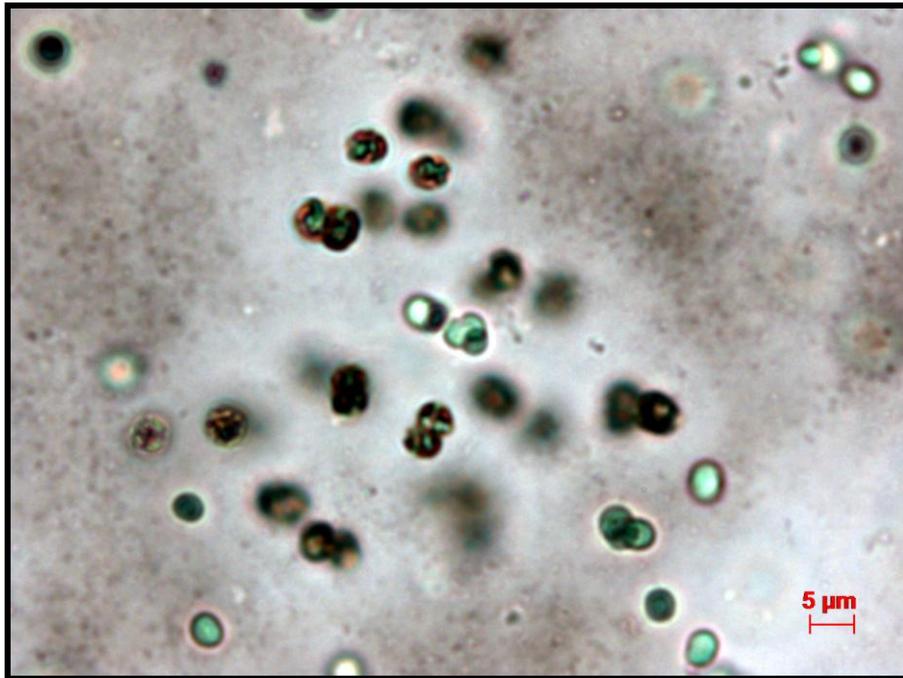
## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Crescimento e características morfológicas de *M. novacekii* em condições normais de cultivo

O estudo morfológico da espécie *Microcystis novacekii* demonstrou que essa se caracteriza por um denso arranjo celular no centro da colônia e células isoladas na periferia. Suas colônias jovens são formadas por células esféricas e algumas vezes levemente ovais. As células possuem entre 3 e 6 $\mu$ m de diâmetro, sendo possível distinguir células senescentes de células jovens (Figura 7). A espécie apresenta densa bainha de mucilagem, entre 0,5 a 0,10 $\mu$ m (Figura 8).



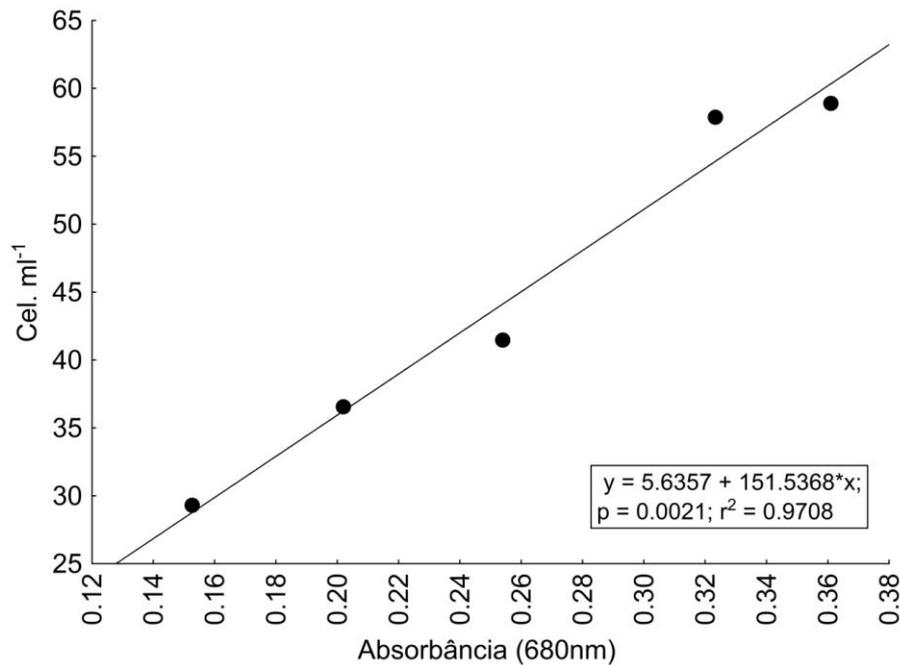
**Figura 7.** Colônias de *Microcystis novacekii*. *a* colônias em processo de senescência, *b* colônias com células jovens. Aumento de 1000x em microscopia óptica. Foto: Laboratório LIMNEA/Fernanda Aires Guedes



**Figura 8: Células de *Microcystis novacekii*, em teste com nanquim, evidenciando a bainha. Aumento de 1000x em microscopia óptica. Foto: Laboratório LIMNEA/Fernanda Aires Guedes.**

Para determinação do crescimento celular são utilizadas técnicas clássicas como a contagem direta das células ao microscópio e a densidade ótica da cultura. A contagem de células ao microscópio, embora seja um método simples e muito utilizado, tem a desvantagem de ser trabalhoso, demorado e apresentar grande variabilidade. Por ser um método mais rápido para monitoramento do crescimento a densidade ótica é uma alternativa. Contudo é necessária a obtenção da correlação entre as duas grandezas, densidade ótica e contagem celular para a espécie.

A correlação entre os métodos pode ser observada na figura 9. Observou-se um alto coeficiente de correlação ( $R^2=0.9708$ ,  $p<0.05$ ) entre curva de crescimento obtido pela contagem microscópica e a densidade ótica estimada pela absorbância em 680nm (Figura 9).

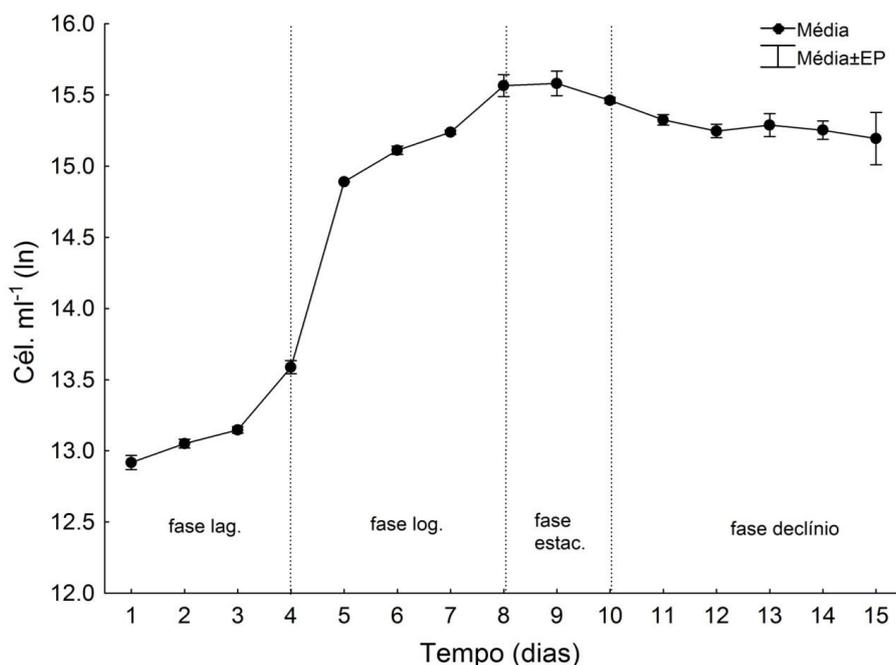


**Figura 9. Regressão linear simples entre o crescimento monitorado por densidade óptica (680nm) e contagem celular ao microscópio para as culturas de *M. novacekii* na ausência de arsênio.**

Estes resultados estão de acordo com o estudo de MA e colaboradores (2004), (2005), (2006) que demonstraram uma boa correlação entre o crescimento da cultura monitorado por contagem celular e a densidade ótica, entre várias espécies de cianobactérias.

#### **4.1.1 Curva de crescimento, taxa de crescimento relativo e tempo de geração de *M. novacekii*.**

As fases do crescimento de *Microcystis novacekii* foram definidas a partir do crescimento apresentado na figura 10. A fase *lag*, pôde ser identificada no intervalo de 0 a 4 dias. A fase *log*, ou de crescimento exponencial, foi proeminente, apresentando um tempo de duração de 4 dias. Após este período, as células entraram na fase estacionária, a qual se tornou evidente após dez dias do início do experimento. A partir do décimo dia iniciou-se a fase de declínio, nesta fase observou-se a formação de grumos de mucilagem e de células mortas durante a contagem de células em microscopia óptica (Figura 11).



**Figura 10. Curva de crescimento de *Microcystis novacekii*. Densidade média inicial da fase log igual a  $7.9 \times 10^5$  e final de  $5.7 \times 10^6$ .**

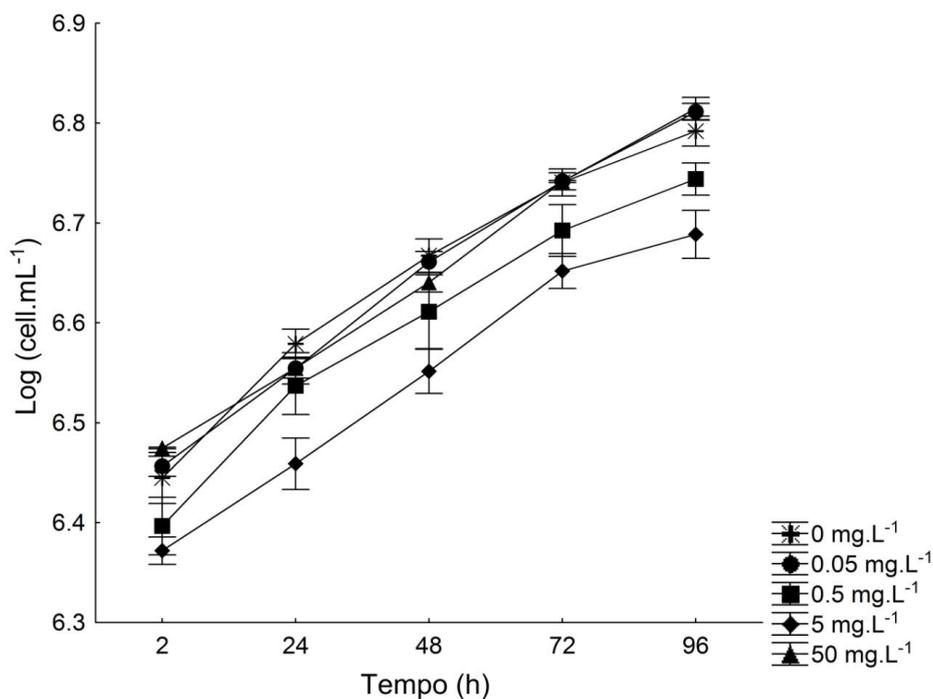
A *Microcystis novacekii*, apresentou taxa média de crescimento de 0.185 dias e tempo de duplicação de  $3.74 \text{ dia}^{-1}$  para a fase exponencial.

Ao comparar a taxa de crescimento de *M. novacekii* com outras espécies do mesmo gênero percebeu-se que esta possui crescimento similar a *Microcystis aeruginosa* ( $0.184 \text{ dia}^{-1}$ ) (LI & LI, 2012) e crescimento superior a *Microcystis wesenbergii* ( $0.117 \text{ dia}^{-1}$ ) (LI & LI, 2012). Porém *M. novacekii* apresentou crescimento inferior a *M. viridis* ( $0.263 \text{ dia}^{-1}$ )(RUCKERT & GIANE, 2004).

