

**FERNANDO ANTÔNIO JARDIM**

**POTENCIAIS MECANISMOS DE REDUÇÃO DA  
TOXICIDADE DE MICROCISTINAS E A SUA  
UTILIZAÇÃO NO TRATAMENTO DA ÁGUA**

**ORIENTADORA: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Alessandra Giani**

TESE APRESENTADA AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA VEGETAL DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS, INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS, PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE DOUTOR EM BIOLOGIA VEGETAL.

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS / UFMG

BELO HORIZONTE

2008

Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal  
Universidade Federal de Minas Gerais

FERNANDO ANTÔNIO JARDIM

POTENCIAIS MECANISMOS DE REDUÇÃO DA TOXICIDADE DE  
MICROCISTINAS E A SUA UTILIZAÇÃO NO TRATAMENTO DA ÁGUA

Belo Horizonte  
2008

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTO DE BOTÂNICA**

**POTENCIAIS MECANISMOS DE REDUÇÃO DA TOXICIDADE DE  
MICROCISTINAS E A SUA UTILIZAÇÃO NO TRATAMENTO DA ÁGUA**

**Fernando Antônio Jardim**

**Banca Examinadora**

---

**Dra. Sandra Maria Feliciano de Oliveria Azevedo – Instituto de Biofísica Carlos  
Chagas Filho/UFRJ**

---

**Dra. Cristina Célia Silveira Brandão – Departamento de Engenharia Civil e  
Ambiental/UnB**

---

**Dra. Mônica Maria Diniz Leão. Valter Lúcio de Pádua – Departamento de  
Engenharia Sanitária e Ambiental/UFMG**

---

**Dr. Marcel Giovanni Costa França – Departamento de Botânica ICB/UFMG.**

---

**Dra. Alessandra Giani – Departamento de Botânica ICB/UFMG.**

## FICHA CATALOGRÁFICA

043

Jardim, Fernando Antônio

Potenciais mecanismos de redução da toxicidade de microcistinas e a sua utilização no tratamento da água. [manuscrito] / Fernando Antônio Jardim. – 2008.

95f. : il. ; 29,5 cm.

Orientadora: Alessandra Giani

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas.

1. Cianobactéria – Teses. 2. Microcistinas – Teses. 3. Tratamento de água. 4. Ficocianina . 5. Fotoxidação. I. Giani, Alessandra. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. III. Título.

CDU: 582.232

“São fúteis e cheias de erros as ciências que não nasceram da experimentação, mãe de todo conhecimento”.

“Aprender é a única coisa de que a mente nunca se cansa, nunca tem medo e nunca se arrepende”.

Leonardo di ser Piero da Vinci

25/04/1452 – 05/05/1519

## AGRADECIMENTOS

A Deus por ter me dado suporte para enfrentar mais um grande desafio e ter me ajudado a encarar os obstáculos como oportunidades de melhoria.

A minha família por ter me dado total apoio nos momentos mais complicados.

A Companhia de Saneamento de Minas Gerais, onde eu tive condições de desenvolver a maior parte dos experimentos para que as hipóteses desse trabalho fossem comprovadas.

A minha orientadora, a professora Alessandra Giani, por me indicar os caminhos a seguir sempre com muito conhecimento e paciência.

Aos meus amigos da COPASA: Simoni, Patrícia, Maurício, Daniel, Floriano, Adilson, Adriana, Cida, Airis e a todos os outros que me apoiaram direta e indiretamente.

Aos estagiários do laboratório da COPASA: Bruna Brant, Ana Maria, Patrícia Couto, Maria Inês, Rodrigo Matias, cujos esforços para manter o banco de cultura de cianobactérias e apoiar-me durante os experimentos, fizeram esse trabalho possível.

A estagiária Fabiana pelo apoio nas análises estatísticas.

Aos meus colegas do departamento de Botânica, do departamento de Bioquímica e do departamento de Química da UFMG, em especial aos professores Cláudio Donicci e ao Patterson Patrício pelo apoio na realização das análises de espectrofotométricas de massas e interpretação dos espectrogramas.

## SUMÁRIO

	PAG
Lista de Tabelas.....	vix
Lista de Figuras.....	x
Resumo.....	xiv
<i>Abstract</i> .....	xv
<b>1 INTRODUÇÃO</b>	<b>1</b>
1.1 As cianobactérias e as cianotoxinas.	1
1.2 Fatores reguladores do crescimento celular e na produção de microcistinas.	2
1.3 Tratamento físico e químico para a remoção de cianobactérias e de cianotoxinas.	2
1.4 A produção e a regulação das espécies ativas de oxigênio.	4
1.4.1 A relação entre as ficobiliproteínas, as espécies ativas de oxigênio e a microcistina.	7
1.5 A molécula da microcistina.	7
1.5.1 As possíveis alterações na molécula de microcistina e a redução de sua toxicidade.	8
1.6 Ocorrências de cianobactérias tóxicas produtoras de microcistinas no Brasil.	9
1.7 Hipóteses de trabalho	11
1.8 Objetivos	12
<b>2 MATERIAL E MÉTODOS DO CAPÍTULO I</b>	<b>13</b>
2.1 Coleta, cultivo e preparação da amostra.	13
2.2 Bioensaios com camndongos.	16
2.3 Extação e análise da microcistina.	17
2.4 Outras variáveis físico-químicas e biológicas.	18
2.5 Relação entre o peróxido de hidrogênio, a ficocianina e a microcistina.	19

2.6	Relação entre a microcistina solúvel a microcistina particulada e a ficocianina.	21
2.7	Relação entre a ficocianina e a microcistina no claro e no escuro.	22
2.8	Relação entre o betacaroteno e a microcistina.	24
2.9	Tratamento estatístico.	26
<b>3</b>	<b>RESULTADOS DO CAPÍTULO I</b>	<b>26</b>
3.1	Resultados dos bioensaios com camundongos.	26
3.2	Resultados da cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).	26
3.3	Resultados da espectroscopia de massas.	28/29
3.4	Resultados da cromatografia líquida de alta eficiência da clorofila <i>a</i> e do betacaroteno.	30
3.5	Resultados dos outros parâmetros químicos das análises realizadas <i>in vivo</i> .	31
3.6	Resultados das análises químicas realizadas <i>in vitro</i> .	34
<b>4</b>	<b>DISCUSSÃO DO CAPÍTULO I</b>	<b>41</b>
<b>5</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS DO CAPÍTULO II</b>	<b>46</b>
5.1	Coleta e cultivo da amostra.	46
5.2	A pressurização das amostras.	46
5.3	A escolha do coagulante.	48
5.3.1	Avaliação prévia da remoção na concentração de microcistina e a reação de foto-Fenton das amostras que foram pressurizadas na bancada pelo artefato (Figura 5, pag.17).	50
5.3.2	Avaliação da remoção na concentração de microcistina nas frações solúveis e particuladas das amostras de água dos testes de jarros que foram pressurizadas por meio do aparato da Figura 23, pag. 48.	53

5.4	O tratamento do lodo gerado nos testes de jarros.	54
<b>6</b>	<b>RESULTADOS DO CAPÍTULO II</b>	<b>56</b>
6.1	Concentração da microcistina na câmara de pressurização	56
6.2	Resultados dos testes de jarros – amostras não pressurizadas.	57
6.3	Resultados dos testes de jarros – amostras pressurizadas.	58
6.4	Resultados dos testes de intercalinização das amostras.	59
6.5	Resultados dos testes de remoção de células e de microcistina no experimento para a reação de foto-Fenton.	60
6.5.1	Resultados das avaliações da remoção na concentração de microcistina nas frações solúveis e particuladas das amostras de água da câmara de pressurização.	63
6.6	Resultados dos tratamentos aplicados ao lodo gerado no processo de coagulação/sedimentação.	66
<b>7</b>	<b>DISCUSSÃO DO CAPÍTULO II</b>	<b>69</b>
<b>8</b>	<b>CONCLUSÕES</b>	<b>71</b>
		<b>73</b>
<b>9</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	

## LISTA DE TABELAS

	PÁG.
1 Metodologias utilizadas para as análises físico-químicas e biológicas.	18
2 Fragmentos obtidos da molécula de microcistina RR antes e após a amostra de cultura de <i>M. protozoensis</i> ter sido submetida à luz e a pressão e os fragmentos correspondentes.	30
3 Produtos químicos utilizados como coagulantes e as suas concentrações.	49
4 Metodologia utilizada para a avaliação dos parâmetros de controle da qualidade da água.	53
5 Dosagens ótimas dos produtos químicos coagulantes e os percentuais de remoção de cor, turbidez e o pH em amostras de cultivo não submetidas à pressão.	57
6 Resultados das análises de ferro total realizadas após a dosagem de cloreto férrico.	68

## LISTA DE FIGURAS

	PÁG.
1 Fluxo de elétrons durante a explosão oxidativa: espécies ativas de oxigênio derivadas de O <sub>2</sub> , vias de detoxificação e interconversões em plantas (adaptado de Baker & Orlandi, 1999).	6
2 Estrutura cíclica da microcistina, de acordo com CARMICHAEL (1988).	8
3a <i>M. protocystis</i> isolada da represa de Furnas em Novembro de 2003.	13
3b <i>M. protocystis</i> com detalhe da mucilagem individual de cada célula evidenciada com a tinta nanquim.	14
4 Desenho experimental para o preparo das amostras.	15
5 Artefato utilizado para a pressurização das amostras.	16
6 Desenho experimental das análises de microcistina e de ficocianina com diferentes dosagens de peróxido de hidrogênio.	21
7 Desenho experimental das análises de microcistina e de ficocianina após a adição de microcistina aos extratos de <i>Spheroconvium brasiliense</i> e <i>Microcystis protocystis</i> .	22
8 Desenho experimental das análises de microcistina e de ficocianina no claro e no escuro.	24
9 Desenho experimental das análises de microcistina para o teste do betacaroteno.	25
10 Cromatogramas com os espectros UV (238 nm) da microcistina (12,2 min.) por CLAE.	27
11 Espectros de massas do pico de microcistina do cromatograma do extrato de células de <i>M. protocystis</i> antes e após o experimento.	28/29
12 CLAE cromatograma da clorofila <i>a</i> e de betacaroteno do extrato etanólico de células de <i>M. protocystis</i> antes e após as células terem sido submetidas à pressão.	30

13	Concentração de ficocianina ( $\text{mg.g}^{-1}$ ) extraída da cultura de <i>M. protocystis</i> .	31
14	Resultados das análises de nitrato, amônio, pH e oxigênio dissolvido das amostras antes do tratamento; sem terem sido submetidas à pressão no dia do experimento e submetidas à pressão.	32
15	Resultados das análises de alcalinidades das amostras antes do tratamento; sem terem sido submetidas à pressão no dia do experimento e submetidas à pressão.	33
16	Concentrações de ficocianina e de microcistina extraídas do cultivo em três diferentes pH de soluções tampões antes dos experimentos.	35
17	Concentrações de microcistina antes e após as amostras terem sido submetidas à luz e à pressão e a dosagem de peróxido de hidrogênio na solução tampão pH 9.	35
18	Concentrações de microcistina antes e após as amostras terem sido submetidas à luz e à pressão e a dosagem de peróxido de hidrogênio na solução tampão pH 7.	36
19	Concentrações de microcistina antes e após as amostras terem sido submetidas à luz e à pressão e a dosagem de peróxido de hidrogênio na solução tampão pH 4.	37
20	Concentração de microcistina RR dos cultivos de <i>S. brasiliense</i> e de <i>M. protocystis</i> .	39
21	Concentrações de ficocianina e de microcistina antes e após as amostras terem sido submetidas à pressão e a luz nos cultivos de <i>Sphaerocavum brasiliense</i> com experimentos realizados na luz e ao abrigo da luz.	40
22	Concentração de microcistina antes, controle e após as amostras terem sido submetidas à luz e a pressão nos cultivos de <i>M. protocystis</i> acrescidos de $1,0 \mu\text{g.L}^{-1}$ ; $2,0 \mu\text{g.L}^{-1}$ e $3,0 \mu\text{g.L}^{-1}$ de betacaroteno.	41

23	Aparato utilizado para a pressurização das amostras.	47
24	Esquema do experimento para a pressurização das amostras.	48
25	Aparelho de <i>jartest</i> utilizado para a dosagem dos coagulantes.	49
26	Esquema dos experimentos para a verificação da reação de foto-Fenton durante a coagulação com cloreto férrico e a pressão.	52
27	Esquema dos experimentos para o tratamento do lodo.	55
28	Concentração de microcistina das amostras antes e após o experimento.	56
29	Resultados dos testes realizados com o cloreto férrico como coagulante nas amostras que não foram pressurizadas.	58
30	Resultados dos testes realizados com o cloreto férrico como coagulante nas amostras que foram pressurizadas.	59
31	Resultados dos testes realizados com a intercalinização da água decantada nos testes de jarros.	60
32	Resultados das contagens de células.	61
33	Concentração de microcistina nas frações solúveis.	62
34	Concentração de microcistina nas frações particuladas.	63
35	Concentração de microcistina nas frações solúveis.	64
36	Concentração de microcistina nas frações particuladas.	64
37	Resultados das análises de microcistina no lodo seco do fundo dos jarros (das amostras que foram pressurizadas) com 7 minutos de sedimentação após exposição à luz em pH 4.	66
38	Resultados das análises de microcistina no lodo umedecido do fundo dos jarros (das amostras que foram pressurizadas) com 7 minutos de sedimentação após exposição à luz em pH 4.	67
39	Resultados das análises de microcistina no lodo do fundo dos jarros (das amostras que foram pressurizadas) com 7 minutos de sedimentação após exposição à luz e as dosagens de cal.	68

## RESUMO

Muitos gêneros de cianobactérias que formam florações podem produzir microcistinas, potentes hepatotoxinas, que se tornou alvo de preocupações nas pesquisas que objetivam produzir água potável. No Brasil, a hepatotoxina microcistina é produzida principalmente por espécies de cianobactérias dos gêneros *Microcystis* e *Radiocystis*. Por ser um heptapeptídeo cíclico que possui um dieno, a molécula da microcistina é muito resistente à hidrólise química e até mesmo a fervura. Com isso há uma busca constante de soluções eficientes e de baixo custo para a remoção dessa cianotoxina da água a ser tratada. Esse processo é mais eficiente, quando se consegue remover, nos processos de tratamento, a fração particulada intacta das células e a fração solúvel. Ainda que os processos convencionais de tratamento da água possam reduzir a concentração de microcistina oriunda da fração particulada, a fração solúvel pode ainda conter elevadas concentrações dessa cianotoxina e passar pelos sistemas de tratamento. O presente trabalho apresenta os resultados de estudos obtidos em experimentos realizados em escala de laboratório, nos quais inicialmente foram utilizadas amostras de floração e depois utilizadas amostras de cultura de *Microcystis protocystis*, produtora de microcistina RR. O trabalho foi desenvolvido em duas etapas. A primeira objetivou estudar a redução da toxicidade da microcistina a partir de mudanças ocorridas em amostras de floração e posteriormente de cultura, expostas à luz e submetidas à pressão. Já a segunda etapa, objetivou aplicar os resultados obtidos nesse primeiro estudo, utilizando-se também em escala de bancada, coagulantes químicos, visando associar a técnica da exposição à luz e a de pressurização de amostras a uma importante etapa do tratamento da água, que é a etapa da coagulação. Avaliou-se também a concentração de microcistina no lodo gerado durante o processo de sedimentação sendo também avaliadas técnicas de redução das concentrações de microcistina encontradas. Os experimentos foram realizados com *Microcystis protocystis* produtora de microcistina RR. Os resultados do trabalho, na primeira etapa, mostraram uma produção de peróxido de hidrogênio após o dano causado às células pela pressão induzida. Observou-se também uma redução da concentração de ficocianina, sendo que não foram verificadas modificações significativas para a clorofila *a* e o  $\beta$  caroteno. A microcistina foi degradada com alterações nos picos do cromatograma e no espectro de absorção quando comparados com os obtidos antes do tratamento. A dosagem letal aos camundongos aumentou aproximadamente 10 vezes após as amostras terem sido pressurizadas e expostas à luz, mostrando uma conseqüente redução da toxicidade. As condições experimentais de exposição de culturas de cianobactérias ou de florações à luz e sob a pressão, causaram uma retirada parcial da ficocianina e da microcistina das células. A ficocianina, após ser iluminada, foi foto-oxidada e ativou a produção das EAO's, que por sua vez, causaram uma redução na toxicidade das microcistinas. Esse é um potencial método para auxiliar o tratamento da água durante as florações de cianobactérias. Já na segunda etapa, do teste com os três coagulantes, o que se mostrou mais eficiente na remoção de células e de microcistina foi o cloreto férrico. No tratamento do lodo gerado, a exposição à luz por 12 horas, foi o processo que apresentou uma melhor remoção de microcistina.