A partir dos resultados obtidos foram delineados os testes de toxicidade e interação arsênio/cianobactéria.

#### **4.2 Toxicidade do arsênio para a cianobactéria *Microcystis novacekii***

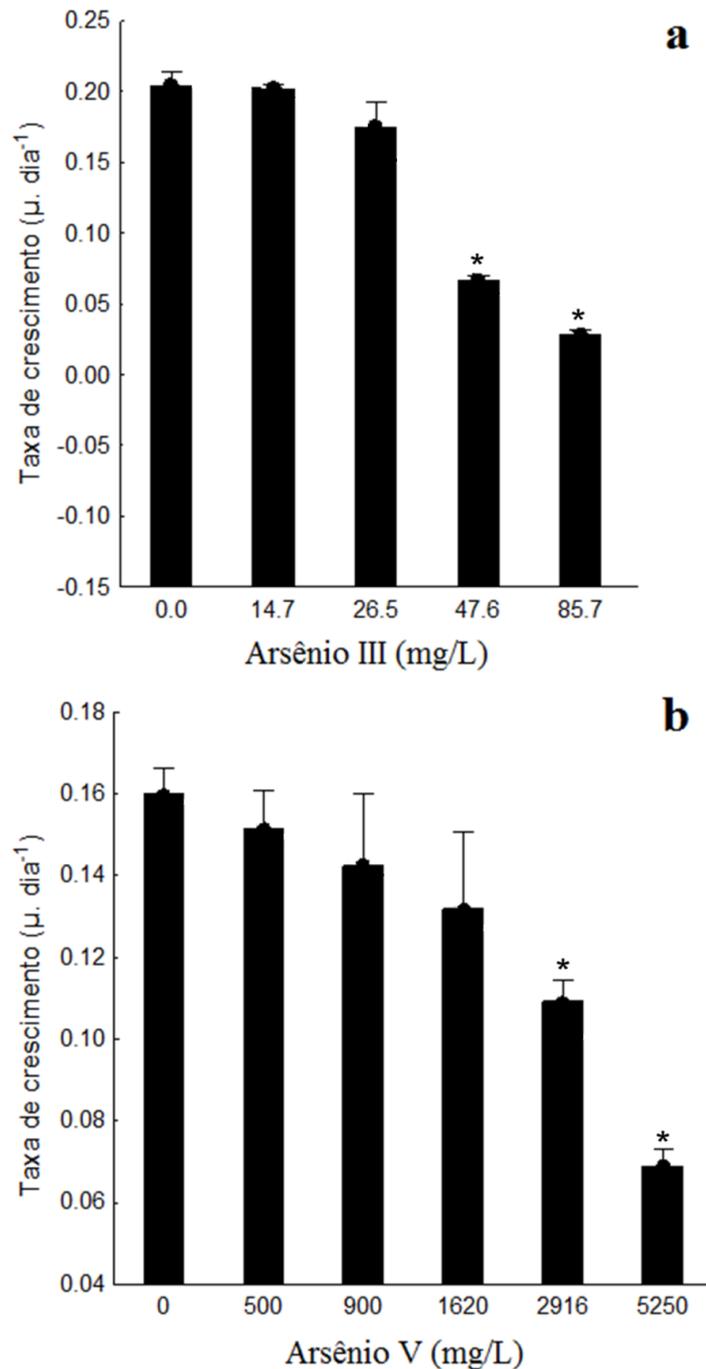
Os experimentos usando baixas concentrações de As (V) foram delineados em função das concentrações encontradas comumente em áreas de mineração (BORBA *et al.*, 2004b; ELEUTERIO, 1997; PIMENTEL *et al.*, 2003). Nessas concentrações de arsenato ( $0,05$  a  $50 \text{ mg.L}^{-1}$ ), não foi observada inibição do crescimento de *M. novacekii* em relação ao controle ( $p > 0,05$ ) (Figura 11).



**Figura 11. Crescimento de *Microcystis novacekii* em baixas concentrações de arsênio (V), 0 a 50 mg.L<sup>-1</sup>, em 96 h. Os pontos representam a média  $\pm$  SD, n = 4 no controle, n =3 nos outros tratamentos. Teste de covariância: p = 0,072.**

Diversos experimentos preliminares foram realizados a fim de definir a faixa de concentração para determinação da EC<sub>50</sub>. De acordo com o protocolo OECD os testes devem considerar uma série geométrica onde a inibição de crescimento compreenda a faixa média da curva de inibição. Estes experimentos permitiram a definição de uma série geométrica de fator igual a 1.8, partindo-se da concentração inicial de 500mg/l para o arsenato e 14,7 mg para o arsenito. Quando os testes foram realizados nesta segunda série de concentração de As(V) (500 a 5250 mg.L<sup>-1</sup>) e As(III) (14.7 a 85.7 mg.L<sup>-1</sup>) observou-se a redução da taxa de crescimento de *M. novacekii* de forma estatisticamente significativa (p<0.05).

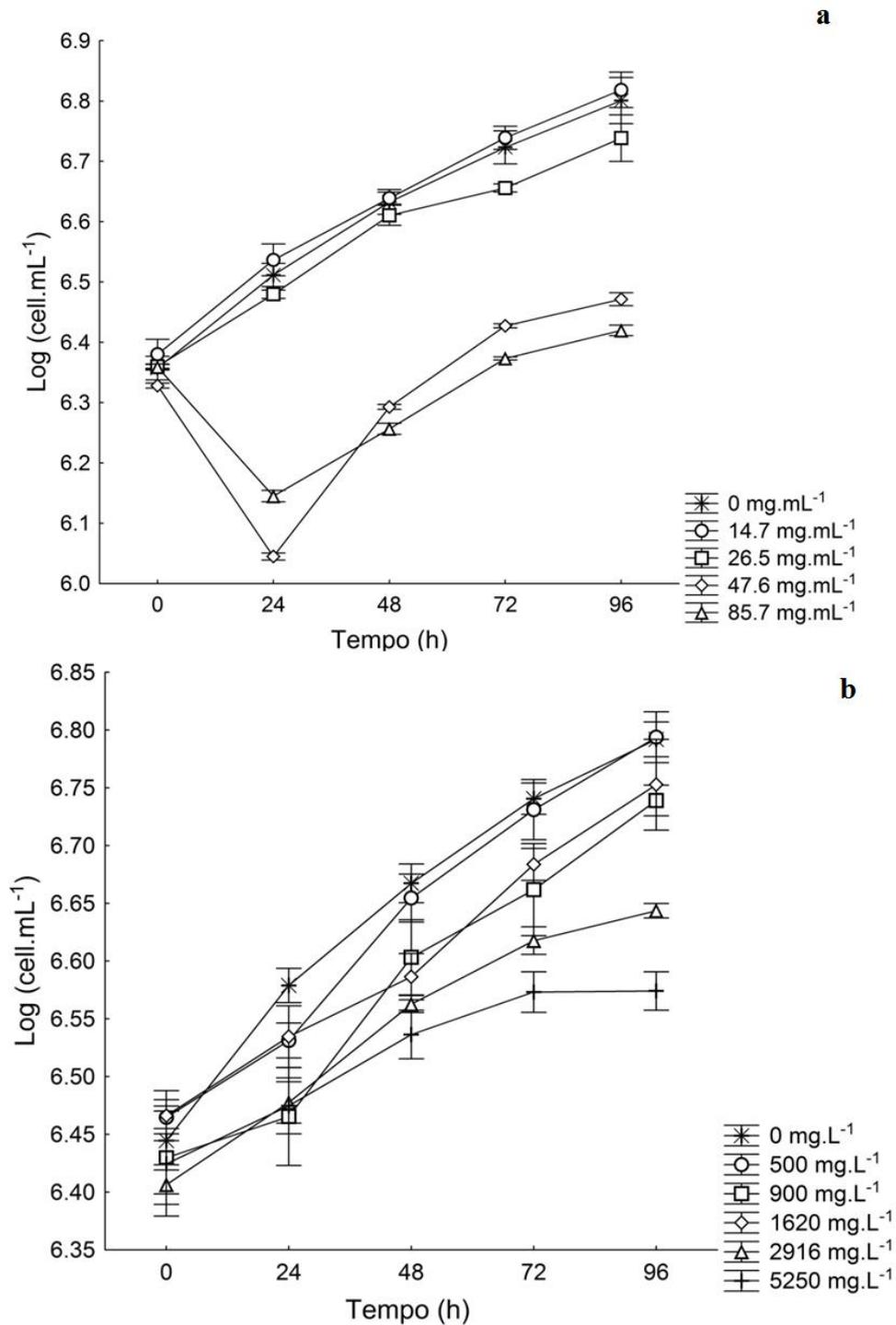
Na figura 12 são apresentados as taxas de crescimento ( $\mu$ .dia<sup>-1</sup>) de acordo com as concentrações de arsênio. Os resultados apresentados comprovam a validade do teste de acordo com protocolo OECD 201(2006).



**Figura 12.** Taxa de crescimento médio de *M. novacekii* referentes ao controle (n=4) e tratamentos (n=3), durante o teste de toxicidade (96 horas). Em *a* As(III) e em *b* As(V). O asterisco (\*) indica diferença significativa entre o controle e os tratamentos, aceitando um nível de significância de 0,05 ( $P < 0,05$ ).

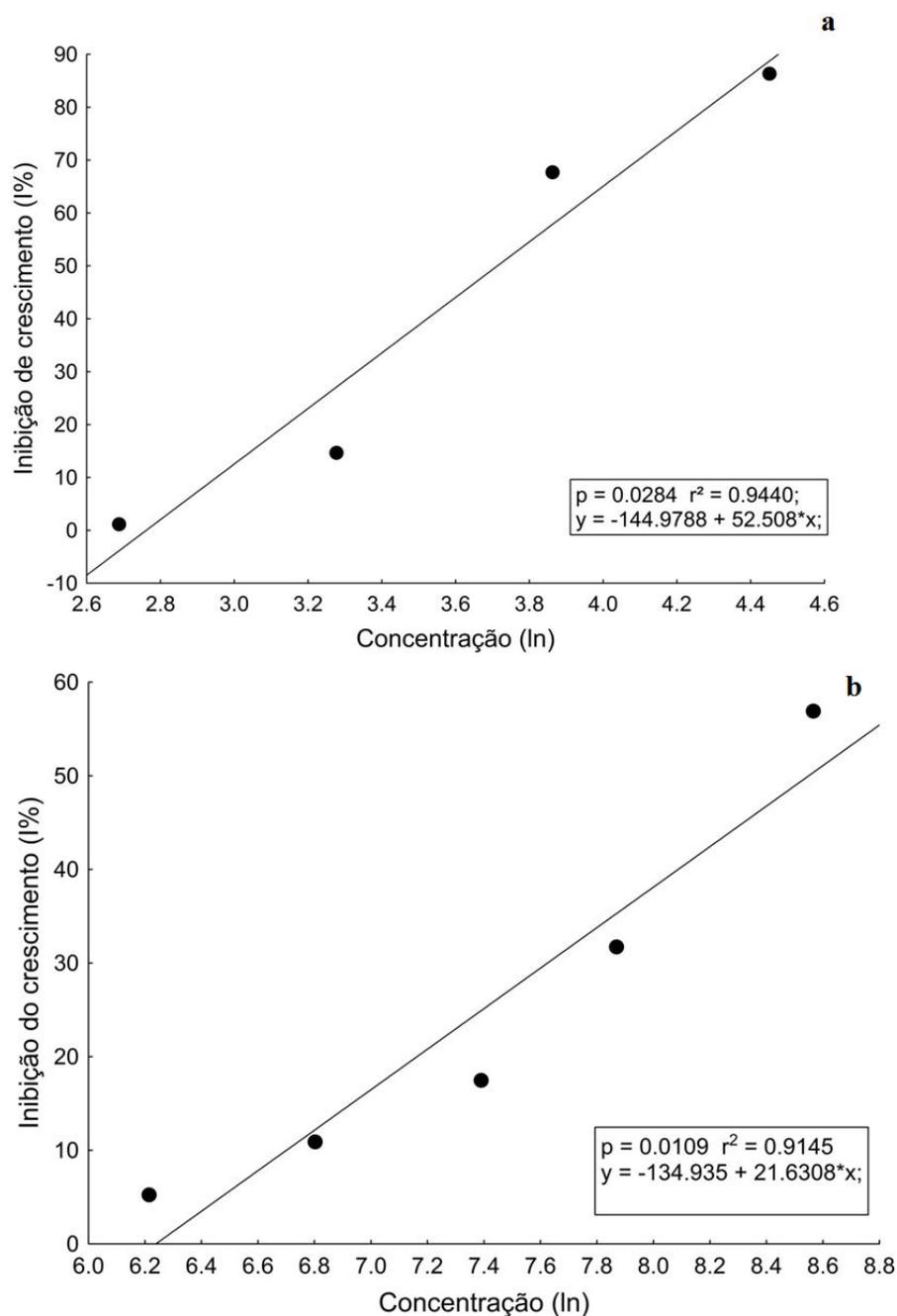
Nas concentrações mais elevadas de arsênio nas formas químicas (III) e (V), percebeu-se diminuição gradual na taxa de crescimento ( $p < 0,05$ ) de *M. novacekii* com o aumento da concentração de arsênio, apresentando o maior valor de crescimento na concentração de 900 mg.L<sup>-1</sup> para o As (V), e 14.7 mg.L<sup>-1</sup> para o As (III), em relação ao

controle (Figura 13) o que mostra a maior sensibilidade da cianobactéria para o As(III). De acordo com (CULLEN & REIMER, 1989) o As (III) é uma forma química mais tóxica do que As (V) para os organismos aquáticos.



**Figura 13.** Crescimento de *M. novacekii* exposta à concentrações crescentes de arsênio. Em *a* As(III) e em *b* As(V). Os pontos representam média ± Erro Padrão, n=4 no controle, n= 3 nos tratamentos. Teste de análise de co-variância p<0.01.

A concentração estimada que reduziu o crescimento *M. novacekii* em 50% foi de 5164,76 mg.L<sup>-1</sup> para o As (V) e de 40,99 mg.L<sup>-1</sup> para o As (III), como pode ser observado na Figura 14 e na Tabela 7. Ambas as curvas apresentaram linearidade superior a 0.9 reforçando a validade do teste.



**Figura 14.** Percentual de inibição do crescimento de culturas de *Microcystis novacekii* expostas a concentrações crescentes de arsênio. Em *a* As(III) e em *b* As(V). Ensaio de 96 horas.

**Tabela 7. Inibição do crescimento da *Microcystis novacekii* por arsênio.**

Concentração Teste As (III) (mg.L <sup>-1</sup> )	Ln (x)	% Inibição (y)
14.7	2.69	1.1
26.5	3.28	14.6
47.6	3.86	67.7
85.7	4.45	86.3
<b>Ec50</b>		<b>40,99 mg.L<sup>-1</sup></b>
Concentração Teste As (V) (mg.L <sup>-1</sup> )	Ln (x)	% Inibição (y)
500	6.21	5,2
900	6.80	10,9
1620	7.39	17,4
2916	7.86	31,7
5250	8.56	56,9
<b>Ec50</b>		<b>5164,76 mg.L<sup>-1</sup></b>

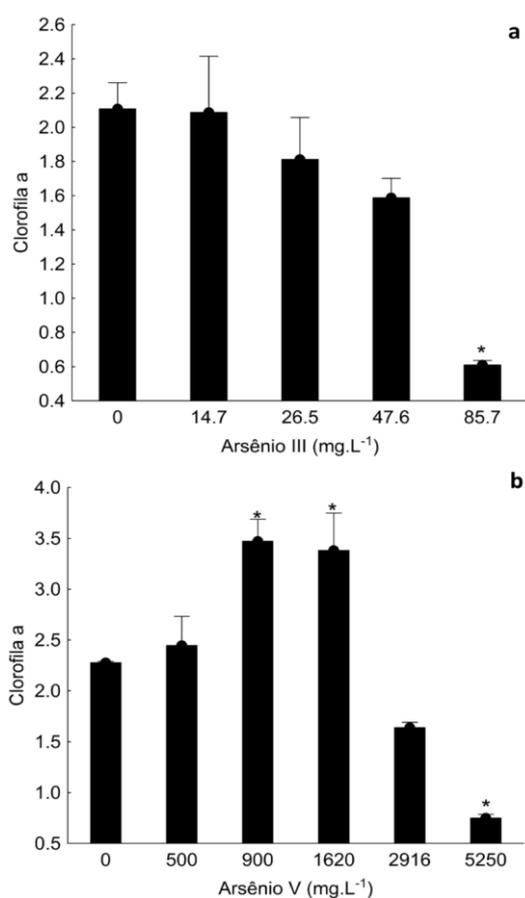
Estes resultados são semelhantes aos descritos por SHAHEEN *et al.*, 2007 que detectaram em meio de cultivo com *Phormidium* sp., *Nostoc* sp., *Anabaena* sp. e *Calothrix* sp. a sobrevivência de todas as espécies à adições de arsenato de sódio até 1000 mg.L<sup>-1</sup>. Concentrações de 1000 mg.L<sup>-1</sup> resultaram na morte das células de *Aphanothece* sp. que são unicelulares e *Cylindrospermum* sp. que são filamentosas. Por outro lado, na mesma concentração (1000 mg.L<sup>-1</sup>) MURRAY, *et al.* (2003) ao estimular a produção de biomassa de *Chlorella vulgaris* não observaram resistência dessa espécie à concentração de arsênio do meio. Estas observações podem sugerir que a exposição ao arsênio pode ter um papel na seleção de espécies dominantes em ambientes contaminados. Na tabela 8 são apresentados dados de toxicidade de cianobactérias e algas ao arsênio (V) e ao As (III).

**Tabela 8. Toxicidade de arsênio para cianobactérias e algas.**

<b>Espécies</b>	<b>Arsênio</b>	<b>Conc. com efeito tóxico (mg.L<sup>-1</sup>)</b>	<b>Referência</b>
<b>Cianobactérias</b>			
<i>Microcystis novacekii</i>	As (III)	40.99 (EC <sub>50</sub> )	Este estudo
	As (V)	5164.76 (EC <sub>50</sub> )	
<i>Phormidium sp.</i>	As (V)	10000	Shaheen <i>et al.</i> , 2007
<i>Phormidium sp.</i>	As (V)	100	Maeda, 2004
<i>Phormidium laminosum</i>	As (V)	100	Bhattacharya & Pal, 2011
<i>Nostoc sp</i>	As (V)	5000	Shaheen <i>et al.</i> , 2007
<i>Anabaena sp</i>	As (V)	5000	Shaheen <i>et al.</i> , 2007
<i>Calothrix sp.</i>	As (V)	1000	Shaheen <i>et al.</i> , 2007
<i>Synechocystis sp</i>	As (III)	37.46	Xi-Xiang <i>et al.</i> , 2012
	As (V)		
<b>Algas</b>			
<i>Scenedesmus obliquus</i>	As (V)	0.048 (EC <sub>50</sub> )	Vocke <i>et al.</i> , 1980
<i>Ankistrodesmus falcatus</i>	As (V)	0.256 (EC <sub>50</sub> )	Vocke <i>et al.</i> , 1980
<i>Selenastrum capricornutum</i>	As (V)	30.761 (EC <sub>50</sub> )	Vocke <i>et al.</i> , 1980
<i>Scenedesmus quadricauda</i>	As (V)	61 (EC <sub>50</sub> )	Fargosová, 1994.
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	As (V)	202 (EC <sub>50</sub> )	Jurewicz & Buikema, 1980
<i>Chlorella sp</i>	As (III)	25.2 (EC <sub>50</sub> )	Levy <i>et al.</i> , 2005
	As (V)	25.4 (EC <sub>50</sub> )	
<i>Monoraphidium arcuatum,</i>	As (III)	14.6 (EC <sub>50</sub> )	Levy <i>et al.</i> , 2005
	As (V)	0.254 (EC <sub>50</sub> )	
<i>Chlamydocapsa peterfii</i>	As (V)	0.07492	Knauer <i>et al.</i> , 1999
<i>Chlamydocapsa bacillus</i>	As (V)	74.92	Knauer <i>et al.</i> , 1999
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	As (V)	74.92	Kaise <i>et al.</i> , 1999

Microalgas são micro-organismos pertencentes ao filo Chlorophyta, que contém clorofila e outros pigmentos fotossintéticos sendo capazes de realizar fotossíntese (LEE, 1989). O excesso de energia luminosa incidente no aparato fotossintético que não é utilizado fotoquimicamente deve ser dissipado para que as condições fisiológicas da célula não sejam afetadas. A emissão de fluorescência é principalmente devida às moléculas de clorofila-*a* do fotossistema II (PSII), o que permite avaliar a capacidade fotossintética e as condições fisiológicas do organismo (Schreiber, 2003), em consequência do efeito dos diferentes fatores ambientais sobre a fotossíntese (Bolhàr-Nordenkampf, 1989). Essa emissão representa apenas 1 a 5% da energia de luz absorvida (Berges *et al.*, 1996; Maxwell & Johnson, 2000).

O monitoramento da capacidade fotossintética de *M. novacekii* após a exposição ao arsênio (III) e (V) permitiu verificar a redução da concentração de clorofila *a* ( $p < 0.05$ ) nas concentrações de arsênio onde foram observadas variações nas taxas de crescimento da espécie (Figura 15).



**Figura 15.** Síntese de clorofila-*a* por *Microcystis novacekii* exposta a concentrações crescentes de arsênio (III) e (V). Em *a* As(III) e em *b* As(V). O asterisco (\*) indica diferença significativa entre o controle e tratamentos ( $p < 0,05$ ).

Os resultados encontrados referentes à biossíntese de clorofila por *M. novacekii* exposta ao As (V) são similares aos de Bhattacharya & Pal (2011) que investigaram a toxicidade do arsenato para a cianobactéria *Phormidium laminosum*. A produção de clorofila por microalgas expostas a concentrações crescentes de arsenato foram relatadas por Murray et al (2003) e os autores ao estudar a espécie *Chlorella vulgaris* observaram que a síntese de clorofila não foi afetada nas concentrações de 10, 100 e 1000 mg.L<sup>-1</sup> de arsenato.

Para o As (III) os resultados encontrados são similares aos de Wang *et al.*, (2012). Estes pesquisadores ao estudar a atividade fotossintética e o crescimento de *Microcystis aeruginosa* expostas à concentrações crescentes de arsenito perceberam uma redução na produção de clorofila *a* quando expostas à concentrações crescentes de arsenito.

#### **4.3 Bioacumulação de arsênio pela cianobactéria *Microcystis novacekii***

Observou-se que nas concentrações mais baixas de As(V) (0,05; 0,5; 5 e 50 mg.L<sup>-1</sup>) as taxas de crescimento de *M. novacekii* se mantiveram constantes demonstrando que a presença do metalóide não afetou significativamente ( $p > 0.05$ ) o crescimento da espécie. O mesmo foi observado na segunda série de experimentos até a concentração de 2916 mg.L<sup>-1</sup> (96 horas) e 1620 mg.L<sup>-1</sup> (192 horas).

Os resultados referentes a exposição ao As(III) foram realizadas apenas nas concentrações próximas a faixa de inibição de crescimento, merecendo destaque o efeito inicial de redução da taxa de crescimento nas primeiras 96 horas, seguido por uma aparente recuperação verificada após 192 horas. Os resultados referentes à taxa de crescimento de *M. novacekii* nas diferentes concentrações de As(III e V) testadas estão relatadas na Tabela 9.