## ABSTRACT

Several bloom-forming cyanobacterial genera produce microcystin, a potent hepatotoxin, which has turned a main concern for people who deal with water treatment for human consumption. In Brazil, hepatotoxins are produced especially by species of the genera *Microcystis* and *Radiocystis*. Due to the presence of double bond in the ADDA amino acid, the microcystin molecule is very resistant to chemical hydrolysis and even to boiling. Therefore there is a constant search for effective solutions, at low cost, for the removal of this cyanotoxin from the drinking water. Although the conventional processes of water treatment can reduce the concentration of microcystins from the particulate fraction, the soluble fractions can still contain high concentrations of this cyanotoxin and pass through the treatment systems. The present work shows the results of experiments carried out at a laboratory scale, using blooms samples and cultures of the cyanobacteria *Microcystis protocystis*, microcystin RR producer. The work was developed in two phases. The first one focused on studying the reduction of microcystin toxicity, based on changes occurred on blooms samples and cultures exposed to light and submitted to pressure. The second stage focused on applying the results obtained in the first study, on a bench-scale, with the addition of chemical coagulants. The concentration of microcystin in the sludge generated during the process of sedimentation was also evaluated, as well as some techniques of reduction of these concentrations of microcystin. The experiments were carried out with *M. protocystis* containing a high concentration of microcystin. In the first stage, the results showed a production of hydrogen peroxide after the damage caused to the cells by the induced pressure. A reduction of phycocyanin concentration was also noticed, however no significant modifications occurred for chlorophyll *a* and  $\beta$  carotene concentration. The microcystin was degraded showing changes in the peaks of the chromatogram and in the absorption spectrum when compared to those obtained before the treatment. The lethal dosage to the mice was increased by approximately 10 times after pressurization of the samples and exposition to light, showing a reduction of toxicity. The experimental conditions provided cellular lysis, with the consequent releasing of phycocyanin and microcystin. The phycocyanin, under illumination, was photo-oxidized and activated the production of ROS's, which caused a reduction of microcystin toxicity. These results seem to indicate the influence of ROS's in the reduction of microcystin toxicity and suggest a potential method for water treatment during the occurrence of cyanobacteria blooms. In the second stage of the experiments with the three coagulants, it was observed that the ferric chloride was the most efficient for the removal of cells and of microcystin. Finally, for the treatment of the toxic sludge generated, the exposition to light during 12 hours was the process that presented a better removal of microcystin.

# 1 - INTRODUÇÃO

## 1.1 – As cianobactérias e as cianotoxinas.

As cianobactérias são organismos procariontes fotoautotróficos aeróbicos, que requerem água, dióxido de carbono, substâncias inorgânicas e luz, para sobreviverem. O metabolismo energético é baseado na fotossíntese, embora algumas espécies adaptaram-se para sobreviver por longos períodos na ausência de luz. Algumas linhagens de espécies de cianobactérias podem produzir potentes toxinas que são classificadas de acordo com o seu mecanismo de ação. De acordo com Carmichael (1992) as neurotoxinas são alcalóides que bloqueiam a mediação química da acetilcolina (anatoxina a); inibem a ação da acetilcolinesterase (anatoxina a S) ou bloqueiam os canais de sódio, durante a transmissão elétrica do impulso nervoso (saxitoxinas e neosaxitoxinas). Já os alcalóides dermatotóxicos causam irritação cutânea em pessoas que tem um permanente contato com a água como pescadores e nadadores. De acordo com o mesmo autor, as hepatotoxinas podem ser classificadas como pentapeptídeos cíclicos (nodularina); heptapeptídeos cíclicos (microcistinas) e o alcalóide citotóxico cilindropermopsina. Os mecanismos de ação das hepatotoxinas está relacionado a inibição enzimática. As microcistinas inibem principalmente as enzimas fosfatases serina e treonina (PP1 e PP2A) afetando a sinalização intracelular dos processos de crescimento e diferenciação. Efeitos clássicos deteriorativos como a hepatotoxicidade e a hiperfosforilação de proteínas são consequências da inibição das fosfatases. Já a cilindropermopsina, inibe também a síntese de proteínas e enzimas como a glutatona, o citocromo P450 e o DNA e em estudos mais recentes (Reisner *et al.*, 2004), essa cianotoxina causou também retardo no crescimento e anemia aguda em camundongos.

As cianotoxinas podem intoxicar o homem e outros animais por veiculação hídrica não por meio da rota oro-fecal, mas como compostos químicos tóxicos liberados na maioria das vezes após a lise celular. Podem também acometer a saúde humana por meio do contato direto da água sobre a pele causando alergia e dermatites. Agindo como moléculas orgânicas tóxicas, as cianotoxinas podem causar intoxicação ao homem, pelas seguintes vias: intravenosa, inalação, intraperitoneal, subcutânea, intramuscular,

oral e dérmica, sendo que essa ordem está de acordo com o maior dano causado ao homem.

### 1.2 – Fatores reguladores do crescimento celular e na produção de microcistinas.

De acordo com Chorus & Bartram (1999) fatores como a intensidade luminosa, a presença de aerótopos, a concentração de nitrogênio e fósforo e a temperatura da água, interferem na taxa de crescimento das cianobactérias e conseqüentemente na intensidade das florações. Utkilen e Gjølme (1992) mostraram que a concentração de microcistina aumentou em um cultivo de *Microcystis aeruginosa* com a intensidade de luz acima de  $40 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  e salientaram que a quantidade de microcistina por unidade de peso de proteína era constante em intensidades de luz mais elevadas. Essa constatação indicou que a produção de microcistina era controlada pelos produtos fotossintéticos. Wilson *et al.* (2006) verificaram que a luz apesar de afetar o crescimento da população de *Microcystis aeruginosa*, não foi significativa para a produção de microcistina por célula. Outros fatores foram também estudados como aqueles que regulam a produção das toxinas. Dentre esses se destacaram aqueles referentes ao tempo de cultivo, à temperatura, aos macronutrientes e micronutrientes, à salinidade e ao pH. Importantes estudos foram inicialmente realizados por Sivonen (1990), por exemplo, sobre os efeitos da luminosidade, temperatura, concentrações de nitrato, fosfato e crescimento bacteriano na produção de microcistina de *Oscillatoria (Planktothrix) agardhii*. Almeida *et al.* (2006) provaram que o ferro é um micronutriente essencial para a formação de florações de *Microcystis aeruginosa*.

### 1.3 – Tratamento físico e químico para a remoção de cianobactérias e de cianotoxinas.

O risco de se usar produtos oxidantes foi inicialmente confirmado por Lam *et al* (1995). Esses autores ao utilizarem produtos químicos oxidantes como o cloro, o permanganato de potássio e o sulfato de cobre para a redução do número de células de *Microcystis aeruginosa* durante as florações, verificaram que ocorria a lise celular. A lise das células fazia com que a microcistina fosse liberada tornando-se solúvel e essa

fração era de difícil remoção pelos métodos convencionais de tratamento. Em trabalhos mais recentes, Hou *et al.* (2008) provaram que o cloro gasoso, o hipoclorito e o ozônio foram eficientes para a remoção de células de *M. aeruginosa*, no entanto, os produtos a base de cloro foram pouco eficientes na remoção da microcistina solúvel.

A coagulação e a filtração podem remover a microcistina intracelular (Chow *et al.*, 1999; Drikas *et al.*, 2001), mas não removem a microcistina solúvel (Keijola *et al.*, 1988; Drikas *et al.*, 2001). O uso de carvão ativado granular (GAC) é muito eficiente para a remoção de em média 80% de microcistina LR (leucina-arginina), desde que a água não possua excesso de matéria orgânica dissolvida (Lambert *et al.*, 1996). Trabalhos desenvolvidos por Cook e Newcombe (2002) mostraram que a microcistina RR é a espécie de microcistina mais adsorvida pelo carvão ativado em pó do que a microcistina YR e a microcistina LR. Estudos utilizando carvão ativado em pó (PAC) mostraram que a remoção dessa cianotoxina dependia do tempo de contato, da concentração inicial da microcistina e do tipo de carvão utilizado. Donati *et al.* (1994) e Schumann *et al.* (1997) mostraram que a quantidade de microcistina adsorvida estava diretamente relacionada ao volume de mesoporos do carvão (diâmetro médio variando de 2 a 50 nm). Pendleton *et al.* (2001) provaram que o carvão ativado proveniente de endocarpos de cocos possui uma maior afinidade pela microcistina LR do que o carvão ativado originário de madeiras, além disso, essa afinidade era maior em pHs mais ácidos. De acordo com a união internacional de química pura e aplicada (IUPAC), os poros podem ser classificados em função do diâmetro como: macroporos (> 50 nm), mesoporos (2-50 nm), microporos secundários (0,8-2 nm) e microporos primários (< 0,8 nm).

Tudo indica que o mais eficiente processo de destruição das microcistinas intra e extra celulares seja a ozonização (Rositano, 1996). No entanto, essa autora alerta para o elevado consumo de ozônio em águas contendo elevadas concentrações de carbono orgânico dissolvido. Relatos semelhantes foram realizados por Jia *et al.* (2003) quando utilizaram a ozonização associada a filtração em carvão ativado granular. A resistência da microcistina a elevadas temperaturas e às microondas já foi comprovada, inclusive alguns autores como Metcalf & Codd (2000) já utilizam esses métodos para a extraí-la das células para fins analíticos.

Estudos relativos à decomposição da microcistina com variações de pH e temperatura mostraram que a decomposição da molécula se dá em extremos (valores altos e baixos) de pH e temperaturas (Harada *et al.*, 1996). Song *et al.* (2006) demonstraram que a oxidação completa da microcistina se deu em pH inferior a 4. A oxidação da microcistina em extremos de temperatura e pH demonstra o quanto é pouco aplicável à adoção das medidas acima em estações de tratamento de água para fins de abastecimento público.

#### 1.4 – A produção e a regulação das espécies ativas de oxigênio.

Nos organismos fotossintetizantes a produção de uma variedade de espécies ativas de oxigênio (EAO's) é inevitável, principalmente sob condições estressantes para as células. Na escala evolutiva, as cianobactérias são considerados os primeiros organismos que realizaram a fotossíntese oxigênica. Nesse contexto, como todos os organismos clorofilados, uma célula de cianobactéria pode realizar a fotossíntese e a respiração aeróbica, com a conseqüente liberação de produtos dessas reações, como o superóxido e o peróxido de hidrogênio. A ativação do oxigênio molecular ( $O_2$ ) em espécies ativas de oxigênio envolvidas no sistema fotossintético pode ocorrer principalmente através de duas vias.

Na primeira via, ocorre a foto redução do oxigênio molecular para peróxido de hidrogênio no fotosistema I (PSI). Essa redução é devida a interação do oxigênio com os aceptores de elétrons da parte reduzida do fotosistema I (PSI) sob excesso de luz absorvida (reação de Mehler).

Por outro lado, no fotosistema II (PSII), a outra via de produção das espécies ativas de oxigênio ocorre pela redução do NADPH (fosfato de nicotinamida adenina dinucleotídeo) por meio de uma NADPH oxidase associada à membrana, com a formação de peróxido de hidrogênio.

As moléculas de pigmentos quando excitadas podem produzir EAO's e o oxigênio singlete ( $^1\text{O}_2$ ) pode resultar do decaimento da clorofila simples através da clorofila no estado triplo do complexo antena do PSI e do fotossistema II (PSII). De acordo com Schreiber e Neubauer (1990) a fotoredução de oxigênio pelo PSI é comum no fluxo de elétrons nos cloroplastos e em cianobactérias, particularmente quando o gás carbônico é limitado para a fotossíntese, formando o oxigênio singlete. Essas reações foram devidamente demonstradas por Asada (2006).

De acordo com Asada & Takahashi (1987) e Asada (2006) o ânion superóxido não é muito reativo com os componentes celulares, mas pode interagir com o peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), formado pela redução de NADPH por meio de uma NADPH oxidase, na reação de Haber-Weiss para formar radicais hidroxil altamente reativos ( $\text{OH}^\cdot$ ). Uma vez produzidos, os radicais hidroxil podem reagir indiscriminadamente causando a peroxidação de lipídeos, a desnaturação de proteínas e alterações mutacionais no DNA. Por isso, a imediata captura de radicais livres, para evitar os danos fotooxidativos, torna-se imperativa para a sobrevivência dos organismos fotossintéticos. Dentre os antioxidantes, Obinger *et al.*, (1998) e Assada (2006) caracterizaram dois tipos de superóxido dismutases em cianobactérias. Uma superóxido dismutase que contém manganês que está ligada aos peroxissomas e outra superóxido dismutase que contém ferro e está ligada aos tilacóides.

Halliwell & Gutteridge (1989) provaram que o betacaroteno é uma molécula antioxidante externa para o oxigênio singlete. Em uma publicação mais recente Tsen *et al.* (2006) provaram por meio da espectroscopia ultra rápida (Raman) que o licopeno era mais potente sequestrador de EAO's do que o betacaroteno. Além do betacaroteno, Babica *et al.*, (2006), associaram que elevados níveis de EAO's nos organismos fotoautotróficos eram geralmente acompanhados por reduções quantitativas de glutathionas (GSH) intracelulares, importantes sequestradoras de EAO's. De acordo com Obinger *et al.*, (1998) e Takenaka (2001) as microcistinas, quando liberadas, afetaram a defesa antioxidativa das células, incluindo a inibição da superóxido dismutase (SOD), as peroxidases (POD), a glutathiona peroxidase (GPx), a glutathiona redutase (GR), a ascorbato peroxidase (Apx) e a dehidroascorbato redutase (DHAR).

De acordo com o diagrama apresentado por Resende *et al.*, (2003) na Figura 1, quanto mais acidificado estiver o meio, maior será a probabilidade de produção de espécies ativas de oxigênio como o ânion superóxido e os radicais peridroxil e hidroxil, confirmando o que foi proposto anteriormente por Zepp *et al.*, (1992), podendo inclusive ocorrer a reação de Haber-Weiss e a reação de foto Fenton.

De acordo com o diagrama, o oxigênio molecular é relativamente não reativo e não tóxico, devido a estrutura estável dos elétrons na sua camada externa. Entretanto, alterações na distribuição dos elétrons podem provocar a ativação e influenciar nos sistemas biológicos. Dessa forma as espécies ativas de oxigênio (EAO's) são geradas dentro das células como resultado da excitação ou um "leve toque" no elétron externo, formando o oxigênio singlete ( $^1O_2$ ) ou de uma sucessiva adição de elétrons ao oxigênio molecular produzindo o ânion superóxido ( $O_2^-$ ), o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e o radical hidroxil ( $OH^\cdot$ ).

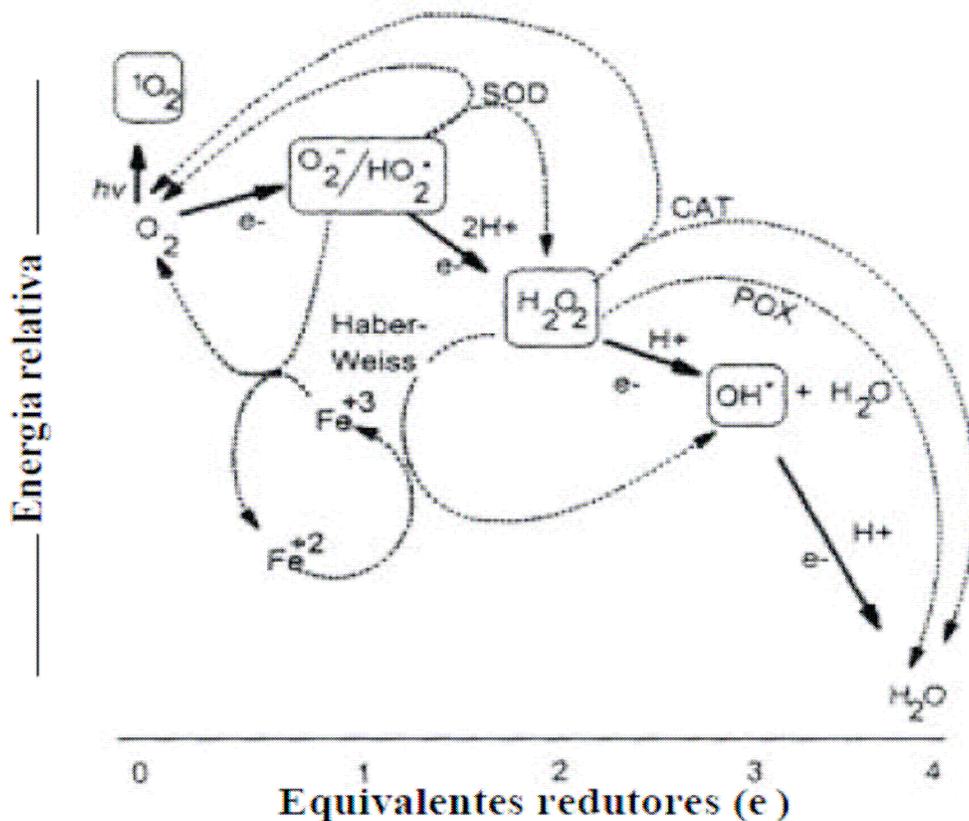


Fig. 1: Fluxo de elétrons durante a explosão oxidativa: espécies ativas de oxigênio derivadas de  $O_2$ , vias de detoxificação e interconversões em plantas (adaptado de Baker & Orlandi, 1999).

#### 1.4.1 – A relação entre as ficobiliproteínas, as espécies ativas de oxigênio e a microcistina.

De acordo com Tsuji *et al* (1995) e Gadjdek *et al.* (2004) os pigmentos envolvidos no processo fotocatalítico são as ficobiliproteínas. Esses pigmentos ao sofrerem a fotólise, em soluções oxigenadas, geram oxigênio singlete e o superóxido. Welker e Steinberg (1999), (2000), mostraram uma potencial degradação fotolítica de microcistinas na presença de substâncias húmicas quando irradiadas com a luz solar. Lawton & Robertson (1999) e Robertson *et al.*, (2005) propuseram que a ação de EAO's sobre as microcistinas está relacionada com a capacidade eletrofílica do oxigênio singlete em quebrar duplas ligações como as do ADDA-dieno. Gadjdek *et al.* (2004) após extraírem e isolarem microcistina e ficocianina de *Microcystis aeruginosa* expuseram *in vitro* à radiação UV e verificaram uma redução na concentração da microcistina. Esses autores concluíram que era necessário elevar a concentração da ficocianina para se obter a fotooxidação da microcistina. De acordo com os resultados de Robertson *et al.*, (1999) e Robertson *et al.*, (2005) ficou comprovada a influência da ficocianina atuando como agente fotocatalítico na decomposição da microcistina LR. Esses autores sugeriram que esse processo pode ocorrer via geração de oxigênio singlete, devido principalmente ao mecanismo de transferência de elétrons.

#### 1.5 – A molécula da microcistina.

As microcistinas (Figura 2) são assim denominadas, pois foram isoladas primeiramente de *Microcystis aeruginosa* e formam um grupo de heptapeptídeos cíclicos cuja estrutura geral foi proposta por Carmichael *et al.* (1988).

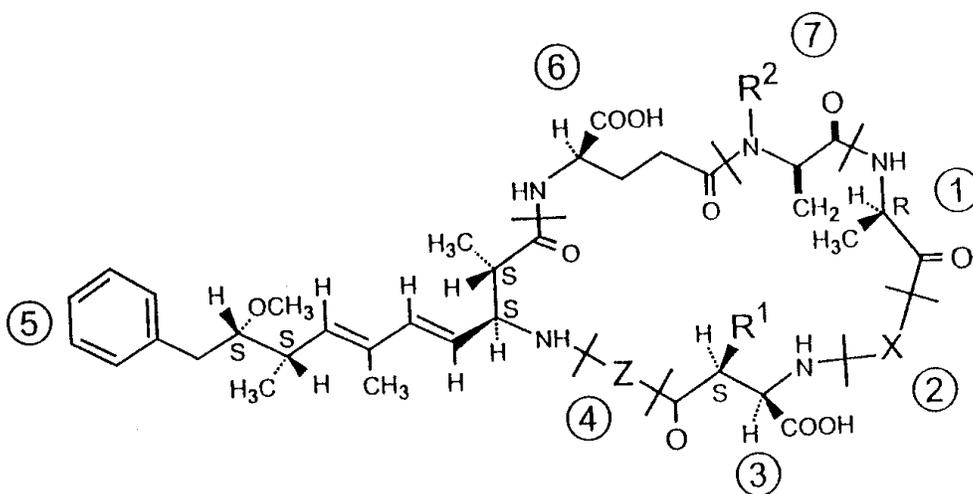


Fig. 2 – Estrutura molecular da microcistina. Ciclo (D-Ala<sup>1</sup>\_ X<sup>2</sup>\_D-MeAsp<sup>3</sup>\_Z<sup>4</sup>\_Adda<sup>5</sup>\_D-Glu<sup>6</sup>\_Mdha<sup>7</sup>) onde X e Z são L-aminoácidos variáveis (em Mcyst-LR, X = Leucina (L) e Z = Arginina (R)); R<sup>1</sup> e R<sup>2</sup> são H (dimetilmicrocistinas) ou CH<sub>3</sub>; D-MeAsp é o ácido D-eritro-β-metilaspártico; Adda é (2S, 3S, 8S, 9S)-3-amino-9-metoxi-2,6,8-trimetil-10-fenildeca-4,6-ácido dienóico e Mdha é N-metildehidroalanina (Dha = dehidroalanina).

Rinehart *et al.*, (1994) e Sivonen (1996) encontraram variações na estrutura química da molécula. Em torno de 70 variações estruturais de microcistinas já foram caracterizadas em amostras de florações e culturas e esse número tende a aumentar (Spoof *et al.*, 2003). A dose letal das microcistinas por meio da injeção intraperitoneal em camundongos pode variar de 50 a 600 µg.kg<sup>-1</sup> de peso corpóreo em camundongos (Stotts *et al.*, 1993 e Rinehart *et al.*, 1994).

### 1.5.1 – As possíveis alterações na molécula de microcistina e a redução de sua toxicidade.

Existem três modificações estruturais no aminoácido Adda conhecidas, a primeira delas diz respeito às trocas na isomerização geométrica do Adda-dieno com uma dupla ligação 6E\* preferencialmente à análoga 6Z\* (Figura 1, posição 5), comprovada por Harada *et al.*, (1990) como a construção de um isômero biologicamente inativo.

---

\* E: *entgegen* (Germânico): contrário ou trans e Z: *zusammen* (Germânico): junto ou cis.

De acordo com Tsuji *et al.* (1994) a isomerização pode ser provocada pela exposição da molécula à luz e o isômero geométrico *cis* é menos tóxico. Uma elevada concentração de pigmentos fotossintéticos como as ficocianinas, aumentou não somente a isomerização das microcistinas, mas também a sua decomposição. Esses mesmos autores mostraram que a microcistina LR poderia ser completamente destruída com 10 minutos de exposição a uma intensidade luminosa de  $2.500 \text{ W.cm}^{-2}$  (aproximadamente  $11.521 \mu\text{mol. m}^{-2}. \text{s}^{-1}$ ) com lâmpada ultravioleta.

A toxicidade das microcistinas está diretamente associada ao aminoácido Adda e a clivagem desse aminoácido reduz a sua toxicidade. Harada *et al.*, (1996) ao utilizarem o ozônio para promover essa clivagem obtiveram mais facilmente o isômero inativo.

De acordo com Stotts *et al.* (1993), a toxicidade da microcistina está também diretamente relacionada com a esterificação do D-glutamato (Figura 2, posição seis), com o grupamento  $\gamma$ -carboxílico ficando livre, para a inativação de compostos ou para se ligar a um aminoácido apolar.

E por último, as microcistinas acíclicas ou lineares, que podem ser precursoras das microcistinas cíclicas e são formadas possivelmente por meio da ação bacteriana, sendo 100 vezes menos tóxicas do que os compostos cíclicos equivalentes (Choi *et al.*, 1993; Rinehart *et al.*, 1994; Bourne *et al.*, 1996).

## 1.6 – Ocorrências de cianobactérias tóxicas produtoras de microcistinas no Brasil.

No Brasil, o primeiro relato sobre a ocorrência de microcistina produzida por *Microcystis aeruginosa* foi feito por Azevedo *et al.* (1994). Quanto à intoxicação por microcistina, o primeiro relato, embora não completamente comprovado, ocorreu na cidade de Paulo Afonso (BA) em 1988, com uma morbidade de 2000 casos de gastroenterite, seguido de 88 óbitos (Teixeira *et al.*, 1993). Oito anos mais tarde, em Caruaru (PE), aproximadamente 75 pacientes renais crônicos faleceram durante as sessões de hemodiálise em uma clínica local.

A partir da constatação científica dessa intoxicação (Azevedo *et al.*, 2002), tornaram-se mais intensos os trabalhos que procuraram um maior esclarecimento sobre as interferências de fatores na formação de florações tóxicas e a busca de tecnologias de remoção das cianobactérias e das cianotoxinas das águas de abastecimento público.

A ocorrência de florações de cianobactérias tóxicas no Brasil tem sido relacionada principalmente às espécies dos gêneros *Microcystis*, *Radiocystis* e *Cylindrospermopsis* (Jardim & Azevedo, 2006). Espécies dos dois primeiros gêneros produzindo a hepatotoxina microcistina e *C. raciborskii* produzindo as neurotoxinas saxitoxinas e neosaxitoxinas. De acordo com Sant'Anna *et al.* (2008) espécies dos gêneros *Anabaena* produziram microcistinas e anatoxina-a em amostras de florações de cianobactérias em lagos da região sul do Brasil.

Em Minas Gerais, iniciou-se pela empresa concessionária dos serviços de abastecimento de água do estado, um programa de monitoramento para a detecção de cianobactérias tóxicas na água das captações em rios e reservatórios (Jardim *et al.*, 2000). Por meio desse monitoramento, foi possível mapear a presença de cianobactérias tóxicas na água em muitas captações em rios, córregos ou mais comumente, em represas. A partir da edição da portaria nº 1469 em 19/02/2001 e que foi reeditada em 26/03/2004 (Portaria nº 518) pelo Ministério da Saúde, ficou estabelecido que o valor máximo permitido para a microcistina na água de abastecimento público seria de 1,0 µg.L<sup>-1</sup>. A busca de tecnologias para a redução das células de cianobactérias e das toxinas por elas produzidas se tornou uma constante pelos órgãos produtores de água potável, universidades e centros de pesquisas.

O objetivo geral desse trabalho foi o de avaliar se amostras de florações ou de culturas de cianobactérias, produzindo microcistinas, se tornariam menos tóxicas quando expostas à luz e submetidas à pressão. Posteriormente, buscou-se também avaliar se essa técnica de tratamento pudesse ser aplicada em experimentos de bancada.

## **1.7 - HIPÓTESES DE TRABALHO**

### **Capítulo I**

1. Cianobactérias produtoras de microcistinas podem ter a sua toxicidade reduzida quando submetidas à luz e a pressão?
2. A presença de betacaroteno pode interferir nas reduções das concentrações de microcistinas agindo como sequestrador de espécies ativas de oxigênio?

### **Capítulo II**

1. A exposição à luz e a pressurização de amostras de água contendo *Microcystis protocystis* produtora de microcistina RR, podem ser técnicas utilizadas, em escala piloto, antes da coagulação, na redução das concentrações de microcistina?
2. O lodo gerado nos experimentos realizados, em escala piloto, pode ser tratado para a degradação de microcistina?

## **1.8 - OBJETIVOS**

### **Capítulo I**

1. Verificar a (s) possível (is) causa (s) da redução da toxicidade de cianobactérias produtoras de microcistinas em amostras de água (floração) ou de culturas, quando submetidas experimentalmente à luz e à pressão.
2. Verificar se alterações, com supressão ou adição, das concentrações de ficocianina e de microcistina pudessem interferir na redução da toxicidade da microcistina.
3. Verificar a influência do betacaroteno, como uma molécula sequestradora de espécies ativas de oxigênio, na redução das concentrações de microcistinas.

### **Capítulo II**

1. Verificar se os conhecimentos obtidos no capítulo I sobre a exposição à luz e a pressurização de amostras de água contendo *Microcystis protocystis* produtora de microcistina RR, podem ser técnicas aplicadas ao tratamento da água, em uma escala piloto.
2. Verificar se o lodo gerado nos experimentos de bancada é passível de ser tratado com eficiência para a degradação da microcistina.