**Tabela 9. Taxa de crescimento de *Microcystis novacekii* após 96 e 192 horas de exposição (final fase log).**

	Concentração	$\mu \pm SE$ (96 horas)	$\mu \pm SE$ (192 horas)
As (V)	0.0	0.20±0.02	0.14±0.01
	0.05	0.20±0.01	0.20±0.01
	0.5	0.18±0.02	0.13±0.01
	5	0.20±0.01	0.14±0.01
	50	0.19±0.01	0.14±0.02
	500	0.18±0.02	0.14±0.01
	900	0.18±0.04	0.15±0.02
	1620	0.16±0.04	0.14±0.01
	2916	0.14±0.01	0.07±0.004*
	5250	0.09±0.01*	0.03±0.01*
	Concentração	$\mu \pm SE$ (96 horas)	$\mu \pm SE$ (192 horas)
As (III)	0.0	0.20±0.01	0.19±0.01
	14.7	0.21±0.01	0.10±0.001
	26.5	0.17±0.004*	0.20±0.003
	47.6	0.06±0.002*	0.24±0.008
	85.7	0.01±0.003*	0.15±0.01

(\*) indica diferença significativa entre o controle e os tratamentos, aceitando um nível de significância de 0,05 ( $P < 0,05$ ).

A variação apresentada na taxa de crescimento de *M. novacekii*, quando exposta ao As(III), pode ser devida a algum mecanismo adaptativo desta espécie, conferindo a essa, capacidade de reduzir a penetração do metaloide no meio intracelular, seja por mecanismos de imobilização no interior da célula ou ainda ativando o sistema de excreção. Para As(V), nas concentrações mais altas, esse comportamento não foi observado.

Os resultados dos testes de remoção de arsênio por *M. novacekii* indicaram que o processo de captação celular do metalóide é dependente do estado de oxidação do arsênio no meio. Quando este se encontra na forma de arsenito (AsIII) observa-se aumento significativo ( $p < 0,05$ ) da capacidade de remoção ao longo tempo (2, 96 e 192 horas). O mesmo foi verificado para o As(V) em altas concentrações, já para baixas concentrações de arsenato não houve remoção significativa ( $p > 0,05$ ).

A determinação das concentrações de arsênio após centrifugação das culturas no sobrenadante e no pellet (biomassa) objetivaram a comparação e validação de resultados de captação celular do arsênio. Os resultados de remoção de arsênio observadas no sobrenadante e pellet são apresentados nas tabelas 10 e 11 e figura 16.

**Tabela 10. *Microcystis novacekii* exposta à concentrações crescentes de arsênio (mg.L<sup>-1</sup>) por 2, 96 e 192 horas. Os dados referem-se a remoção de arsênio observadas no sobrenadante.**

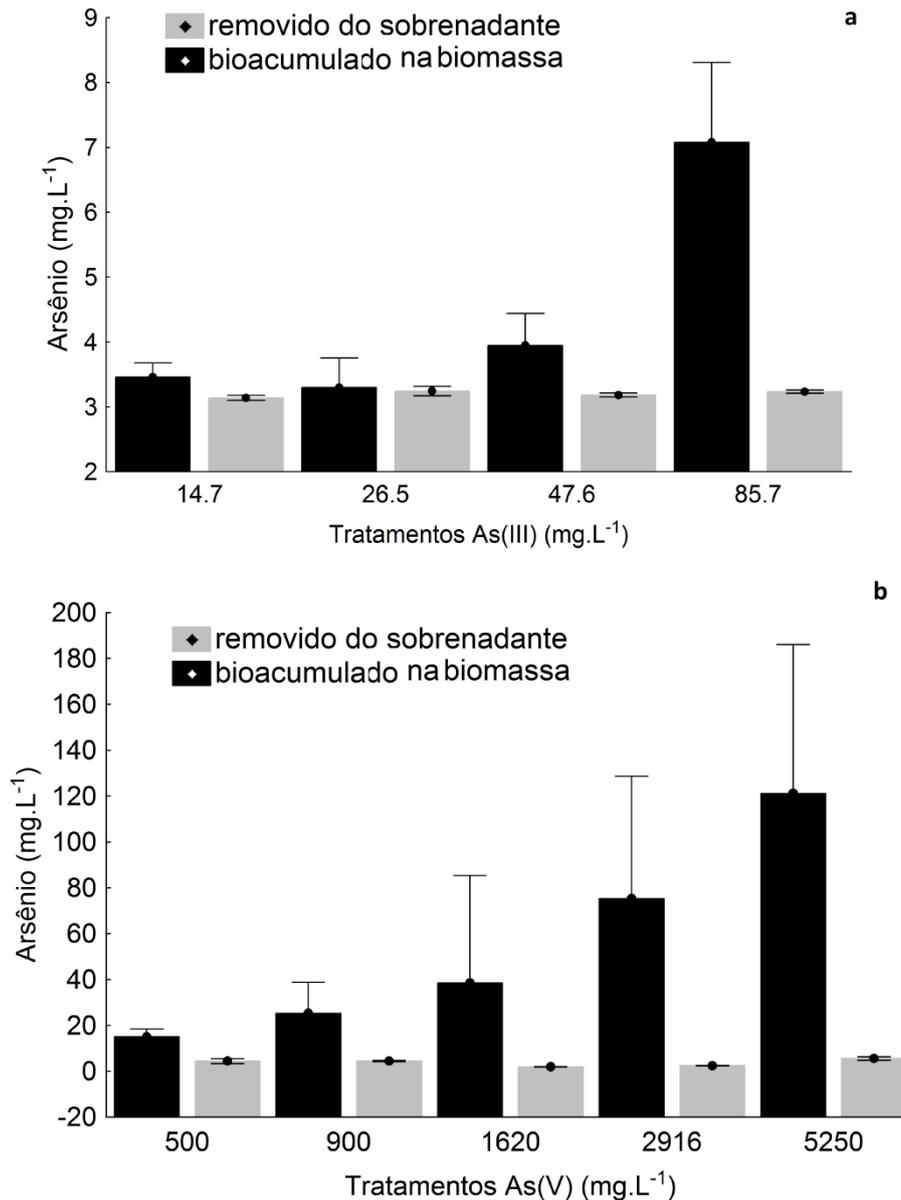
		Tratamentos (As mg.L <sup>-1</sup> )			Remoção (%)		
			2 horas	96 horas	192 horas	96 horas	192 horas
As (V)	Baixas concentrações	0.0	0.0 ± 0.00	0.0 ± 0.00	0.00 ± 0.00		
		0.05	0.07 ± 0.02	0.7 ± 0.02	0.06 ± 0.01	1.7	16.8
		0.5	0.8 ± 0.01	0.7 ± 0.01	0.8 ± 0.01	1.7	2.0
		5	8.6 ± 0.02	8.7 ± 0.25	8.5 ± 0.07	-2.7	1.2
		50	79.6 ± 7.0	79.1 ± 2.8	77.9 ± 5.3	0.6	2.2
	Altas concentrações	500	597.3 ± 10.4	585.4 ± 3.7*	582.3 ± 4.9*	2.0	2.5
		900	1038.1 ± 23.4	1012.8 ± 0.8*	1012.8 ± 0.8*	2.4	2.4
		1620	1856.5 ± 60.9	1794.7 ± 83.8*	1818.0 ± 53.5*	3.3	2.1
		2916	3386.4 ± 99.6	3350.0 ± 56.3*	3311.1 ± 55.9*	1.1	2.2
		5250	5789.9 ± 190.2	5612.2 ± 110.5*	5668.6 ± 115.2*	3.1	2.1
As (III)	Controle	0.00 ± 0.0	0.00 ± 0.0	0.00 ± 0.0			
	14.7	14.8.1 ± 0.3	12.1 ± 0.2*	11.3 ± 0.4*	18.3	23.4	
	26.5	28.4 ± 0.4	25.3 ± 0.4*	25.1 ± 0.8*	10.6	11.6	
	47.6	49.9 ± 1.0	46.7 ± 1.0*	46.0 ± 0.8*	6.5	7.9	
	85.7	105.6 ± 0.3	98.9 ± 1.2*	98.5 ± 2.1*	6.3	6.7	

Os asteriscos (\*) indicam diferença significativa entre controles (2 horas) e tratamentos (96 e 192 horas), aceitando significância de 0.05 (p<0.05). Tratamento estatístico: ANOVA fatorial com medidas repetidas.

**Tabela 11. Distribuição final de arsênio após 192 horas de experimento.**

Tratamentos (mg.L <sup>-1</sup> )		Biomassa (mgAs.L <sup>-1</sup> )	Biomassa (mgAs.g <sup>-1</sup> )	Intracelular (%)	Extracelular (%)	Não encontrado* (%)	Total (%)	
As (V)	Baixas concentrações	<b>0.0</b>	0.0 ± 0.00	0.0 ± 0.0	-	-	-	
		<b>0.05</b>	0.01 ± 0.01	0.036 ± 0.02	12.1	83.8	4.0	100
		<b>0.5</b>	0.02 ± 0.01	0.064 ± 0.02	2.0	98.0	-0.1	100
		<b>5</b>	0.05 ± 0.01	0.18 ± 0.03	0.5	98.8	0.7	100
		<b>50</b>	0.6 ± 0.23	2.39 ± 0.9	0.8	97.8	1.5	100
	Altas concentrações	<b>500</b>	4.46 ± 1.8	17.8 ± 7.3	0.7	97.5	1.8	100
		<b>900</b>	4.47 ± 0.5	17.9 ± 1.8	0.4	97.6	2.0	100
		<b>1620</b>	1.92 ± 0.1	7.7 ± 0.5	0.1	97.9	2.0	100
		<b>2916</b>	2.44 ± 0.1	9.7 ± 0.5	0.1	97.8	2.2	100
		<b>5250</b>	6.63 ± 1.26	22.5 ± 5.0	0.1	97.9	2.0	100
As (III)	<b>Controle</b>		0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	-	-	-	
	<b>14.7</b>		3.14 ± 0.06	12.6 ± 0.2	21.2	76.6	2.2	100
	<b>26.5</b>		3.25 ± 0.1	13.0 ± 0.5	11.4	88.4	0.2	100
	<b>47.6</b>		3.18 ± 0.06	12.7 ± 0.2	6.4	92.1	1.5	100
	<b>85.7</b>		3.24 ± 0.06	12.9 ± 0.2	3.1	93.3	3.6	100

\* Perdas de arsênio no experimento foram atribuídas à fatores como a lavagem das células durante a centrifugação ou adesão do arsênio à vidraria.



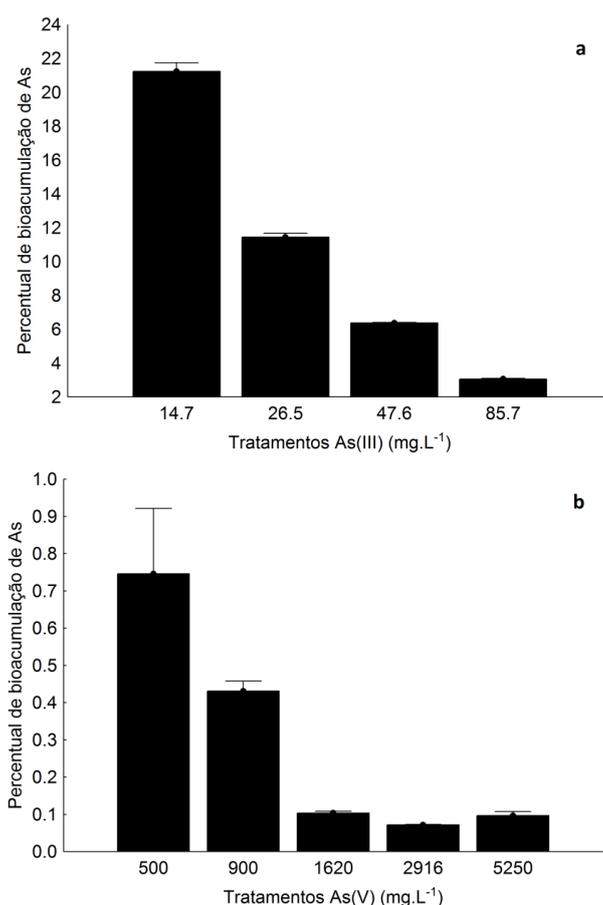
**Figura 16: Remoção e bioacumulação de arsênio em mg.L<sup>-1</sup> por *Microcystis novacekii*. Em *a* resultados As(III). Em *b* resultados As(V) na série de concentrações mais altas.**

Considerando que a biomassa inicial de *M. novacekii* ( $10^6 \text{ cel.ml}^{-1}$ ) foi a mesma para todos os tratamentos, pode-se afirmar que a retenção de arsênio apresentou-se de forma constante, em torno de 12 mg de As(III) por grama de biomassa ( $12.8 \pm 0.15 \text{ mgAs.g}^{-1}$ ). Esse resultado foi observado após 192 horas de exposição. Os resultados sugerem haver um processo de saturação na captação intracelular de arsênio. Essa saturação ocorreu em todas as concentrações indicando que mesmo na menor concentração testada ( $14.7 \text{ mg.L}^{-1}$ ) o sistema celular já estava saturado. Uma possível

explicação seria a saturação do transporte transmembrana. Embora os resultados sugiram cinética de saturação, ressalta-se que apenas concentrações na faixa de toxicidade foram avaliadas. Deste modo, não se pode afirmar a relação entre bioacumulação e concentração de arsênio no meio.