## 2 - MATERIAL E MÉTODOS DO CAPÍTULO I

### 2.1 - Coleta, cultivo e preparação das amostras.

A espécie de cianobactéria (*Microcystis protocystis* Crow, New Phytol. 22:62, 1923) utilizada nesse estudo, foi isolada a partir de uma amostra de seston coletada em uma floração ocorrida no reservatório de Furnas em novembro de 2003. A coleta foi realizada próxima à captação de água da cidade de Alfenas, que está localizada na bacia hidrográfica do ribeirão São Tomé, que desemboca no lago de Furnas (21° 27' 29,18''S / 45° 59' 46,09''O), ao sul do estado de Minas Gerais. Para a realização da coleta utilizou-se um frasco de plástico com a capacidade de cinco litros. O isolamento da espécie foi realizado por repiques sucessivos e a sua caracterização está representada na Figura 3a. A visualização da mucilagem, realizada com tinta nanquim, permitiu uma melhor caracterização taxonômica relativa a presença de uma bainha individual em volta de cada célula (Fig.3b). A espécie está mantida no banco de culturas do laboratório central da Companhia de Saneamento de Minas Gerais - COPASA em Belo Horizonte e passou a ser denominada HBRF01.

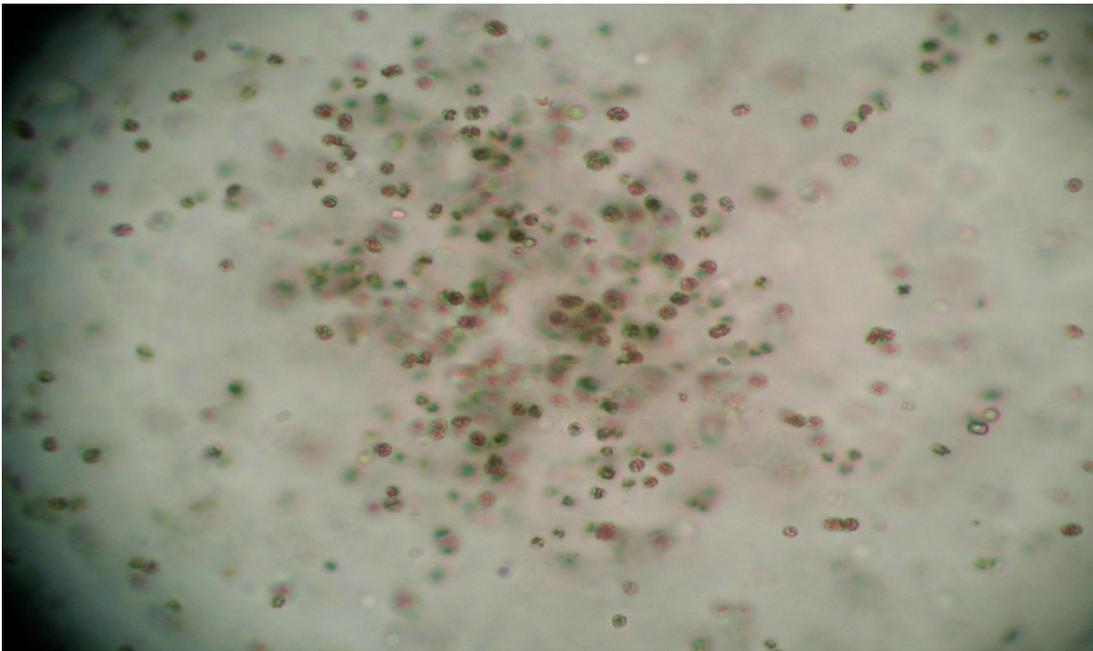


Fig. 3a: *M. protocystis* isolada da represa de Furnas em Novembro de 2003.

100 x

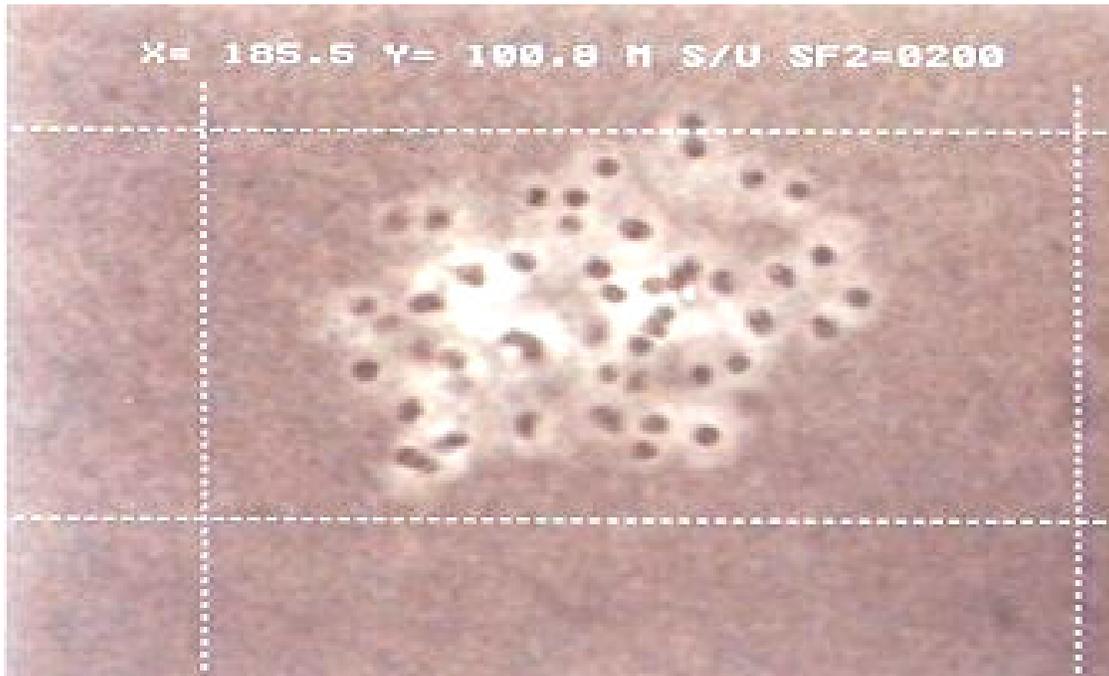


Fig. 3b: *M. protocystis* com detalhe da mucilagem individual de cada célula evidenciada com a tinta nanquim. 200 x

Conforme descrito por Sant'Anna *et al* (2004) a colônia era também microscópica, irregular, com as células espalhadas na superfície da mucilagem, que era hialina e diflúente. As células eram esféricas, com uma bainha de mucilagem individual (Fig. 3b) e mediram de 4 a 6  $\mu\text{m}$  de diâmetro com a presença de aerótopos.

A espécie foi mantida em meio de cultura líquido ASM-1, proposto por Gorham *et al.* (1964), a  $22 \pm 1^\circ \text{C}$  sob uma iluminação contínua de uma luz fria fluorescente com uma intensidade de 40  $\mu\text{moles de fótons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , medida com um quantômetro (*Data Logger*) marca LI-COR, inc., modelo LI-1400. O foto período foi de 12 horas no claro e 12 horas no escuro.

O cultivo foi mantido em um reator com uma moderada aeração. Antes da realização dos experimentos da pressão, as células contidas em seis litros de cultura foram sempre coletadas na fase exponencial de crescimento (aproximadamente  $10^7$  células.  $\text{mL}^{-1}$  em 10 dias) e divididas em três frações de 2 litros cada.

Visando eliminar a interferência da aeração das culturas nos resultados dos parâmetros analisados de nitrato ( $\text{N-NO}_3^-$ ), amônio ( $\text{N-NH}_3^+$ ), pH, oxigênio dissolvido e

formas de alcalinidade. As análises foram realizadas na primeira fração (de dois litros) assim que esta era retirada dos seis litros iniciais (**condição a**). As outras duas frações (de dois litros cada) eram as frações experimentais, sendo uma utilizada como controle (sem pressão – **condição b**) e a outra para o tratamento (com pressão – **condição c**) por aproximadamente 12 horas (período noturno). Após as 12 horas, dos dois litros de cada fração, um litro foi utilizado para a realização das análises químicas (sem pressão - **condição b** e com pressão – **condição c**) e o outro volume de 1 litro foi utilizado para a extração e análise da microcistina.

Para que fosse criado um ambiente com pressão foi utilizado um frasco Kitassato (2 L), onde foi adaptado um manômetro. Todo o conjunto foi conectado à rede de ar comprimido do laboratório central da COPASA. As amostras referentes ao tratamento foram submetidas à uma pressão de 0,02 MPa (Mega Pascoal) por aproximadamente 12 horas. Esse experimento foi realizado nas mesmas condições de temperatura e luminosidade acima mencionadas. Por meio da Figura 4 é possível visualizar o desenho experimental para esses testes.

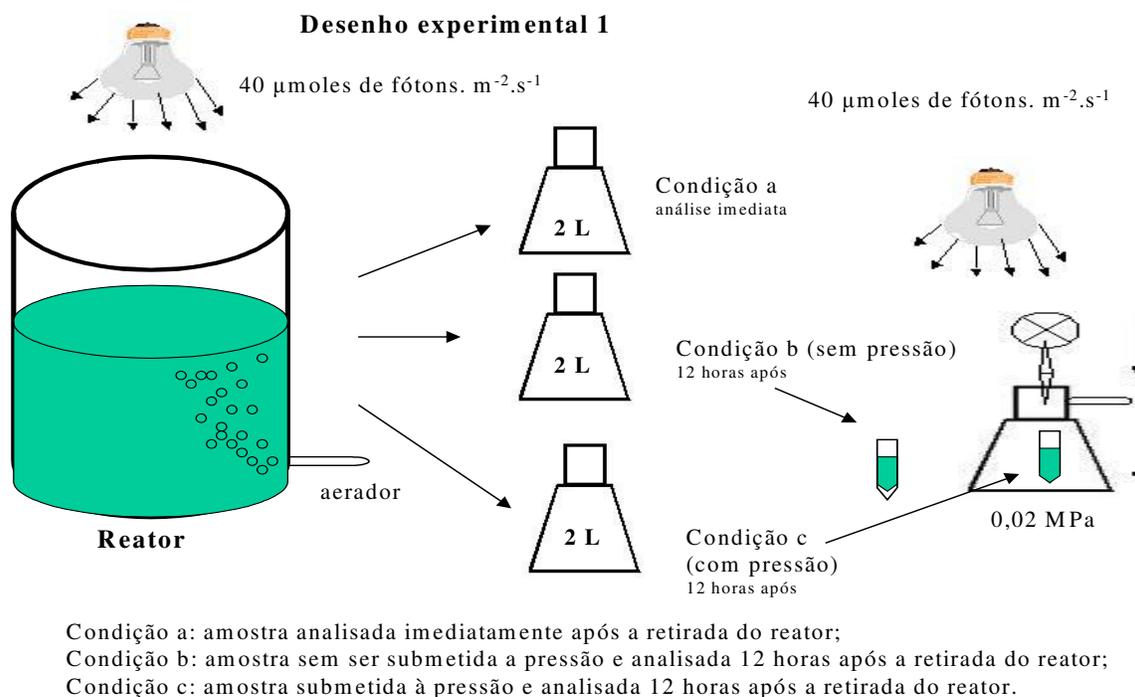


Fig. 4: Desenho experimental para o preparo das amostras.

Para a conexão do artefato utilizado para a pressurização das amostras (Figura 5) foi utilizada uma mangueira de látex onde foram adaptados dois filtros de celulose com a porosidade de 0,2  $\mu\text{m}$  da marca Millipore para a retenção de aerossóis provenientes do motor que produzia o ar comprimido. Na Figura 5 pode-se observar o artefato utilizado para a pressurização das amostras.

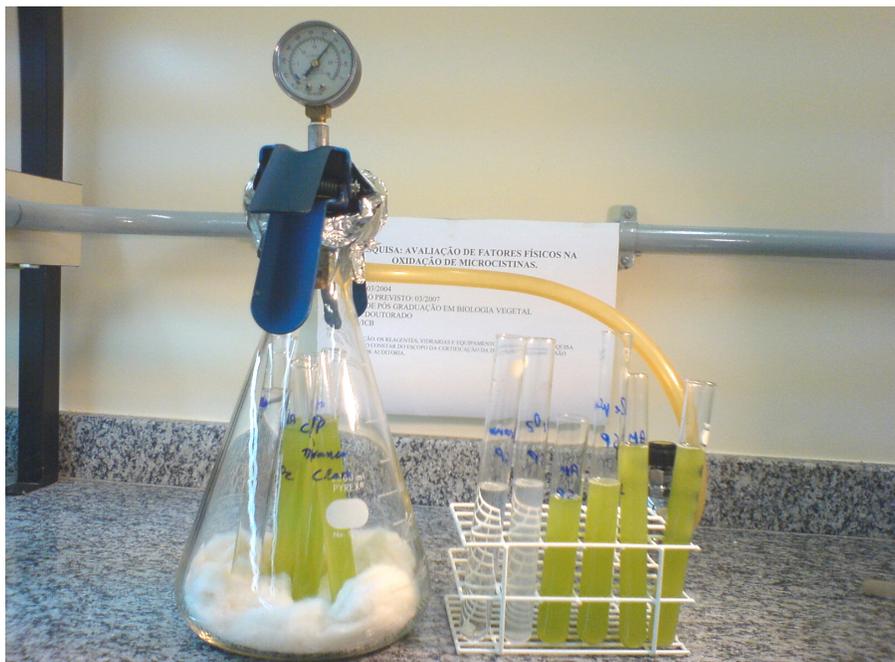


Fig. 5: Artefato utilizado para a pressurização das amostras.

## 2.2 - Bioensaios com camundongos

Foram realizados bioensaios com o uso de camundongos, por meio da injeção intraperitoneal do sobrenadante obtido a partir do extrato de células de *M. protocystis*. Os bioensaios foram realizados com réplicas. Inicialmente com duas amostras de células liofilizadas da floração do reservatório de Furnas contendo o predomínio de *M. protocystis* e em outras quatro amostras com as células liofilizadas das culturas de *M. protocystis*. Para os bioensaios foram utilizadas amostras antes e depois da pressurização. Utilizaram-se para cada bioensaio doze camundongos suíços machos albinos, com o peso variando entre 21 a 25 gramas. Foram estipuladas três faixas de dosagens (1 a 100; 101 a 500 e 501 a 1000  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  de peso corpóreo) para cada

bioensaio (Lawton *et al.*, 1994), sendo utilizados quatro camundongos por faixa. Após a morte dos camundongos os fígados foram retirados e pesados e a dosagem letal (DL<sub>50</sub>) a 50% dos organismos-teste calculada.

### 2.3 - Extração e análise da microcistina.

Segundo a metodologia descrita em Fastner *et al.*, (1988) para a extração da microcistina, utilizou-se uma solução de metanol a 75% que foi adicionada a um grama de seston ou de células liofilizadas (liofilizador marca EC Apparatus Inc., modelo Micromodulyo). Essa mistura ficou em agitação durante 1 hora em capela de exaustão.

Em sequência, a purificação da amostra para a análise por cromatografia líquida foi realizada seguindo o método proposto por Krishnamurthy *et al.*, (1986). Por esse método associado ao proposto por e Ramanan *et al.*, (2000) toda a amostra passou por três sucessivas centrifugações a 3.000 g min<sup>-1</sup> por 40 minutos cada. O sobrenadante foi evaporado em capela, à 50°C, até um terço do volume inicial. O concentrado foi purificado em um cartucho de octadecilsilano (ODS-C<sub>18</sub>), previamente ativado com seis mL de metanol a 100%, seguindo por seis mL de água ultra pura (MilliQ). Esse cartucho foi então lavado e eluído com água MilliQ, metanol 20% e por último, com metanol 75% (com 0,1% de ácido trifluoracético – TFA). Essa última fração foi recolhida e completamente seca.

Para a análise, a amostra seca foi ressuspensa em água MilliQ, sendo filtrada em um filtro de *nylon* de 0,2 µm e analisada na absorvância de 238 nm sob condições isocráticas em um cromatógrafo líquido com um detector de UV (HP1100). Foi utilizado um gradiente de acetonitrila e acetato de amônio 20 mM (pH 5 – 28/72 v/v) sendo que 1 mL.min<sup>-1</sup> foi eluído em uma coluna ((MACHEREY-NAGEL (MN) - C<sub>18</sub> 150 x 4,6 mm)). Os registros de absorvância foram coletados na razão de um espectro por segundo com uma resolução de 1,2 nm e foram comparados com o correspondente ao padrão identificado de microcistina.

As análises por espectrometria de massas foram realizadas no departamento de química da UFMG, no laboratório de química orgânica, sendo a injeção das amostras e a

programação realizadas de acordo com Yuan *et al.* (1999) e Zweigenbaum *et al.* (2000). As amostras foram injetadas diretamente (sem coluna) no espectrômetro de massas LCQ *Fleet Ion Trap MSn*, operando com ionização na pressão atmosférica ajustada com uma fonte de ionização *eletrorspray* (ESI). A temperatura do capilar e a voltagem da ionização foram mantidas em 250°C e 4 kV. O ESI foi programado como se segue: 1- aquisição da corrida completa do espectro de massas; 2- seleção do pico base do espectro de massas de acordo com o sinal limiar prefixado requerido; 3- determinação do estado de troca; 4- aquisição da corrida MS/MS com a faixa apropriada de massas para o íon. A corrida foi realizada na faixa de massas de 300 a 2000 m/z (massa/carga).

Para quantificar a microcistina foi utilizado também um kit imunoenzimático do tipo ELISA em placas (Beacon Analytical Systems. inc®).

#### 2.4 – Outras variáveis físico-químicas e biológicas.

Para avaliar as eventuais mudanças ocorridas antes e depois das amostras terem sido submetidas aos experimentos de pressurização e de exposição à luz, foram mensuradas as variáveis físico-químicas e biológicas de acordo com a Tabela 1.

Tabela 1 – Metodologias utilizadas para as análises físico-químicas e biológicas.

Parâmetros	Método	Limite de quantificação	Referências
Clorofila <i>a</i> and betacaroteno	Cromatografia líquida	qualitativo	APHA 10200 H 5
Ficobiliproteínas (ficocianina)	Espectrofotometria	0,2 mg. g <sup>-1</sup>	Bennett & Bogorad (1973) e Baussiba & Richmond (1979)
Peróxido de hidrogênio	Titulação iodométrica	0,1 mg. L <sup>-1</sup>	Mendham <i>et al.</i> , (2002) e Baker & Orlandi (1999)
Nitrato	Eletrodo específico	0,2 mg. L <sup>-1</sup>	APHA 4500 NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> D
Amônio	Destilação/ nesslerização	0,01 mg. L <sup>-1</sup>	APHA 4500 NH <sub>3</sub> C
pH	eletrométrico	Não se aplica	APHA 4500 H <sup>+</sup> B
Alcalinidades	Titulação potenciométrica	0,1 mg. L <sup>-1</sup>	APHA 2320 B
Oxigênio dissolvido	Modificação pela azida e titulação com bureta eletrônica	0,5 mg. L <sup>-1</sup>	APHA 4500 O C

OBS: APHA (2005).

O cálculo dos limites de quantificação dos métodos para as análises foi realizado de acordo com o proposto em INMETRO/ABNT (2007).

De acordo com a metodologia proposta para a análise dos pigmentos clorofila *a* e o betacaroteno, foram filtrados 10 mL de cultura de *M. protozoensis* em filtros de fibra de vidro GF 50-A, sendo a extração realizada em acetona 90%. Foi utilizada uma coluna fase reversa para CLAE (250 x 4,6 mm, C<sub>18</sub>, 5 µm). Foram injetados 100 µL de amostra com um fluxo de 0,8 mL.min<sup>-1</sup> com um gradiente linear. A clorofila *a* foi lida a 664 nm e o betacaroteno a 453 nm com um detector de fluorescência.

Para a análise das ficobiliproteínas foi quantificada a ficocianina que geralmente é a que está presente em maior quantidade nas células das cianobactérias, especialmente em espécies do gênero *Microcystis* (Hishimoto, Ioriya & Otsuki, 1995 e Bodemer, 2004). A ficocianina foi extraída para os experimentos *in vivo* em um tampão fosfato de pH 9,0 e lida em um espectrofotômetro a 620 nm de acordo com Bennett & Bogorad (1973), Baussiba & Richmond (1979) e Gajdek *et al.* (2004). Para a verificação qualitativa da presença de ficobiliproteínas intra e extracelulares utilizou-se um dispositivo de epifluorescência com um filtro na cor verde.

As análises das alcalinidades foram realizadas nas amostras das culturas sendo caracterizados os ânions formadores (alcalinidade de bicarbonato, alcalinidade de carbonato e alcalinidade de hidróxido). A titulação até atingir os valores de pH tabelados, conforme previsto em APHA (2005), foi realizada com ácido sulfúrico 0,02 N.

## 2.5 - Relação entre o peróxido de hidrogênio, a ficocianina e a microcistina.

De acordo com Zepp *et al.*, (1992) a produção das espécies ativas de oxigênio está diretamente relacionada com o valor do pH do meio. Esses autores mencionaram que há formação de radicais hidroxil (OH<sup>•</sup>) por meio da reação de foto-Fenton em uma faixa de pH de 3 a 8. Por isso, após a escolha dos parâmetros físico-químicos que poderiam ter uma relação com a redução da toxicidade da microcistina *in vivo*, foram

realizados novos experimentos *in vitro*, nos quais foram dosadas concentrações conhecidas de peróxido de hidrogênio com a posterior avaliação das alterações nas concentrações de microcistina e de ficocianina.

Para a extração da microcistina e da ficocianina foi realizado um experimento para se verificar em qual valor de pH das soluções tampão fosfato as extrações da ficocianina e da microcistina seriam extraídas em maiores concentrações, já que a ativação das espécies ativas de oxigênio dependia da presença da ficocianina para sofrer uma fotooxidação.

Para esse experimento foram utilizadas soluções tampões nos pHs 9, 7 e 4. A amostra de cultura, após atingir a fase *log* de crescimento (aproximadamente  $1 \times 10^7$  cels mL<sup>-1</sup>), foi centrifugada a 3.000 g min<sup>-1</sup> por 20 minutos e o sobrenadante desprezado. O sedimentado contendo as células foi então pesado para o cálculo do peso da amostra, componente da fórmula para o cálculo da concentração de ficocianina. Em seguida, as amostras foram pressurizadas por aproximadamente 12 horas ao abrigo total da luz para a liberação da microcistina e da ficocianina. Depois se adicionou as referidas soluções tampões e as amostras foram congeladas e descongeladas, sempre no escuro. Novamente as amostras foram centrifugadas por 10 minutos a 3.000 g min<sup>-1</sup>, onde se recolheu o sobrenadante.

Foi então realizada a leitura da concentração de ficocianina (no sobrenadante) a 620 nm e foi analisada a concentração de microcistina sobrenadante (fração já solubilizada) com o uso do kit ELISA. Foram então adicionadas as dosagens de peróxido de hidrogênio (de 0,4; 0,8 e 1,6 mg L<sup>-1</sup>). Após a exposição à luz (40 μmoles de fótons m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>) por aproximadamente 12 horas, foram analisadas as concentrações de microcistina e de ficocianina. O desenho experimental está ilustrado na Figura 6.

## Desenho experimental 2

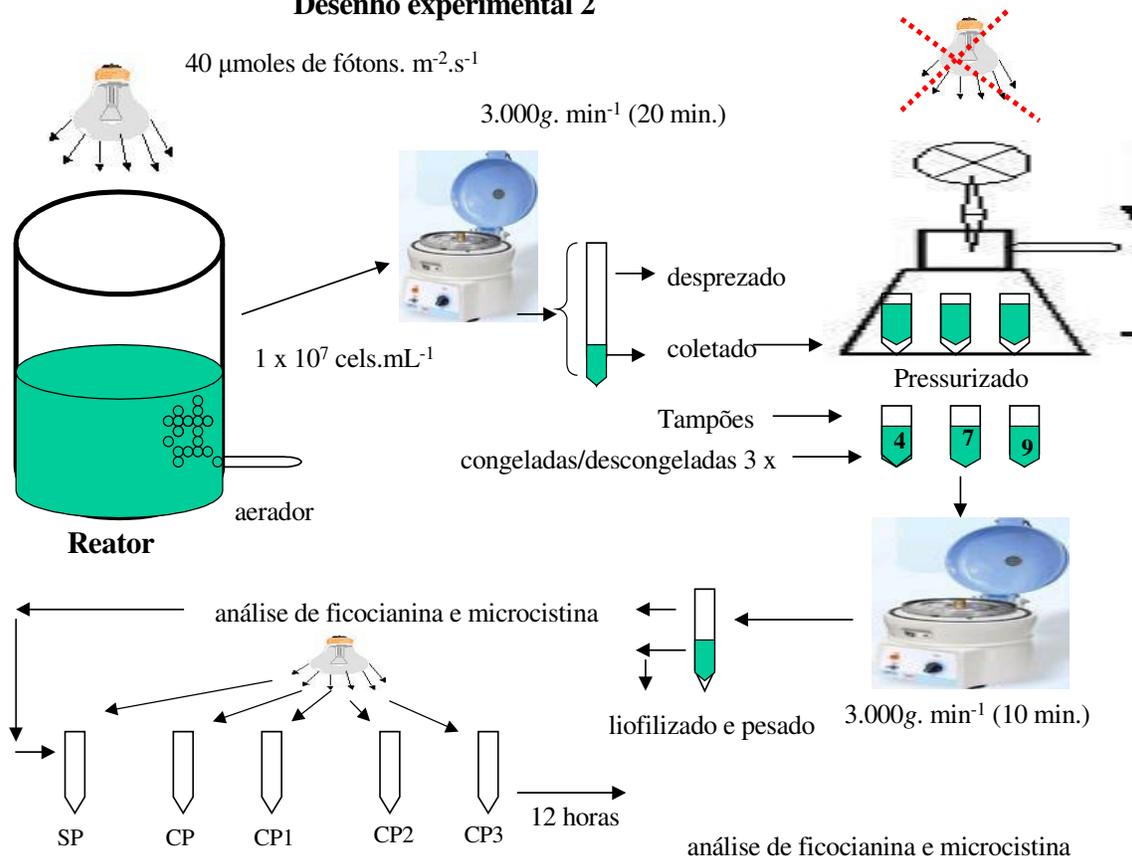


Fig. 6: Desenho experimental das análises de microcistina e de ficocianina com diferentes dosagens de peróxido de hidrogênio. SP: amostras sem pressão com e sem H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; CP: amostra pressurizada sem H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; CP1: amostra pressurizada com 0,4 mg.L<sup>-1</sup> de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; CP2: amostra pressurizada 0,8 mg.L<sup>-1</sup> de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; CP3: amostra pressurizada com 1,6 mg.L<sup>-1</sup> de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

### 2.6 - Relação entre a microcistina solúvel, a microcistina particulada e a ficocianina.

Visando avaliar se uma concentração de microcistina adicionada ao experimento seria também oxidada, como a microcistina intracelular, foi realizado um outro experimento conforme descrição a seguir: duas espécies de cianobactérias do banco de culturas do laboratório central da COPASA foram selecionadas, *M. protocystis* produtora de microcistina RR (HBRF01) e *Sphaerocavum brasiliense* (HBBN01) não produtora de microcistina.

Os cultivos receberam os mesmos tratamentos durante o experimento. As culturas foram centrifugadas a 4°C, a 3.000 g  $\text{min}^{-1}$  por 20 minutos, o sobrenadante desprezado e o sedimentado pesado. Foram adicionados 5 mL do tampão fosfato pH 9 e as amostras foram congeladas e descongeladas por três vezes sempre no escuro.

Novamente as amostras foram centrifugadas nas mesmas condições acima, o sobrenadante recolhido e foram analisadas as concentrações de microcistina em cada extrato de ambas as espécies. Nos oito tubos foram adicionados  $100 \mu\text{g.L}^{-1}$  de microcistina purificada de *M. protocystis* por cromatografia líquida e identificada por espectrometria de massas.

Foram analisadas novamente as concentrações de microcistina sendo que a metade dos tubos (4) foi submetida a pressão e a luz por um período de 12 horas. Foram então avaliadas as concentrações de microcistina nos extratos. O desenho experimental está representado na Figura 7.

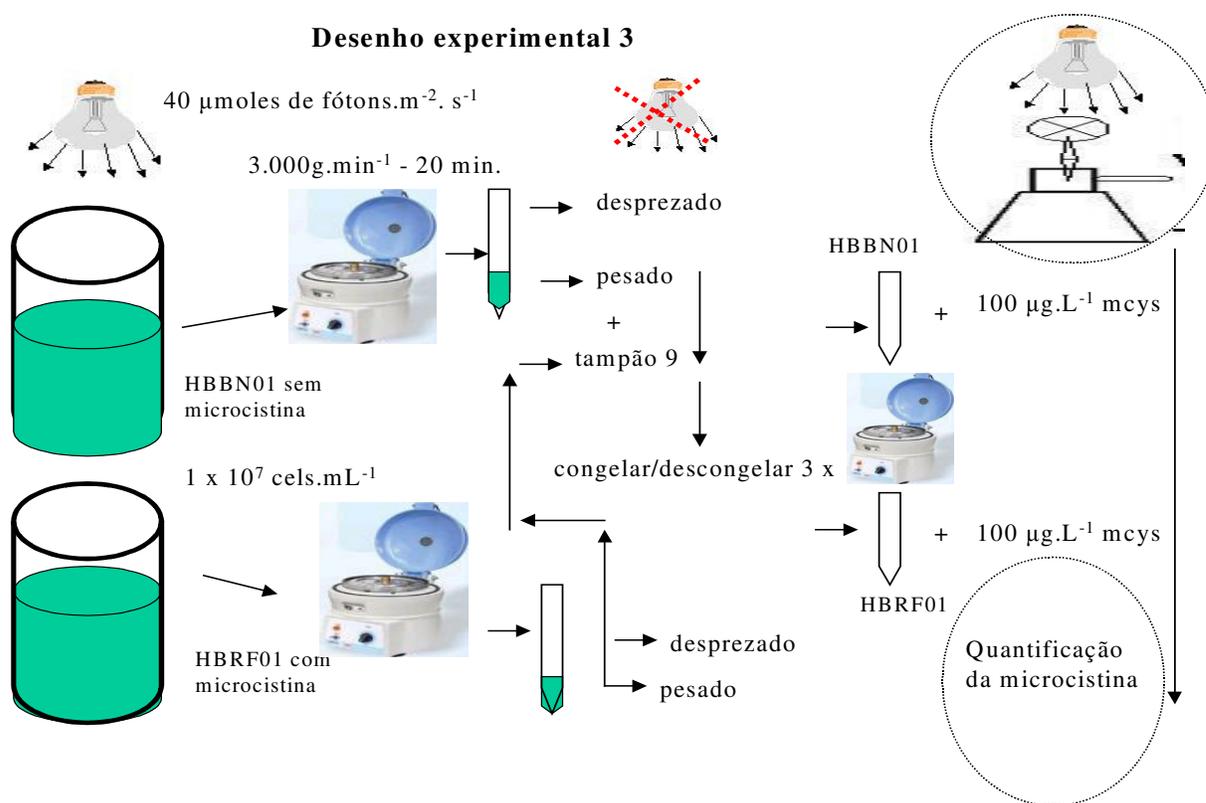


Fig. 7: Desenho experimental das análises de microcistina após a adição de microcistina aos extratos de *S. brasiliense* e *M. protocystis*.