Os resultados observados nos testes de bioacumulação de As(V) por *M. novacekii* indicaram uma acumulação do metaloide ao longo do tempo de forma muito limitada. Esse resultado faz supor que os mecanismos de toxicidade do arsenato ocorram principalmente no ambiente extracelular. Uma possível perturbação na captação de nutrientes celulares como o fosfato poderia explicar a inibição do crescimento. Contudo esse aspecto foge ao escopo desse trabalho e não pôde ser esclarecido.

As Figuras 17a e 17b mostram a bioacumulação de As(III) e As(V) por *M. novacekii* e permitem comparar o comportamento da cianobactéria frente ao metaloide, nos dois estados de oxidação.



**Figura 17. Avaliação da possível bioacumulação de As(III) e As(V) por *M. novacekii*. Percentual de bioacumulação de arsênio em relação à concentração inicial e final. Em a resultados As (III); em b resultados As (V).**

O arsênio existe em diferentes formas químicas e estados de oxidação o que influencia a sua biodisponibilidade e toxicidade (AGUSA *et al.*, 2008). A toxicidade do arsênio nos seus diferentes estados de oxidação é consequência dos seus mecanismos de ação intracelular dessas espécies químicas. O As(III) pode se ligar a grupos sulfidrilas (-SH) e grupos de proteínas, enquanto o As (V) interfere em reações de fosforilação (GHOSH *et al.*, 2007). Contudo, segundo Tseng (2004), as concentrações intracelulares de arsênio necessárias para estas reações, são elevadas e não fisiologicamente relevantes, o que está em acordo com a observação de que a inibição do crescimento não correlaciona com as concentrações intracelulares.

Embora alguns estudos com algas e cianobactérias tenham relatado sua alta capacidade de acumular arsênio (YAMAOKA *et al.*, 1996; HANSEN *et al.*, 2005; SUHENDRAYATNA *et al.*, 1998; ARRIBAS, 2009), esse não foi o resultado observado com a *M. novacekii*. Possíveis variações morfológicas e bioquímicas, diferentes entre espécies, podem justificar os resultados encontrados.

Pode-se postular ainda que em função do pKa das espécies de arsenito (pKa 9.3) e arsenato (pKa 2.3), a primeira se encontra na forma molecular (neutra) no meio de cultura o que permitiria sua transposição entre mucilagem e parede celular penetrando no meio intracelular e possibilitando a biocumulação de arsênio. O arsenato ionizado, no pH do meio de cultivo, não conseguiria essa transposição o que resultaria numa tolerância superior da cianobactéria a altas concentrações de arsenato.

O papel da bainha de mucilagem das cianobactérias é comumente citado na literatura como um promissor processo biotecnológico para remoção de metais pesados em soluções aquosas (DE PHILIPPIS *et al.*, 2001, 2007; DE PHILIPPIS & MICHELETTI, 2009; DE PHILIPPIS & VINCENZINI, 2003; LI *et al.*, 2001). Isso se deve a presença nessa mucilagem de polissacarídeos ricos em grupamentos polares carregados negativamente. Em vista disto, este estudo propôs avaliar o papel da mucilagem na interação com sais de arsênio.

Não se observou a retenção de As(III) na bainha de mucilagem de *Microcystis novacekii*. Aparentemente, no pH do estudo e em altas concentrações essa camada não funciona como uma barreira para a captação do arsenito. Após 192 horas de exposição de *M. novacekii* à concentração de 14.7 mg.L<sup>-1</sup> de As(III), pode-se perceber que somente 0.7% do arsênio disponível foi acumulado na bainha de mucilagem, enquanto c. 3.03±0.02 mg.L<sup>-1</sup> (23.4%) foi acumulado intracelularmente na célula. É importante

ressaltar que parte da camada de mucilagem de *M. novacekii* pode ter se desprendido durante a centrifugação e, portanto não ter sido quantificada.

A quantidade de arsênio bioacumulado pode ser devido a interação entre os biopolímeros de natureza aniônica da bainha de mucilagem com os grupamentos hidroxilas do As(III), sendo a bainha de mucilagem uma percussora na bioacumulação de arsênio em *M. novacekii* (DE PHILIPPIS *et al.*, 2001; NAGASE *et al.*, 2005; PRADHAN *et al.*, 2007).

## CONCLUSÕES

Os resultados deste estudo permitiram as seguintes conclusões:

- a) A resistência da cianobactéria ao arsênio nas formas trivalente (AsIII) e pentavalente (AsV) sugere que a espécie *Microcystis novacekii* possui mecanismos de defesa a essas formas químicas, o que provavelmente explica sua capacidade de crescer em ambientes altamente impactados por arsênio.
- b) A forma trivalente do arsênio mostrou toxicidade para *M. novacekii* c. 60 vezes mais acentuada do que a forma oxidada (AsV).
- c) *M. novacekii* mostrou capacidade de acumular arsênio na forma trivalente, sendo que em todos os tratamentos com esta espécie química (14,7; 26,5; 47,6; 85,7 mg.L<sup>-1</sup>), a cianobactéria acumulou c. 12 mgAs.g<sup>-1</sup> de biomassa. Estes resultados possivelmente indicam processo de saturação na captação intracelular de arsênio e mecanismos de transporte diferenciados para a forma trivalente. Quanto ao arsênio na forma oxidada a cianobactéria não apresentou capacidade significativa de bioacumulação.
- d) Os testes que avaliaram o papel da bainha de mucilagem demonstraram que a camada capsular de *M. novacekii* não parece ter papel acumulador de arsênio, porém é importante considerar que parte significativa dos exopolissacarídeos da mucilagem podem ter sido perdidos durante o processo de centrifugação e essa conclusão refere-se apenas à fração de mucilagem avaliada.
- e) Considerando as características físico-químicas descritas para os exopolissacarídeos, acredita-se que a natureza polar da bainha de mucilagem, com grande parte dos grupamentos químicos ionizados, dificulta a aproximação de ânions como o arsenato e com isso torna-se responsável pela alta resistência da cianobactéria a esta espécie química.
- f) Pode-se postular ainda que em função do Pka das espécies de arsenito (pka 9.3) e arsenato (pka 2.3), a primeira se encontra na forma molecular (neutra) no meio

de cultura o que permitiria sua transposição entre mucilagem e parede celular penetrando no meio intracelular e possibilitando a biocumulação de arsênio. O arsenato ionizado, no pH do meio de cultivo, não conseguiria essa transposição o que resultaria numa tolerância superior da cianobactéria a altas concentrações de arsenato.

- g)** Essa cianobactéria apresenta rápido crescimento, fácil adaptação ambiental e resistência acentuada ao arsênio. O que justifica a continuação dos estudos no sentido de entender a dinâmica do arsênio no meio natural e seu possível impacto sobre o fitoplâncton, além do papel da mucilagem na interação com os compostos arsenicais.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AFONSO, J. C. **Gerenciamento de Resíduos Laboratoriais: Recuperação de Elementos e Preparo Para Descarte Final**, Revista Química Nova, São Paulo, n.4, v. 26, p.602-612, 2003.

AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCES & DISEASE REGISTRY. **Priority list of hazardous substances**. 2005. Disponível em: <http://www.atsdr.cdc.gov/substances/toxsubstance.asp?toxid=3>. Acesso em: 13 set. 2012.

AGUSA, K.; TAKAGI, R.; KUBOTA, Y.; ANAN, H.; IWATA, S.; TANABE. **Specific accumulation of arsenic compounds in green turtles (*Chelonia mydas*) and hawksbill turtles (*Eretmochelys imbricata*) from Ishigaki Island, Japan**. Environ. Pollut., 153 pp. 127–136, 2008.

AKSU, Z., ACIKEL, U., AND KUTSAL, T. **Investigation of simultaneous biosorption of copper (II) and chromium (VI) on dried *Chlorella vulgaris* from binary metal mixtures: application of multicomponent adsorption isotherms**. Sep. Sci. Technol. 34: 501– 524, 1999.

AKTER, K.F.; OWENS, G.; DAVEY, D.E.; NAIDU, R. **Arsenic speciation and toxicity in biological systems**. Rev. Environ. Contam. Toxicol., 184, pp. 97–149, 2005.

ANDERSON, R.K., M. THOMPSON AND E. CULBARD. Selective reduction of arsenic species by continuous hydride generation. Analyst. 111. 1143-1152, 1986.

ANDREAE, M. O. **Distribution and speciation of arsenic in natural waters and some marine algae**. Deep Sea Res. 25, 391- 402. 1978.

ARAGÃO, N. K. C. V. **Taxonomia, distribuição e quantificação de populações de cianobactérias em reservatórios do estado de Pernambuco (nordeste do Brasil)** Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Botânica (PPGB), da Universidade Federal Rural de Pernambuco. 2011.

ASTDR, **Toxicological Profile for Arsenic** . U.S. Department of Health and Human Services. Agency for Toxic Substances and Disease Registry, Atlanta, USA, 2000.

ARRIBA, D. M. A. **Tratamento de águas contaminadas com arsênio por adsorção em algas**. Tese de Mestrado. Departamento de Engenharia Química. Universidade do porto. 2009.

BARRA, C. M. **Especiação de arsênio em amostras ambientais por duas técnicas: espectrometria de fluorescência atômica e voltametria de redissolução catódica**. Dissertação (Doutorado em Geociências)-Departamento de Geoquímica. Universidade Federal Fluminense. Niterói, RJ, 1999.

BARRA, C. M.; SANTELLI, R. E.; ABRÃO, J. J.; DE LA GUARDIA, M. **Especiação de arsênio - uma revisão.** QUÍMICA NOVA, 23(1), 2000.

BERGES, J. A., CHARLEBOIS, D. O., MAUZERALL, D. C. & FALKOWSKI, P. G. **Differential effects of nitrogen limitation on photosynthetic efficiency of photosystems I and II in microalgae.** *Plant Physiol.* 110: 689-696. 1996.

BHATTACHARYA P. & PAL R. **Response of cyanobacteria to arsenic toxicity.** *Journal of Applied Phycology.* 23: 293-299, 2011.

BICUDO, C. E. M. & MENEZES, M. **Cyanophyceae/Cyanobacteria.** In: *Gêneros de algas de águas continentais do Brasil.* Rima Ed. 473pp, 2006.

BITTENCOURT-OLIVEIRA, M. C. **Detection of potentially microcystin producing cyanobacteria in Brazilian reservoirs with a *mcyB* molecular marker.** *Harmful Algae*, v. 2, p. 51-60. 2003.

BITTENCOURT-OLIVEIRA, M. C.; MOURA A. N.; GOUVÊA-BARROS, S.; PINTO, E. **HIP1 DNA fingerprinting in *Microcystis panniformis* (Chroococcales, Cyanobacteria).** *Phycologia*, v. 46, p. 3-9. 2007.

BOLHÀR-NORDENKAMPF, H. R., LONG, S. P., BAKER, N. R., ÖQUIST, G., SCHREIBER, E. G. & LECHNER, E. G. **Chlorophyll fluorescence as a probe of the photosynthetic competence of leaves in the field: a review of current instrumentation.** *Functional Ecology.* 3: 497-514. 1989.

BORBA, R. P., FIGUEIREDO, B. R., MATSCHULLAT, J. **Geochemical distribution of arsenic in waters, sediments and weathered gold mineralized rocks from Iron Quadrangle, Brazil.** *Environmental Geology*, 4:39-52, 2003.

BORBA, R. P.; FIGUEIREDO, B. R. & CAVALCANTI, J. A.. **Arsênio na água subterrânea em Ouro Preto e Mariana, Quadrilátero Ferrífero (MG).** *Rem: Revista Escola de Minas* [online]. vol.57, n.1, pp. 45-51, 2004a.

BORBA, R. P., FIGUEIREDO, B. R. **A influência das condições geoquímicas na oxidação da arsenopirita e na mobilidade do arsênio em ambientes superficiais.** *Revista Brasileira de Geociências*, 34(4): 489-500, 2004b.

BRASIL, Portaria No. 2914/2011, do Ministério da Saúde. **Dispõe sobre os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade.** *Diário Oficial da União*, Brasília, nº 239, Seção 1, pág. 39. 14 de dezembro de 2011.

BRASIL, Portaria No. 518/2004, do Ministério da Saúde. **Estabelece os procedimentos e responsabilidades relativos ao controle e vigência de qualidade da**

**água para consumo humano e seu padrão de potabilidade.** Diário Oficial da União, Brasília, 13 de março de 2004.

BURGUERA, M. & BURGUERA, J.L.J. **Flow injection-electrothermal atomic absorption spectrometry for arsenic speciation using Fleitmann reaction.** Journal of Analytical Atomic Spectrometry, 8:229-233, 1993.

BURGUERA, M.; BURGUERA, J. L.; BRUNETTO, M. R.; DE LA GUARDIA, M.; SALVADOR, A. **Flow-injections Atomic Spectrometric determinations of inorganic Arsenic(III) and Arsenic(V) species by use of an aluminum-column arsine generator and cold-trapping arsine collection.** Analytica Chimica Acta. 261, 105, 1991

BYRON W. R., BIERBOER G. W., BROUWER J. B. & HANSEN, W. H. **Pathologic changes in rats and dogs from two-year feeding of sodium arsenite or sodium, arsenate.** Toxicology and applied pharmacology, 10, 132-147, 1967.

CAMILIOS NETO, D.; PINOTTI, M. H. P. **Exopolissacarídeos de Cianobactérias: Cyanobacterial Exopolysaccharides.** Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas, Londrina, v. 25, n. 1, p. 43-52, jan./jun. 2004.

CASTRO JR, C.G, GREGIANIN, L.J.; DI LEONE, L.P.; CARVALHO, G.P.; BRUNETTO, A.L. **Uso do trióxido de arsênico (as<sub>2</sub>o<sub>3</sub>) no tratamento da leucemia promielocítica aguda (lma-m<sub>3</sub>) recidivada.** Revista HCPA. Porto Alegre. 2002.

CHEN H; PAN, S.-S. **Bioremediation potential of spirulina: toxicity and biosorption studies of lead.** J. Zhejiang Univ. SCI, v. 6B, n. 3, p. 171-174, 2005.

CHEN, S. L., DZENG, S. R., YANG, M. H., CHIU, K. H., SHIEH, G. M., WAI, C. M. **Arsenic species in groundwaters of the blackfoot disease area, Taiwan.** Environmental Science Technology. 28:877-881, 1994.

CHOJNACKA, K.; NOWORYTA, A. **Evaluation of Spirulina sp. growth in photoautotrophic, heterotrophic and mixotrophic cultures.** Enzyme and Microbial Technology, v. 34, n. 5, p. 461-465, 2004.

CHORUS, I.; BARTRAM, J. **Toxic Cyanobacteria in water: a guide to their public health consequences, monitoring and management.** E e FN Spon, London. 416p. 1999.

CHOWDHURY, U.K., BISWAS, B.K., CHOWDHURY, T.R., SAMANTA, G., MANDAL, B.K., BASU, G.C., CHANDA, C.R., LODH, D. **Groundwater arsenic contamination in Bangladesh and West Bengal, India.** Environmental Health Perspectives. 108, 393-397, 2000.

CONAMA - CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE. **Resolução nº 357, de 17 de março de 2005**. Ministério do Meio Ambiente, 23p. 2005. Disponível em <http://www.mma.gov.br/port/conama/res/res05/res35705.pdf>. Acesso em: 13 set. 2012

CONAMA - CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE. **Resolução nº 430 de 13 de maio de 2011**. Dispõe sobre condições e padrões de lançamento de efluentes, complementa e altera a Resolução nº 357, de 17 de março de 2005, do Conselho Nacional do Meio Ambiente - CONAMA. 2011.

DAVIS, T. A.; VOLESKY, B.; VIEIRA, R. H. S. F. **Sargassum seaweed as biosorbent for heavy metals**. Water Res., v. 34, n. 17, p. 4270-4278, 2000.

DAVIS, T. A.; VOLESKY, B.; MUCCI, A. **A review of the biochemistry of heavy metal biosorption by brown algae**. Water Res., v. 37, n. 18, p. 4311-4330, 2003.

DEGOS L. **The history of acute promyelocytic leukaemia**. Br J Haematol.; 122:539-53, 2003.

DE PHILIPPIS, R.; VINCENZINI, M. **Exocellular polysaccharides from cyanobacteria and their possible applications**. FEMS Microbiology Reviews, Amsterdam, v.22, p.151-175, 1998.

DE PHILIPPIS R.; SILI C.; PAPERI R.; VINCENZINI, M. **Exopolysaccharide producing cyanobacteria and their possible exploitation: a review**. J Appl Phycol 13:293-299, 2001.

DE PHILIPPIS, R.; PAPERI, R.; SILI, C.; VINCENZINI, M. **Assessment of the metal removal capability of two capsulated cyanobacteria, Cyanospira capsulata and Nostoc PCC7936**. J Appl Phycol 15:155-161, 2003.

DE PHILIPPIS, R.; PAPERI, R.; SILI, C. **Heavy metal sorption by released polysaccharides and whole cultures of two exopolysaccharideproducing cyanobacteria**. Biodegradation 18:181-187, 2007.

DE PHILIPPIS, R.; MICHELETTI, E. **Heavy metal removal with exopolysaccharides-producing cyanobacteria**, 2009. In: Shamma NK, Hung YT, Chen JP, Wang LK (eds) Heavy metals in the environment. CRC Press, Boca Raton, pp 89-122.

DESCHAMPS, E., CIMINELLI, V. S. T., LANGE, F. T., MATSCHULLAT, J., RAUE, B., E SCHMIDT, H. **Soil and sediment geochemistry of the Iron Quadrangle, Brazil: The Case of Arsenic**. Journal of Soils and Sediments 2:216-222, 2002.

DESCHAMPS, M. E. **Avaliação da contaminação humana e ambiental por As e sua imobilização em óxidos de Fe e Mn.** Tese Doutorado. Departamento de Engenharia Metalúrgica, Universidade Federal de Minas Gerais. 139 p. 2003.

DESCHAMPS, M. E., CIMINELLI, V. S. T., WEIDLER, P. G., RAMOS, A. Y. **Arsenic sorption onto soils enriched in Mn and Fe minerals.** *Clays and Clay Minerals*, 51 (2):197-204, 2003.

DOMITROVIC, Y. Z.; FORASTIER, M. E. **Biodiversidad de Cyanophyceae (Cyanobacteria) y especies toxigénicas del litoral fluvial argentino.** *Insugeo, Miscelánea*, v. 14, p. 213-228. 2005.

DROUET, F. **The Brazilian Myxophyceae.** *Jornal Amazonense de Botânica*, Manaus, v. 24, p. 698-708. 1937.

DROUET, F. **The Brazilian Myxophyceae.** *Jornal Amazonense de Botânica*, Manaus, v. 24, p. 657-666. 1938.

DUKER, A. A., CARRANZA, E. J. M.; HALE, M. **Applied geochemistry and health.** *Environmental International*. 31:631-641, 2005.

EHRlich, H. L. **Bacterial oxidation of As(III) compounds**, p. 313-329, 2002. *In* W. T. Frankenberger, Jr. (ed.), *Environmental chemistry of arsenic*. Marcel Dekker Inc., New York, N.Y.

ELEUTERIO, L. **Diagnóstico da situação ambiental da cabeceira da bacia do rio Doce, no âmbito das contaminações por metais pesados em sedimentos de fundo.** Depto. de Geologia, Escola de Minas, Universidade Federal de Ouro Preto, Dissertação de mestrado. 163p., 1997.

EL-SHEEKH, M.M.; EL-SHOUNY, W.A.; OSMAN, M.F.H.; EL-GAMMAL, W.E. **Growth and heavy metals removal affinity of Nostoc muscorum and Anabaena subcylindrica in sewage and industrial wastewater effluent.** *Environ Toxicol Pharmacol* 19:357– 365, 2005.

EPA; **Technologies and costs for removal of arsenic from drinking water**, US Environmental Protection Agency: Washington, D.C., 2000.

EUROPEAN COMMISSION DIRECTIVE. **98/83/EC, related with drinking water quality intended for human consumption.** European commission Directive Brussels, Belgium, 1998.

FAGUNDES, T.; BACHMANN, A.W.; TOMAZ, H. S. O.; RODRIGUES, C. **A. Adsorção de arsênio(V) pela quitosana ferro - III reticulada.** *Quím. Nova* [online]. Vol.31, n.6, pp. 1305-1309. 2008,

- FARGOSOVÁ A. **Comparative toxicity of five metals on various biological subjects.** Bull Environ Contam Toxicol 53:317– 324. 1994.
- FIORAVANTE, I. A.; BARBOSA, F. A. R.; AUGUSTI, R. & MAGALHÃES, S. M. S. **Removal of methyl parathion by cyanobacteria *Microcystis novacekii* under culture conditions .** Journal of Environmental Monitoring, Issue 6, 2010.
- FOGG, G. E. & THAKE. **Algae cultures and phytoplankton ecology.** 3rd edition. The Univessity of Wisconsin Press, Ltd., London, 269p. 1987.
- GARBISU, C.; HALL, D.O. **Removal of phosphate by foam immobilised *Phormidium laminosum* in batch and continuous flow bioreactor.** J Chem Biotechnol 57:181–189, 1993.
- GARMAN, G. D.; PILLAI, M. C.; CHERR, G.N. **Inhibition of cellular events during early algal gametophyte development: effects of select metals and an aqueous petroleum waste.** Aquat Toxicol 28:127–144. 1994.
- GHOSH, D.; DATTA, S.; BHATTACHARYA, S.; MAZUMDER, S. **Long-term exposure to arsenic affects head kidney and impairs humoral immune responses of *Clarias batrachus*.** Aquat. Toxicol., 81, pp. 79–89, 2007.
- GOMES, C. Q.; FRANCO, M. W.; SOUZA, E. A. & AGUIAR, R. **Absorção e toxicidade do arsênio em *Geitlerinema* UFV-E01 (Cyanobacteria) e *Stigeoclonium* UFV-02 (Chlorophyta).** Revista Brasileira de Biociências, Porto Alegre, v. 5, supl. 2, p. 1125-1127, jul. 2007.
- GONG, R. ;DING, Y.; LIU, H.; CHEN, Q.; LIU, Z. **Lead biosorption and desorption by intact and pretreated *Spirulina maxima* biomass.** Chemosphere 58:125–130, 2005.
- GONTIJO, Bernardo & BITTENCOURT, Flávia. **Arsênio: uma revisão histórica.** An. Bras. Dermatol. [online]. 2005, vol.80, n.1, pp. 91-95.
- GORBY, M.S. **Arsenic in human medicine.** In: Niriagu, J.O. (Ed), Arsenic in the Environment, Part II: Human health and ecosystems, New York, John Willey e Sons,INC., p.1-16, 1994.
- GORHAM, P.R.; MCLACHLAN, J.; HAMMER, U.T. & KIM, W.K **Isolation and culture of toxic strains of *Anabaena flos-aquae* (Lyngb.) de Breb.** Verh Int Verein Theor Angew Limnol 15:796–804, 1964.
- GRIMALT, J. O.; FERRER, M.; E MACPHERSON, E. **The mine tailing accident I Aznalcollar.** The Science of the Total Environment 242:3-11, 1999.