## 2.7 - Relação entre a ficocianina e a microcistina no claro e no escuro.

Para avaliar também a influência da ficocianina no processo de redução da toxicidade da microcistina foi realizado um experimento no qual se suprimiu a ficocianina conforme o procedimento descrito a seguir: Foram adicionados 10 mL da

cultura de *S. brasiliense*, não produtora de microcistina, em oito tubos centrífuga previamente secos e pesados. Essas amostras foram então centrifugadas a 4°C, a 3.000 g min<sup>-1</sup> por 20 minutos, em uma centrífuga da marca Nova Técnica, modelo NT825 e o sobrenadante desprezado.

Foram então adicionados ao centrifugado 5 mL do tampão fosfato pH 9 e as amostras foram congeladas e descongeladas por três vezes sempre no escuro. Novamente as amostras foram centrifugadas nas mesmas condições acima, o sobrenadante recolhido e o sedimentado liofilizado e pesado.

Os quatro primeiros tubos com o sobrenadante foram deixados na geladeira a aproximadamente 4 °C, no escuro, já os outros quatro tubos foram deixados sob a luz (40 μmoles de fótons m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>). Após aproximadamente 16 horas, a concentração de ficocianina foi medida de acordo com Bennett & Bogorad (1973) e Baussiba & Richmond (1979). Pela fórmula de cálculo proposta por esses autores, a ficocianina intracelular foi medida em miligramas de ficocianina por um grama de amostra.

Foram então adicionados 100 μL de microcistina - RR (extraída da cepa HBRF01) em cada tubo contendo os extratos clarificados do cultivo de *S. brasiliense*. Após essa etapa foi medida a concentração inicial de microcistina em cada tubo. Dois tubos das amostras que ficaram no escuro e dois tubos das amostras que ficaram expostas à luz anteriormente, ficaram expostos à luz (40 μmoles de fótons m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>). Nesse mesmo experimento, dois tubos das amostras que ficaram no escuro e outras duas amostras que ficaram expostas à luz, passaram a ficar ao abrigo da luz. As concentrações de ficocianina e de microcistina foram medidas após 14 horas de experimento. A Figura 8 ilustra o desenho experimental.

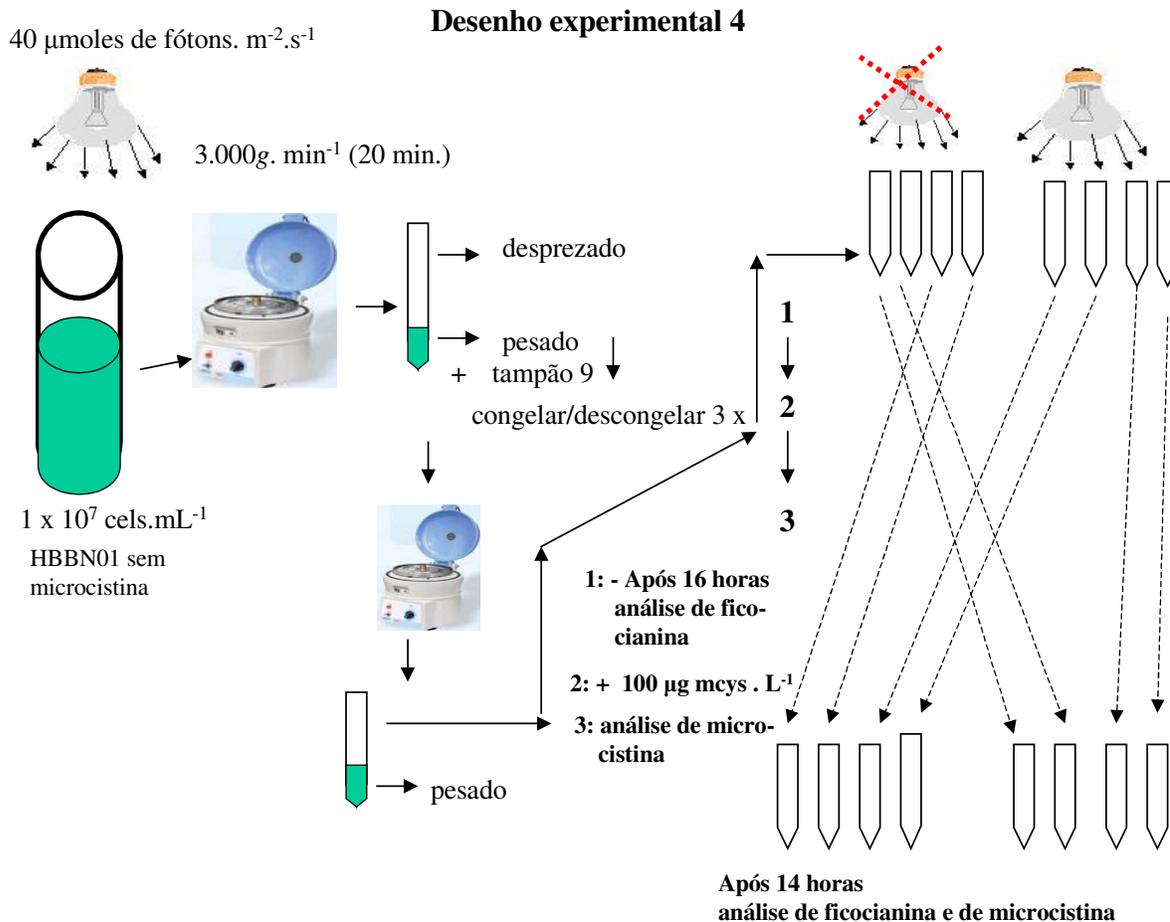


Fig. 8: Desenho experimental das an\u00e1lises de microcistina e de ficocianina no claro e no escuro.

## 2.8 - Relat\u00e7\u00e3o entre o betacaroteno e a microcistina.

A partir da conclus\u00e3o dos trabalhos de Halliwell & Gutteridge (1989) de que o betacaroteno \u00e9 uma mol\u00e9cula antioxidante para o oxig\u00eanio singlete, realizou-se um experimento com a adi\u00e7\u00e3o de tr\u00eas diferentes concentra\u00e7\u00f5es conhecidas de um padr\u00e3o de betacaroteno (Sigma tipo II sint\u00e9tico) em amostras da cultura de *M. protocystis* submetidas a press\u00e3o (fra\u00e7\u00e3o sol\u00favel), visando uma avalia\u00e7\u00e3o indireta da presen\u00e7a de esp\u00e9cies ativas de oxig\u00eanio.

Foram adicionados 10 mL do cultivo de *M. protocystis* em dez tubos centr\u00edfuga previamente pesados. Essas amostras foram ent\u00e3o centrifugadas a 4\u00b0C, a 3.000  $\text{g min}^{-1}$  por 20 minutos e o sobrenadante desprezado. Foram adicionados 5 mL da solu\u00e7\u00e3o tamp\u00e3o fosfato pH 9 em cada tubo. As amostras ent\u00e3o foram congeladas e

descongeladas por três vezes para ao rompimento das células e liberação da microcistina. Os tubos contendo as amostras foram então centrifugados novamente e o sobrenadante recolhido.

Foi analisada a concentração de microcistina inicial nas dez amostras. Duas amostras (amostra e réplica) foram deixadas sobre a bancada sem serem pressurizadas e em quatro pares de amostras que foram pressurizadas foram adicionadas concentrações crescentes de betacaroteno, sendo que o primeiro par de amostras não recebeu nenhuma concentração de betacaroteno, já o segundo par de amostras recebeu 250  $\mu\text{L}$  ( $0,25 \mu\text{g.L}^{-1}$ ), o terceiro par de amostras recebeu 500  $\mu\text{L}$  ( $0,50 \mu\text{g.L}^{-1}$ ) e por último, o quarto par de amostras, recebeu 1000  $\mu\text{L}$  ( $1,0 \mu\text{g.L}^{-1}$ ).

Todas as amostras foram expostas à luz ( $40 \mu\text{moles de fótons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) por 16 horas. Após o experimento foram analisadas as concentrações de microcistina finais. A Figura 9 ilustra o desenho do experimento.

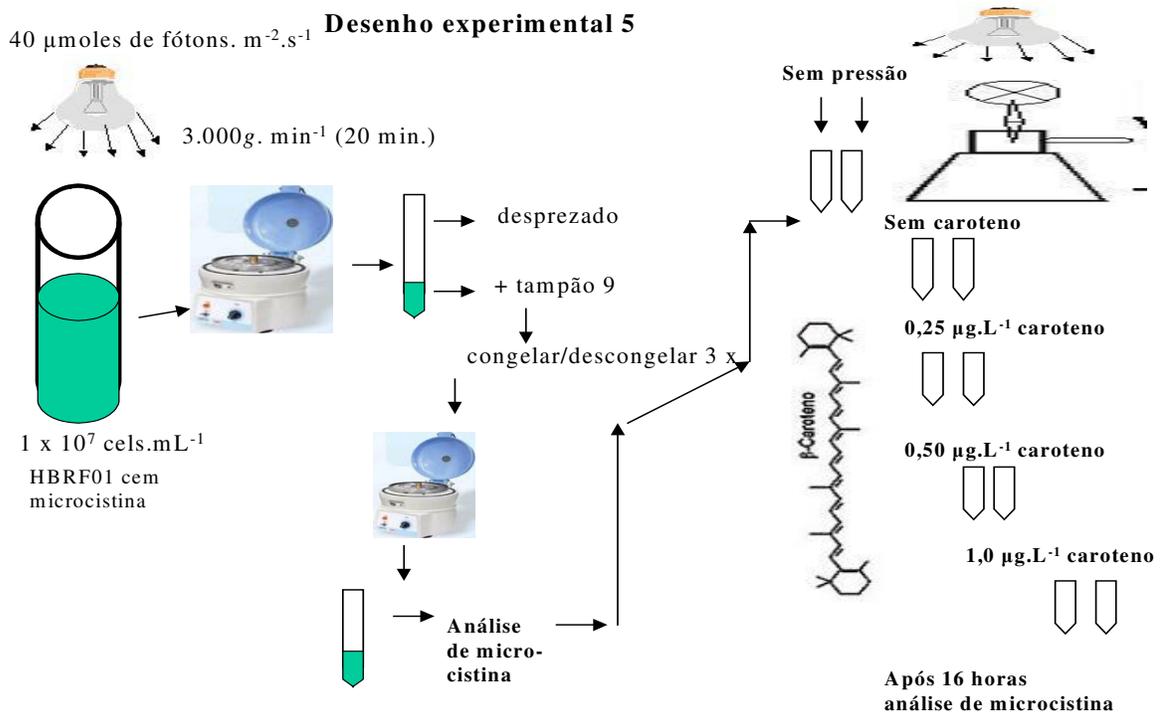


Fig. 9: Desenho experimental das análises de microcistina para o teste do betacaroteno.

## 2.9 - Tratamento estatístico

Os resultados obtidos nas amostras controle e nos demais tratamentos experimentais foram analisadas por meio de análise de variância (*one-way* ANOVA) ou não paramétricos (teste de Kruskal-Wallis ANOVA) com significância menor ou igual a 0,05. As repetições realizadas estão expressas nos resultados como **n** (número de réplicas).

### 3 - RESULTADOS DO CAPÍTULO I.

#### 3.1 - Resultados dos bioensaios com camundongos

Os valores da  $DL_{50}$  obtidos a partir dos resultados dos bioensaios realizados com a amostra da floração da represa de Furnas onde havia o predomínio de *M. protocystis* foram de  $63 \text{ mg.Kg}^{-1}$  de peso corpóreo, antes das amostras ficarem expostas à luz e de serem pressurizadas e de  $878 \text{ mg.Kg}^{-1}$  de peso corpóreo, após as amostras terem sido expostas à luz e pressurizadas. Os camundongos morreram com os sintomas característicos de uma hepatotoxicose. De acordo com a tabela proposta por Lawton *et al.* (1994), a toxicidade passou da classe de elevada para baixa toxicidade após a pressurização da amostra.

Os resultados dos bioensaios realizados com as amostras da cultura de *M. protocystis* antes de serem submetidas às mesmas condições experimentais foram de uma  $DL_{50}$  de  $46,5 \text{ mg.Kg}^{-1}$  de peso corpóreo. Após a exposição às condições experimentais, a  $DL_{50}$  passou a ser de  $993,5 \text{ mg.Kg}^{-1}$  de peso corpóreo. Nesses testes, os animais morreram também com os sintomas característicos de uma hepatotoxicose. Após a morte dos camundongos os fígados apresentaram uma relação entre o peso corpóreo dos animais de 9%, indicando uma dilatação desse órgão. As amostras submetidas à pressão apresentaram uma redução de sua toxicidade aproximadamente 20 vezes.

#### 3.2 - Resultados da cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

Nos cromatogramas obtidos por meio da CLAE do extrato metanólico de *M. protoctyctis* antes e após a pressurização das amostras, pode-se observar duas situações (Figura 10).

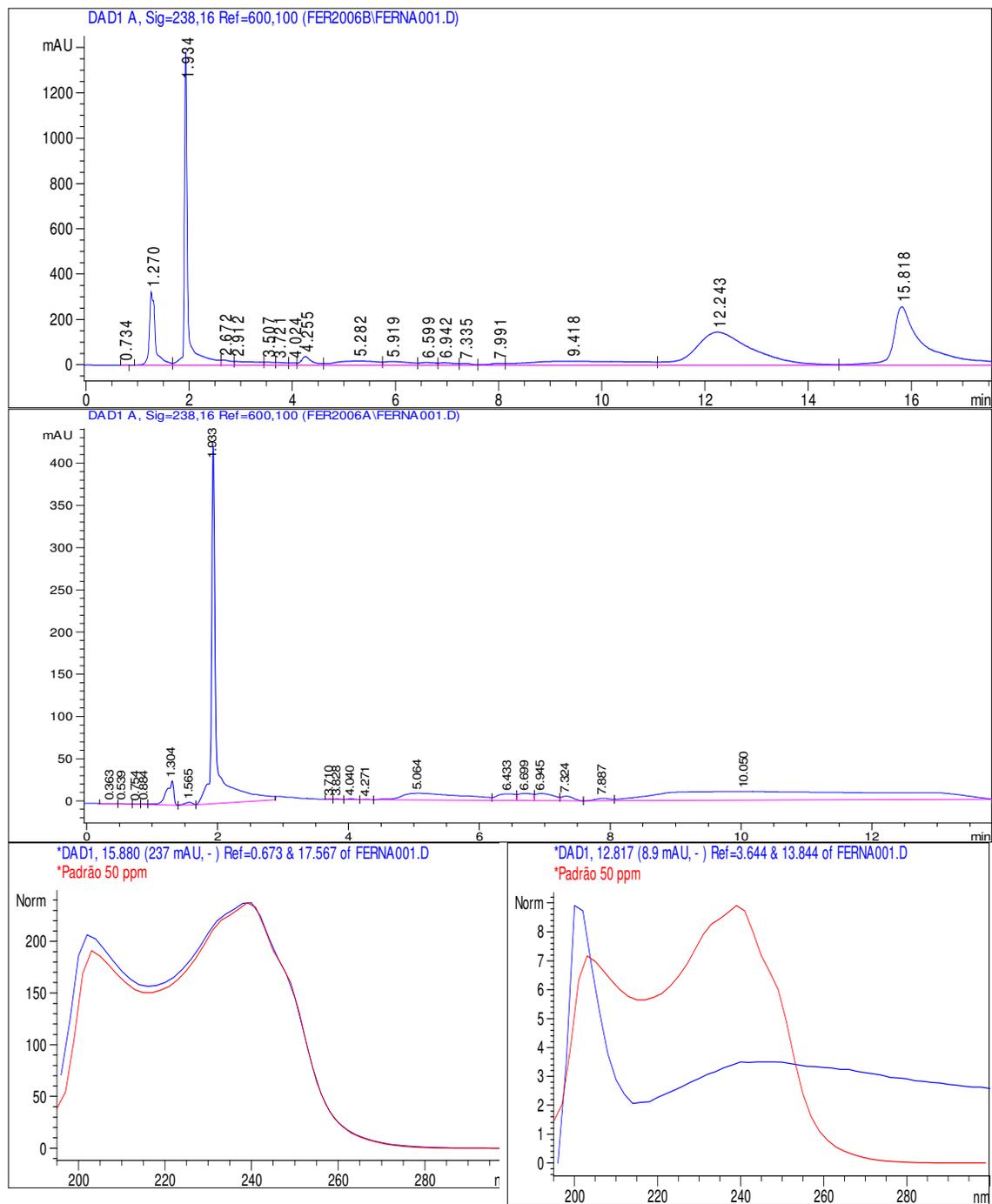


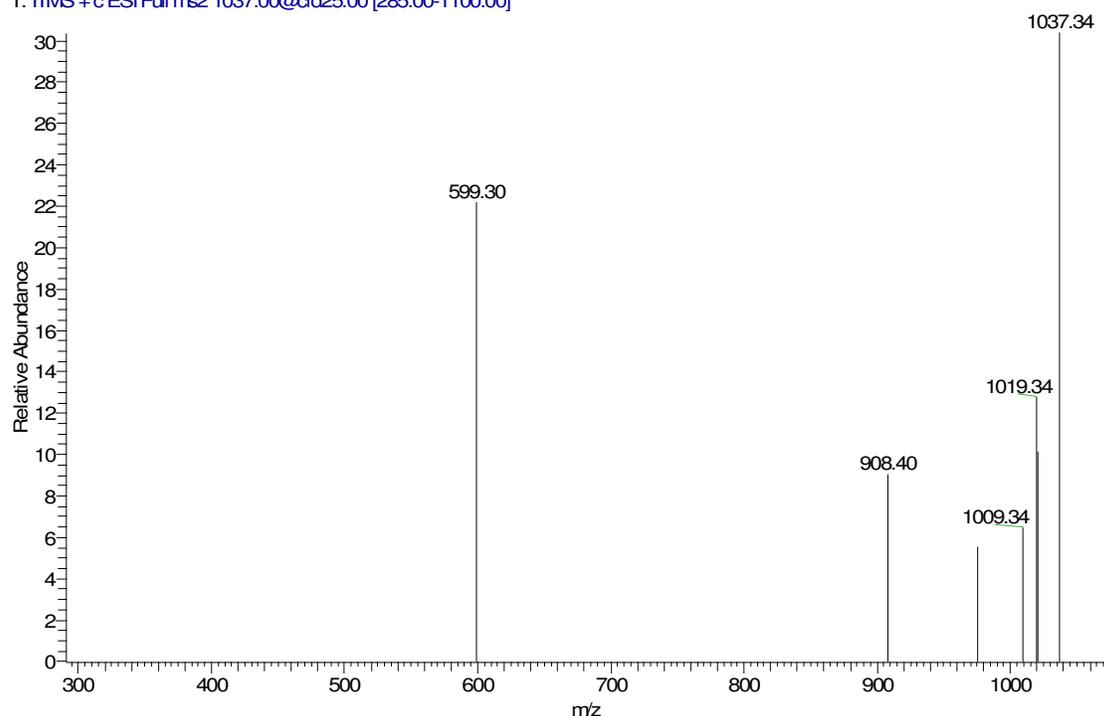
Fig. 10: Cromatogramas com os espectros UV (238 nm) da microcistina (12,2 min.) por CLAE da cultura de *M. protoctyctis* antes (primeiro cromatograma) e depois (segundo cromatograma) após as células terem sido submetidas à pressão sob a luz e espectro de absorção a 238 nm.

No primeiro cromatograma foi possível identificar um pico (12,2 min) que de acordo com a comparação feita com o espectro DAD (espectro da esquerda) do padrão de microcistina, foi obtido um índice de similaridade de 0,982 e uma concentração de 34,0  $\mu\text{g.L}^{-1}$  equivalentes de microcistina-LR. Já no segundo cromatograma, após a amostra ter sido submetida à pressão, não ficou evidenciado o pico no tempo de detenção característico da microcistina e o espectro de absorção a 238 nm (a direita da Figura) ficou descaracterizado.

### 3.3 - Resultados da espectroscopia de massas.

No espectro de massas obtido da amostra que não foi submetida à pressão a microcistina RR foi identificada como a principal componente da amostra (Figura 10 – primeiro espectrograma). De acordo com Kusumi *et al.* (1987) foi identificada a massa de 1.037  $[\text{M} + \text{H}]^+ m/z$ , correspondente à microcistina RR. Após a amostra de cultura de *M. protocystis* ter sido exposta à luz e pressurizada foi obtido o espectro de massas da Figura 11 (segundo espectrograma).

1037.25 eV FEFN SP\_081009155133 #1 RT: 0.00 AV: 1 NL: 2.17E1  
T: ITMS + c ESI Full ms2 1037.00@cid25.00 [285.00-1100.00]



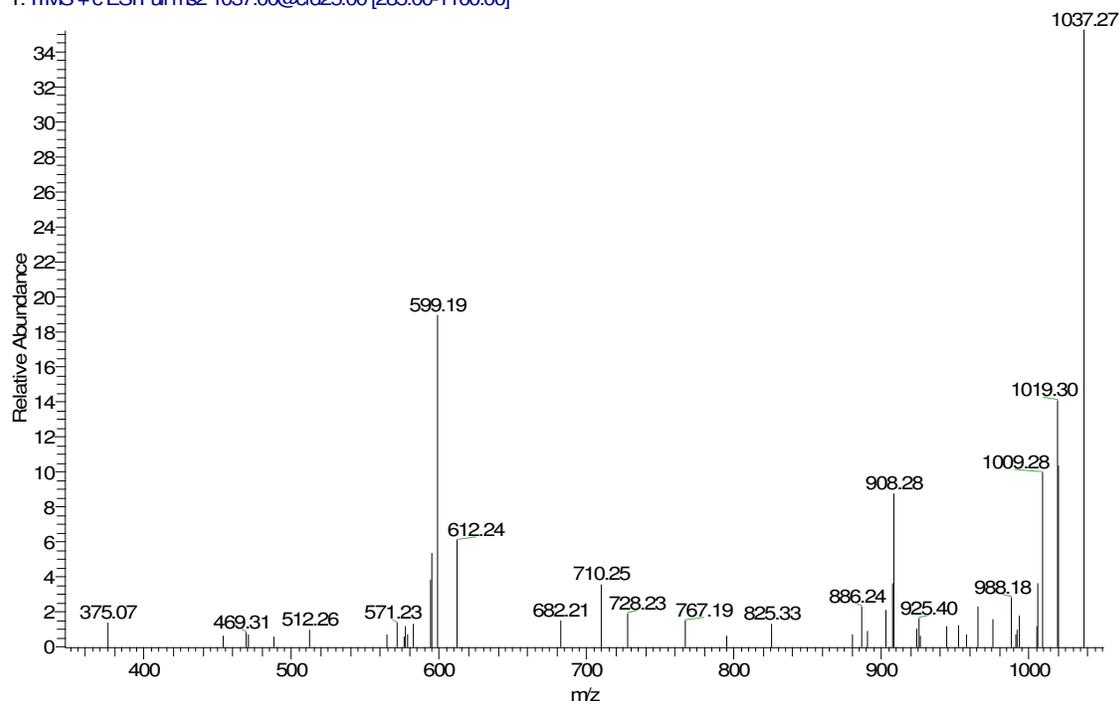


Figura 11: Espectros de massas do pico de microcistina RR isolada do extrato de células de *M. protocystis*, antes e após o experimento. Íon molecular  $[M + H]^+$  e características do padrão de fragmentação.

O íon de  $m/z$  1037 (correspondente à microcistina RR – 1) foi detectado nos ESI (+) – MS das amostras antes e após o tratamento. Um dado a mais obtido, nesse caso, foi o espectro MS/MS, no qual selecionou-se e fragmentou-se um íon precursor. O padrão de fragmentação desse íon trouxe informações a respeito de sua estrutura em ambos os tratamentos. Salienta-se que os espectros foram adquiridos por 1,5 minutos com a mesma voltagem e se mostraram estáveis durante todo o tempo.

Por meio da Figura 11 que também apresenta o espectro obtido após o experimento, foram caracterizadas partes estruturais da molécula de microcistina, não encontradas antes do tratamento. De acordo com e Yuan *et al.* (1999), Zwegenbaun *et al.* (2000), Dahlman *et al.* (2003) e Mayumi *et al.* (2006), os íons detectados após a amostra de cultura ter sido exposta à luz e submetida à pressão correspondem aos fragmentos da molécula de acordo com a Tabela 2.

Tabela 2 – Fragmentos obtidos da molécula de microcistina RR antes a após a amostra de cultura de *M. protocystis* ter sido submetida à luz e a pressão e os fragmentos correspondentes.

Íons (m/z)	Fragmentos correspondentes
375	Adda-Glu-Mdha (- 135)
599	Arg-Adda-Glu
439	Glu-Dhb-Ala-Arg
512	Demetilmicrocistina RR
682	Arg-Adda-Glu-Mdha
710	MeAsp-Arg-Adda-Glu (- H <sub>2</sub> O)
782	MeAsp-Arg-Adda-Glu

Onde: MeAsp é o ácido D-eritro-β-metilaspártico; Adda é (2S, 3S, 8S, 9S)-3-amino-9-metoxi-2,6,8-trimetil-10-fenildeca-4,6-ácido dienóico, Mdha é N-metildehidroalanina (Dha = dehidroalanina), Arg é a arginina, Ala é a alanina e Glu é o glutamato.

### 3.4 - Resultados da cromatografia líquida de alta eficiência da clorofila a e do betacaroteno.

Os resultados das análises de clorofila *a* e de betacaroteno após a amostra ter sido submetida à pressão, mostraram que não houve reduções nas suas respectivas concentrações (Figura 12).

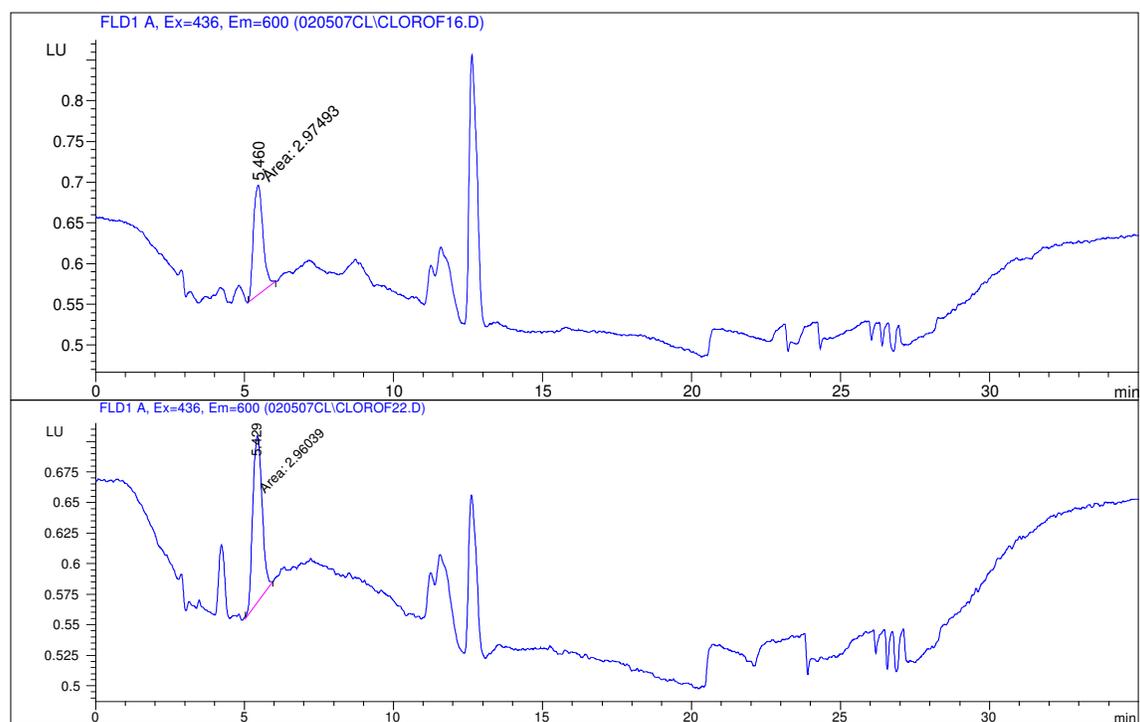


Fig. 12: CLAE cromatograma da clorofila *a* (13 min.) e de betacaroteno (22 min) do extrato etanólico de células de *M. protocystis* antes (primeiro cromatograma) e após (segundo cromatograma) as células terem sido submetidas às condições experimentais.