HANSEN, H. K.; ROJO, A.; OYARZUN, C.; OTTOSEN, L.; RIBEIRO, A.; MATEUS, E. **Biosorption of Arsenic by *Lessonia Nigrescens* in wastewater from Copper Smelting.** Minerals Engineering, 19, 486-490, 2005

HANSEN, H. K.; RIBEIRO, A. B.; MATEUS, E. P. **Biosorption of Arsenic (V) with *Lessonia nigrescens*.** Minerals Engineering, 19: 486-490, 2006.

HINDÁK, F. **Three planktonic cyanophytes producing waters blooms in Western Slovakia.** Czech Phycology, Olomouc, v. 6, p. 59-67, 2006.

HOPENHAYN-RICH, C., BIGGS, M. L., KALMAN, D. A., MOORE, L. E., SMITH, A. H. **Arsenic methylation patterns before and after change from high to lower arsenic concentrations in drinking water.** Environmental Health Perspectives, 104:1200-1207, 1996.

HOWARD, A. G. & HUNT, L. E. **Coupled Photooxidation-Hydride AAS Detector for the HPLC of Arsenic Compounds.** Journal Analytical Chemistry. **65**, 2995. 1993.

JAIN, C. K., E ALI, I. **Arsenic: Occurrence, toxicity and speciation techniques.** Water Research 34:4304-4312. 2000.

JUREWICZ S, BUIKEMA AL. **Effects of arsenate on algae, *Daphnia*, and mosquito fish.** VA J Sci 31:124.1980.

KAISE, T.; FUJIWARA, S.; TSUZUKI, M.; SAKURAI, T.; SAITOH, T.; & MASTUBARA, C. **Accumulation of arsenic in a unicellular alga *Chlamydomonas reinhardtii*.** Applied Organometallic Chemistry, 13, 107–111, 1999.

KALLE TRUUS , ANU VIITAK; MERIKE VAHER; URMAS MUINASMAA; KEDDY PAASRAND; RANDO TUVIKENE AND TUULI LEVANDI. **Comparative determination of microelements in Baltic seawater and brown algae samples by atomic absorption spectrometric and inductively coupled plasma methods.** Proc. Estonian Academy of Sciences Chemistry 56, 3, 122–133, 2007.

KNAUER, A. K.; BEHRAB, R.; HEMONDA, H. **Toxicity of inorganic and methylated arsenic to algal communities from lakes along an arsenic contamination gradient.** Aquatic Toxicology 46, 221–230, 1999.

KOMÁREK, J. & KAMÁRKOVÁ, J. **Review of the European *Microcystis* morphospecies (Cyanoprokariotes) from nature.** Czech Phycology, v.2, pp. 1-24, 2002.

KRASSKE, G. **Zur Kieselalgenflora Brasiliens, 1: Beoerkenswerte und new formen aus açudas nordest-Brasiliens.** Archives of Hydrobiology, v. 35, n. 4, p. 552-562. 1939.

KRASSKE, G. Zur **Kieselalgenflora Brasiliens, 1: Die diatomeenflora der açudas Nordest Brasiliens**. Archives of Hydrobiology, v. 44, n. 4, p. 639-653. 1951.

KRATOCHVIL, D.; VOLESKY, B. **Advances in biosorption of heavy metals**. Trends in Biotechnology. v. 16, N. 7, p. 291-300, 1998.

LE, X. C.; MA, M. **Speciation of arsenic by using ion-pair chromatography with atomic spectrometry and mass spectrometry detection**. J. Chromatogr. A 764: 55-64, 1997.

LEE, R. E. **Phycology**. 2nd e.d. Cambridge: Cambridge University Press, 1989. 645p.

LEIST, M.; CASEY, R.J.; CARIDI, D. **The management of arsenic wastes: problems and prospects**. Journal of Hazardous Materials. B76: 125-138, 2000.

LEVY J. L., STAUBER J. L., ADAMS M. S., MAHER W. A., KIRBY J. K. AND JOLLEY D. F. **Toxicity, biotransformation, and mode of action of arsenic in two freshwater microalgae (Chlorella sp. and Monoraphidium arcuatum)**. Environmental Toxicology and Chemistry, Vol. 24, No. 10, pp. 2630–2639, 2005.

LI, R. H; DEBELLA, J.; CARMICHAEL, W. W. **Isolates identifiable as *Athrospira maxima* and *Athrospira fusiformis* (Oscillatoriales, Cyanobacteria) appear identical on the basis of a morphological study in culture and 16S rRNA sequences**. Phycologia 40:367–371, 2001.

Li, Y. & Li, D. **Competition between toxic *Microcystis aeruginosa* and nontoxic *Microcystis wesenbergii* with *Anabaena PCC7120***. Journal Applied Phycology 24:69–7, 2012.

MA, J. **Differential sensitivity of three Cyanobacterial and five green algal species to organotins and pyrethroids pesticides**. Science of Total Environment, v.341, p.109-117, 2004.

MA, J.; LU, N.; QIN, W.; XU, R.; WANG, Y.; CHEN, X. **Differential responses of eight cyanobacterial and green algal species to carbamate insecticides**. Ecotoxicology and Environmental Safety. v.63, p.268–274, 2006.

MA, J.; WANG, P.; HUANG, C.; LU, N.; QIN, W.; WANG, Y. **Toxicity of organophosphorous Inseticides to three Cyanobacterial and five green algal species**. Archives of Environmental Contamination and Toxicology. v.75, p.490-496, 2005.

MAEDA S, WADA H, KUMEDA K, ONOUE M, OHKI A, HIGASHI S, TAKESHITA T. **Methylation of inorganic arsenic by arsenic-tolerant freshwater algae**. Appl Organomet Chem 1:465–472. 2004.

- MANDAI, B. K. & SUSUKI, K.T. **Arsenic round the world: a revision.** Talanta 58: 201-235. 2002.
- MANDAL, S. M.; MONDAL, K. C.; DEY, S.; PATI, B.R. **Arsenic biosorption by mucilaginous seeds of *Hyptis suaveolens* (L.) Poit.** Journal of Scientific & Industrial Research Vol. 66, July, pp. 577-58, 2007.
- MATHEICKAL, J. T.; YU, Q. **Biosorption of lead(II) from aqueous solutions by *Phellinus badius*.** Mineralogy Engineering, v. 10, n. 9, p. 947-957, 1997.
- MATSHULLAT, J. **Arsenic in the geosphere - a review.** Science Total Environmental 249:297–312. 2000.
- MATSCHULLAT, J., BORBA, R. P., DESCHAMPS, E., FIGUEIREDO, B. R., GABRIO, T., E SCHEWENK, M. Human and environmental contamination in the Iron Quadrangle, Brazil. Applied Geochemistry 15:193-202, 2000.
- MAXWELL, K. & JOHNSON, G. N. **Chlorophyll fluorescence – a practical guide.** Journal of Experimental Botany. 51: 659-668. 2000.
- MEEKS J.C. & CASTENHOZ R. W. **Growth and photosynthesis in the extreme thermophile, *Synechococcus lividus* (Cyanophyta).** Arch. Microbiol. 78, 25-45, 1971.
- MEHARG, A. A., E HARTLEY-WHITAKER, J. **Arsenic uptake and metabolism in arsenic resistant and nonresistant plant species.** New Phytologist 154:29-43. 2002.
- MEHTA, S.K; GAUR, J.P. **Use of algae for removing heavy metal ions from wastewater: progress and prospects.** Crit Rev Biotechnol 25:113–152, 2005.
- MENDES, G.; BELLATO, C. R.; MARQUES NETO, J. O. **Fotocatálise heterogênea com TiO<sub>2</sub> para oxidação de arsênio e sua remoção de águas por coprecipitação com sulfato férrico.** Química. Nova [online]. vol.32, n.6, pp. 1471-1476, 2009.
- MUKHOPADHYAY, R.; SHI, J.; ROSEN, B. P. **Purification and characterization of Acr2p, the *Saccharomyces cerevisiae* arsenate reductase.** Journal of Biological Chemistry, v. 275, n. 28, p. 21149- 21157, 2000.
- MURRAY A. L., RAAB A., MARR I. L AND FELDMANN J. **Biotransformation of arsenate to arsenosugars by *Chlorella vulgaris*.** Applied Organometallic Chemistry Appl. Organometal. Chem.; 17: 669–674, 2003.
- NAGASE H, INTORN D, ODA A, NISHIMURA J, KAJIWARA Y, PARK MO, HIRATA K, MIYAMOTO K. **Improvement of selective removal of heavy metals in cyanobacteria by NaOH treatment.** J Bioscience Bioeng 99:372–377, 2005.

NHMCR, AUSTRALIAN DRINKING WATER GUIDELINES. **National Health and Medical Council, Agriculture and Resource Management Council of Australia and New Zeland, Commonwealth of Australia.** PF S93, 1996.

NICKSON, R., MACARTHUR, J., BURGESS, W., AHMED, K. M., RAVENSCROF, P., RAHMAN, M. **Arsenic poisoning in Bangladesh groundwater.** Nature (London). 395:338, 1998.

NRC (NATIONAL RESEARCH COUNCIL). **Arsenic in drinking water.** Washington, DC. National Academic Press, 310p. 1999.

OCHSENKÜHN-PETROPULU, M.; VARSAMIS, J; PARISSAKIS, G. **Speciation of arsenobetaine in marine organisms using a selective leaching/digestion procedure and hydride generation atomic absorption spectrometry.** Analytica Chimica Acta, Volume 337, issue 3, p. 323-327, 1997

OECD GUIDELINE 201. **Freshwater alga and cyanobacteria, growth inhibition test.** Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris. 2006.

OTERO, A.; VINCENZINI, M. **Extracellular polysaccharide synthesis by *Nostoc* strains as affected by N source and light intensity.** Journal of Biotechnology, Amsterdam, v.102, p.143-153, 2003.

OTSUKA, S.; SUDA, S.; LI, R.; MATSUMOTO, S. AND WATANABE, M. M. **Morphological variability of colonies of *Microcystis* morphospecies in culture.** The journal of general and applied microbiology. 46, 39–50, 2000.

PARKER, D. L.; SCHRAM, B. R.; PLUDE, J. L.; MOORE, R. E. **Effect of metal cations on the viscosity of a pectin-like capsular polysaccharide from the cyanobacterium *Microcystis flosaquae* C3-40.** Appl Environ Microbiol 62:1208–1213, 1996.

PARKER, D. L.; MIHALICK, J. E.; PLUDE, J. L.; PLUDE, M. J.; CLARK, T. P.; EGAN, L.; FLOM, J. J.; RAI, L. C.; KUMAR, H. D. **Sorption of metals by extracellular polymers from the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* f. *flosaquae* strain C3-40.** J Appl Phycol 12:219–224, 2000.

PARRA R.R, ROESER H.M.P., LEITE M.G.P., NALINI JR. H.A., GUIMARÃES A.T.A., PEREIRA J.C., FRIESE K. **Influência antrópica na geoquímica de água e sedimentos do rio conceição, quadrilátero ferrífero, minas Gerais – Brasil.** Geochimica brasiliensis, 21(1) 036 – 049, 2007.

PEREIRA, S.; ZILLE, A.; MICHELETTI, E.; MORADAS-FERREIRA, P.; DE PHILIPPIS, R.; TAMAGNINI, P. **Complexity of cyanobacterial exopolysaccharides: composition, structures, inducing factors and putative genes involved in their biosynthesis and assembly.** FEMS Microbiol Rev 33:917–941, 2009.

- PETRICK J S, AYALA-FIERRO F, CULLEN W R, CARTER D. E, AND APOSHIAN, H. V. **Monomethyl arsonous Acid (MMAIII) Is More Toxic Than Arsenite in Chang Human Hepatocytes.** *Toxicology and Applied Pharmacology* 163, 203–207, 2000.
- PIMENTEL, H.S., LENA, J.C., NALINI Jr, H.A. Studies of water quality in the Ouro Preto region, Minas Gerais, Brazil: The release of arsenic to the hydrological system. *Environmental Geology*, v.43, p.725-730, 2003.
- PINO, G. A. H. **Biossorção de Metais Pesados Utilizando Pó da Casca de Coco Verde (*Cocos nucifera*).** Dissertação. Programa de Pós- Graduação em Engenharia Metalúrgica da PUC-Rio. Rio de Janeiro, março de 2005.
- PRADHAN, S.; SINGH, S.; RAI, L. C. **Characterization of various functional groups present in the capsule of *Microcystis* and study of their role in biosorption of Fe, Ni and Cr.** *Biores Technol* 98:595–601, 2007.
- PRADO, P. F. **Remoção de óleos e graxas e arsênio de efluente industrial utilizando xisto retornado /** dissertação de mestrado. Universidade Federal do Rio de Janeiro:UFRJ/EQ, 2008.
- QUINÁIA, S. P.; ROLLEMBERG, M. DO C. E. **Selective reduction of arsenic species by hydride generation - atomic absorption spectrometry part 1 - reduction media,** *J. Braz. Chem. Soc.* 1997, 8, 349.
- RIBEIRO, R. F. L.; MAGALHÃES, S. M. S.; BARBOSA, F. A. R.; NASCENTES, C. C.; CAMPOS, I. C.; MORAES, D. C. **Evaluation of the potential of microalgae *Microcystis novacekii* in the removal of Pb<sup>2+</sup> from an aqueous médium.** *Journal of Hazardous Materials* 179, 947–953, 2010.
- RÜCKERT, G. V. & GIANI, A. **Effect of nitrate and ammonium on the growth and protein concentration of *Microcystis viridis* Lemmermann (Cyanobacteria).** *Revista Brasileira de Botânica.* V.27, n.2, p.325-331, abr.-jun., 2004.
- SAKUMA, A. M., DE CAPITANI, E. M., E TIGLEA, P. **Arsênio.** *In* Azevedo, F. A., e Chasim, A. A. D. M. *Metais: gerenciamento da toxicidade.* Atheneu, São Paulo. 554p. 2003.
- SAKUMA, A. M. **Avaliação da exposição humana ao arsênio no Alto Vale do Ribeira.** Tese de doutorado, UNICAMP, Campinas, São Paulo – SP, Brasil. 2004
- SANT’ANNA, C. L. & AZEVEDO, M.T.P. **Contribution to the knowledge of potentially toxic Cyanobacteria from Brazil.** *Nova Hedwigia*, v. 71 (3-4), pp.359-385, 2000.

- SCHREIBER, U. **In vivo chlorophyll fluorescence: assessment and analysis of photosynthesis function.** In: Larcher, W. *Physiological plant ecology: ecophysiology and stress physiology of functional groups.* Springer Ed. Berlin. 513pp. 2003.
- SEYDEL, I.S. **Distribution and circulation of arsenic through water, organisms and sediment of Lake Michigan.** Arch. Hydrobiol. 71, 17-30. 1972
- SHAHEEN, R., MAHMUD, R. AND SEN, J. **A Study on Arsenic Decontaminating Cyanobacteria of an Arsenic Affected Soil.** Journal of Soil and Nature. 1(2): 23-29. 2007.
- SHARMA, N. K.; TIWARI, S. P.; TRIPATHI, K.; ASHWANI, K.R. **Sustainability and cyanobacteria (blue-green algae): facts and challenges.** J Appl Phycol, 23:1059–1081, 2011.
- SILVA, R.H.P. **Geoquímica e impacto ambiental do arsênio no Vale do Ribeira (SP-PR): área de metalogênese.** Tese de mestrado, UNICAMP, Campinas, São Paulo – SP, Brasil, 1997.
- SILVA, W. G.P. Estudo da dinâmica química do arsênio no resíduo da Companhia Mercantil Ingá / Tese de mestrado, 63f. 2005.
- SIMONI, D. A. **Adsorção de Zn<sup>2+</sup>, Sr<sup>2+</sup> e Pb<sup>2+</sup> em fosfatos de cálcio e fase óssea inorgânica.** 2004. 86 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2004.
- STOLZ, J. F.; BASU, P.; OREMLAND, R. S. **Microbial transformation of elements: The case of arsenic and selenium.** International Microbiology, v. 5, n. 4, p. 201-207, 2002.
- SMEDLEY P.L., KINNIBURGH D.G. **A review of the source, behaviour and distribution of arsenic in natural waters.** Applied Geochemistry 17, 517–568, 2002.
- SMITH A. H., LINGAS E. O. AND RAHMAN M. **Contamination of drinking-water by arsenic in Bangladesh: a public health emergency.** Bulletin of the World Health Organization, 78 (9), 2000.
- SMITH, A. H., BIGGS, M. L., HOPENHAYN, C.; KALMAN, D. **Arsenic risk assessment [letter].** Environmental Health Perspectives. 103: 13-15, 1995.
- SINGH, N.; ASTHANA, R.K.; KAYASTHA, A.M.; PANDEY, S.; CHAUDHARY, A.K.; SINGH, S.P. **Thiol and exopolysaccharide production in a cyanobacterium under heavy metal stress.** Process Biochemistry, London, v.35, p.63-68, 1999.
- STUMMEYER J., HARAZIM B., WIPPERMANN T., **Speciation of arsenic in water samples by high-performance liquid chromatography-hydride generation-**

- atomic absorption spectrometry at trace levels using a post-column reaction system, "Fresenius" Journal Analytical Chemistry.** 344- 354, 1996.
- SUHENDRAYATNA, A., KUROIWA, O. T., & MAEDA, S. **Arsenic compounds in the freshwater green microalgae *Chlorella vulgaris* after exposure to arsenite.** Applied Organometallic Chemistry, 13, 128–129, 1999.
- SUHENDRAYATNA, B.; OHKI, A.; KUROIWA, T.; MAEDA, S. **Arsenic compounds in the freshwater green microalga *Chlorella vulgaris* after exposure to arsenite.** Applied Organometallic Chemistry. 13, 127-133, 1998.
- SUHENDRAYATNA; OHKI, AKIRA; KUROIWA, TAKAYOSHI & MAEDA, SHIGERU. **Arsenic compounds in the freshwater green microalga *Chlorella vulgaris* after exposure to arsenite,** Appl. Organometal. Chem., 13, 127-133, 1998.
- SUN, G. Arsenic contamination and arsenicosis in China. Toxicol Appl Pharmacol 198, 268–271, 2004.
- TAVARES, G. A. & BENDASSOLLI, J. A. **Implantação de um programa de gerenciamento de resíduos químicos e águas servidas nos laboratórios de ensino e pesquisa do CENA/USP.** Química Nova, São Paulo, v. 28, n. 4, p. 732-738, 2005.
- THORNTON, I. & FARAGO, M. **The geochemistry of arsenic.** In: C.O. ABERNATHY; R.L. CALDERON, W.R. CHAPPELL. (eds.) Arsenic Exposure and health effects. New York: Chapman & Hall. cap. 1, p.1-16. 1997.
- USEPA. NATIONAL PRIMARY DRINKING WATER REGULATIONS. **Arsenic and Clarifications to Compliance and New Source Contaminants Monitoring; Proposed Rule.** Federal Register, v. 65, n. 121, June 22, p.38888-38983. 2000.
- VASCONCELOS, F. M., CIMINELLI V. S. T., OLIVEIRA R. P., SILVA, R. J. **Determinação da especiação química e mobilidade do arsênio em sítios de mineração.** Geoquímica Brasileira 18 (2)115-120, 2004.
- VEGLIO, F.; BEOLCHINI, F. **Removal of metals by biosorption: a review,** Hydrometallurgy, v. 44, n. 3, p. 301-316, 1997.
- VIDOTTI, E. C.; ROLLEMBERG, M. C. E. **Algas: da economia nos ambientes aquáticos à bioremediação e à química analítica.** *Quim. Nova*, Vol. 27, No. 1, 139-145, 2004.
- VIEIRA, R. H. S. F.; VOLESKY, B. **Biosorption: a solution to pollution?** Int. Microbiol., v. 3, p. 17-24, 2000.
- VOCKE RW, SEARS KL, O'TOOLE JJ, WILDMAN RB. **Growth responses of selected freshwater algae to trace elements and scrubber ash slurry generated by coal-fired power plants.** *Water Res.* 14:141–150, 1980.

VOLESKY, B. **Biosorption and me.** *Water Res.*, v. 41, n. 18, p. 4017-4029, 2007.

VOLESKY, B. **Detoxification of metal-bearing effluents: biosorption for the next century.** *Hydrometallurgy*, v. 59, n. 2-3, p. 203-216, 2001.

WHO. **United Nations Synthesis Report on Arsenic in Drinking Water**, Geneva, World Health Organization. 2001a. Disponível em:  
[http://www.who.int/water\\_sanitation\\_health/dwq/arsenic/en/](http://www.who.int/water_sanitation_health/dwq/arsenic/en/). Acesso em: 13 set. 2012

WINDHOLZ, M., **The Merck Index**, 9<sup>o</sup> Ed, rahway, NS, Merck e Co., pp.709-711. 1976.

WOLFE-SIMON, F.; BLUM, J.S.; KULP, T. R.; GORDON, G. W.; HOEFT, S. E.; RIDGE, J. P.; STOLZ, J. F.; WEBB, S. M.; WEBER, P. K.; DAVIES, P. C. W.; ANBAR, A. D.; OREMLAND, R. S. **A Bacterium That Can Grow by Using Arsenic Instead of Phosphorus.** *Scienceexpress*. December, 2010.

YAMAOKA, Y.; TAKIMURA, O.; FUSE, H.; KAMIMURA, K. AND MURAKAMI, K. **Accumulation of Arsenic by Rhaphidophyceae *Chattonetta antiqua* (Hada) Ono.** *Applied Organometallic Chemistry*, VOL. 10, 721-726, 1996.

YEE, N.; BENNING, L.G.; PHOENIX, V.R.; FERRIS, F.G. **Characterization of metal-cyanobacteria sorption reaction: a combined macroscopic and infrared spectroscopic investigation.** *Environ Sci Technol* 38:775-782, 2004.

YUAN, M.; CARMICHAEL, W. W.; HILBORN, E. D. **Microcystin analysis in human sera and liver from human fatalities in Caruaru, Brazil** 1996. *Toxicon*, v. 48, p.627-640. 2006.

ZHOU, B.; HE, Y.; ZHANG, X.; XU, J.; LUO, Y.; WANG, Y.; FRANZBLAU, S.G.; YANG, Z.; CHAN, R. J.; LIU, Y.; ZHENG, J., ZHANG, Z.Y. **Targeting mycobacterium protein tyrosine phosphatase B for antituberculosis agents.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 107, n. 10, p. 4573-4578, 2010.