Não foi observada nenhuma alteração no cromatograma após as amostras terem sido submetidas à pressão. A clorofila *a* e o betacaroteno são solúveis em solventes orgânicos como o metanol e a acetona, provavelmente devido a isso, quando a células foram submetidas a uma pressão em meio aquoso, esses pigmentos não apresentaram alterações significativas. No entanto, as ficobiliproteínas que se localizam na parte mais externa das membranas dos tilacóides (Vermaas *et al.*, 2008) e são hidrosolúveis, foram expelidas das células durante o estresse osmótico causado pelo aumento da pressão. As ficobiliproteínas, representadas principalmente pela ficocianina (que foi lida a 620nm), ao serem expostas à luz, foram fotooxidadas conforme observado por meio da Figura 13.

### 3.5 - Resultados dos outros parâmetros químicos das análises realizadas *in vivo*.

Os resultados das concentrações de ficobiliproteínas (ficocianina) intracelulares apresentaram uma redução após a amostra ter sido submetida à pressão e exposta à luz (Figura 13).

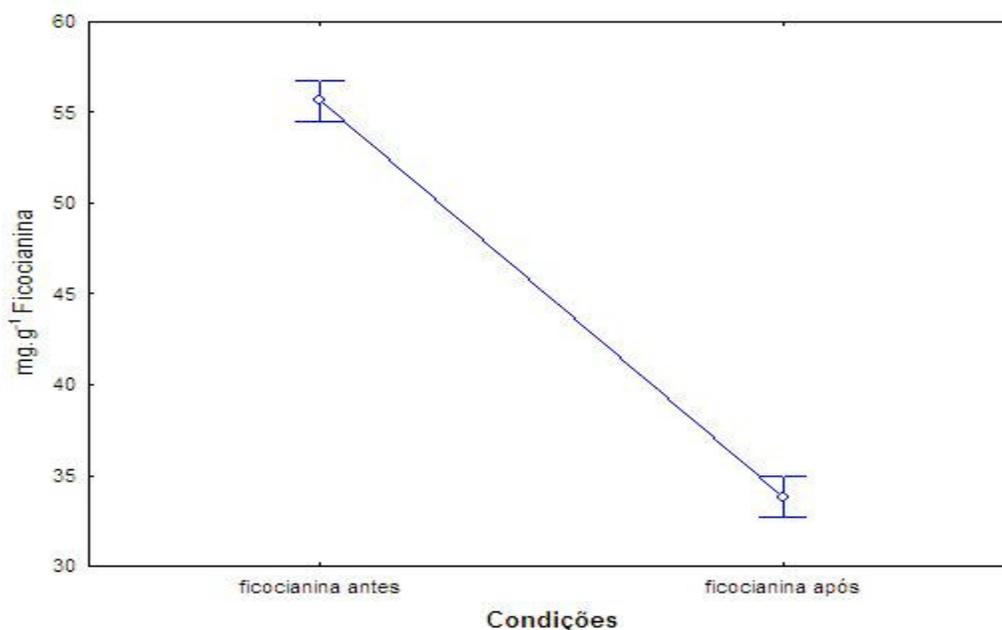


Fig. 13: Concentração de ficocianina (mg.g<sup>-1</sup>) extraída da cultura de *M. protocystis* sem ser submetida à luz e a pressão e após ter sido submetida. ANOVA n = 10,  $P \leq 0,05$

Essa redução da ficocianina foi devida a sua liberação pela ação da pressão sofrida pelas células com a consequente fotooxidação pela luz.

Os resultados das análises da concentração de peróxido de hidrogênio mostraram uma produção média de  $1,8 \text{ mg.L}^{-1}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  após as amostras do cultivo de *M. protocystis* terem sido submetidas à pressão, indicando uma resposta ao estresse osmótico.

Os resultados das análises de nitrogênio devido a nitratos, nitrogênio amoniacal, pH e oxigênio dissolvido estão expressos na Figura 14.

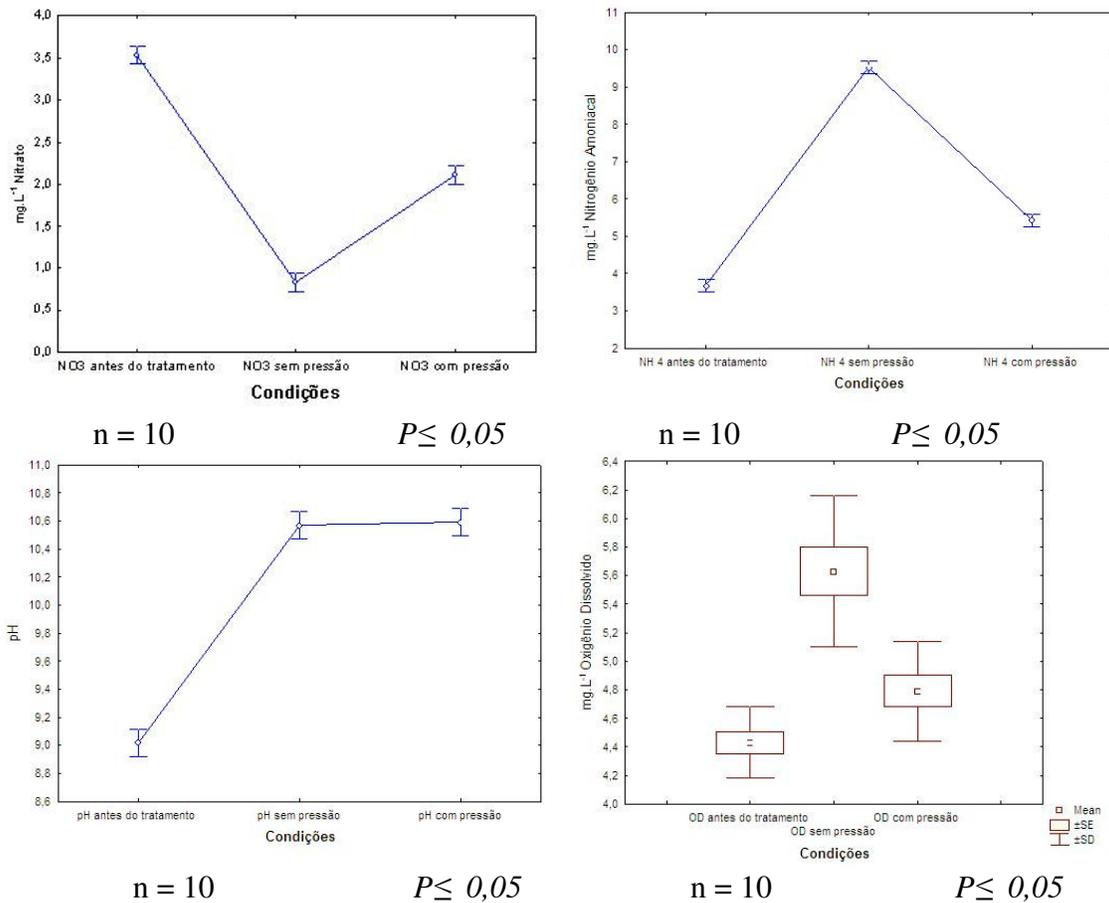


Figura 14 – Resultados das análises de nitrato, amônio, pH e oxigênio dissolvido das amostras antes do tratamento; sem terem sido submetidas à pressão no dia do experimento e submetidas à pressão.

Os resultados das análises de alcalinidades expressos na Figura 15.

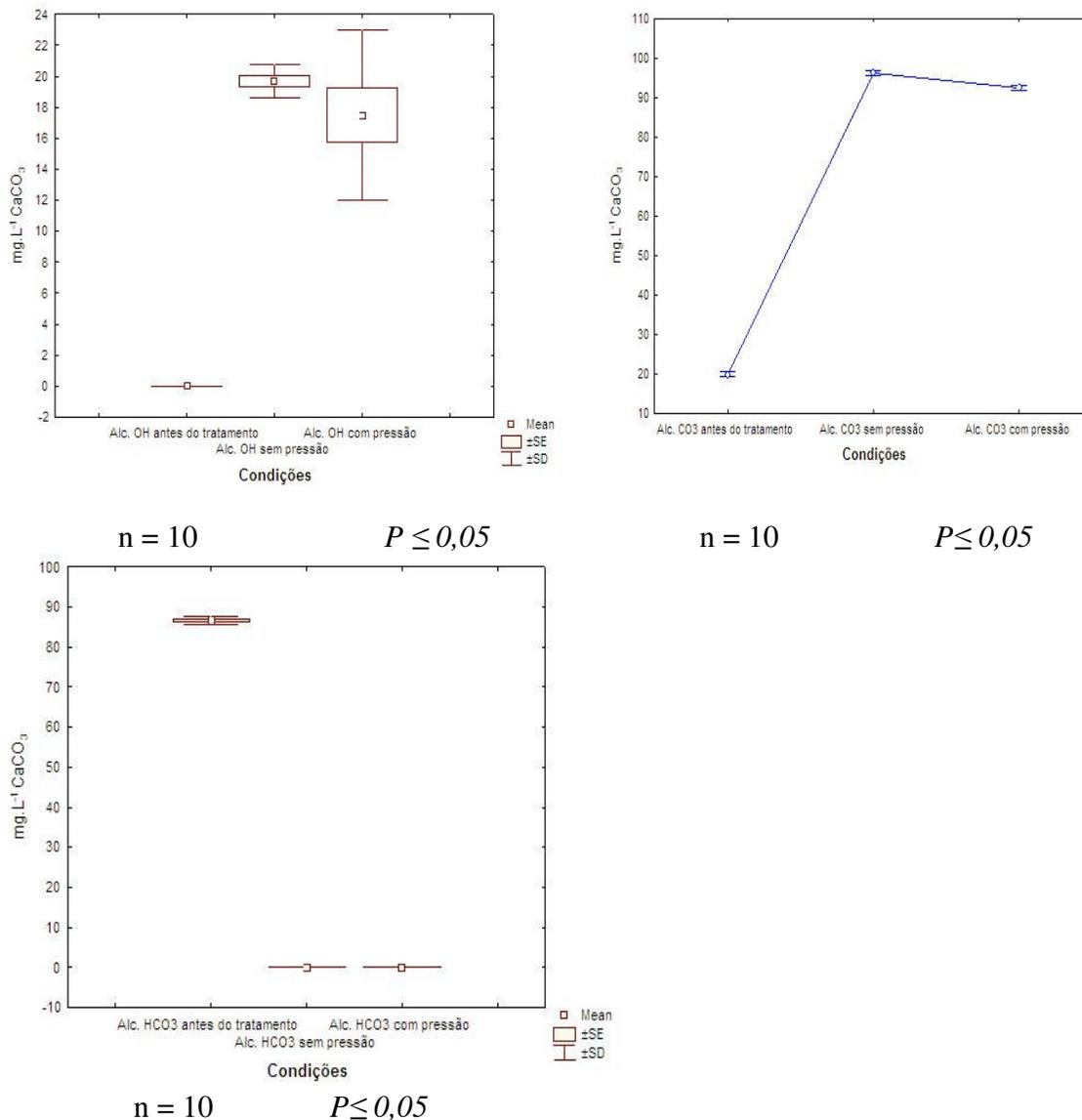


Figura 15 – Resultados das análises de alcalinidades das amostras antes do tratamento; sem terem sido submetidas à pressão no dia do experimento e submetidas à pressão.

Observou-se um aumento na concentração de nitrato e uma redução na concentração de nitrogênio amoniacal, após as amostras terem sido expostas à luz e submetidas à pressão. Essa constatação indica a ocorrência de um processo oxidativo. A concentração de oxigênio dissolvido, embora tenha sido suprimida a aeração da cultura, a princípio aumentou devida provavelmente à própria produção fotossintética, mas sofreu uma redução, após a amostra ter sido submetida à pressão, indicando ter ocorrido um consumo (redução) de oxigênio dissolvido após o experimento.

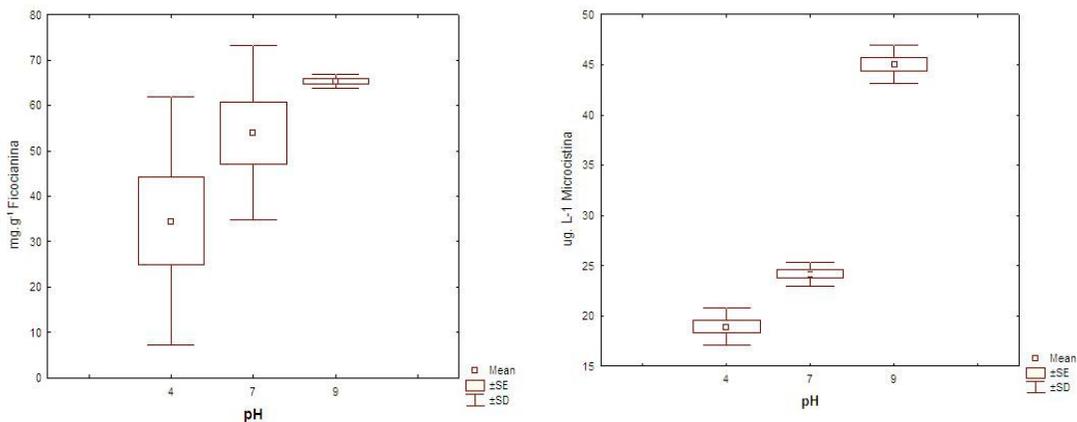
O pH manteve-se sempre acima de nove, característico de uma cultura de algas (na fase exponencial de crescimento) e de florações na presença de luz. Logo após ter

sido suprimida a aeração da cultura, observou-se uma elevação do pH, que passou de nove para 10,6 no dia seguinte. Observou-se também um pequeno aumento do pH, embora significativo, após as amostras terem sido submetidas à pressão. Essa condição refletiu também nos resultados de alcalinidade, pois os resultados encontrados antes do tratamento aplicado evidenciaram a ausência de alcalinidade devida à hidróxidos ( $\text{OH}^-$ ), apresentando as alcalinidades devidas à carbonatos ( $\text{CO}_3^{2-}$ ) e à bicarbonatos ( $\text{HCO}_3^-$ ). No dia seguinte (no dia do experimento), a amostra que não foi submetida à pressão, apresentou a alcalinidade devida à hidróxidos (pH de 10,6) e à carbonatos, não apresentado mais a alcalinidade devida à bicarbonatos.

A alcalinidade devida à hidróxidos sofreu um pequeno acréscimo, embora significativo. Já a alcalinidade devida à carbonatos apresentou uma redução significativa e a alcalinidade devida à bicarbonatos manteve-se nula. A redução significativa da alcalinidade de bicarbonato pode ter sido devida a uma limitação de gás carbônico para a realização da fotossíntese e isso pode ter induzido a fotoredução do oxigênio no fotossistema I, devido a uma limitação do oxigênio dissolvido. Essa consideração foi corroborada por meio dos resultados das análises de oxigênio dissolvido. Esse consumo de oxigênio, além de poder estar associado à oxidação de amônio, pode ter sido devido também à foto redução a oxigênio singleto ou até mesmo a oxidação de outras espécies químicas não analisadas como o nitrito, por exemplo.

### 3.6 - Resultados das análises químicas realizadas *in vitro*.

Com relação à escolha do melhor pH das soluções tampões onde foi possível uma melhor extração da ficocianina e da microcistina, os resultados estão expressos na Figura 16.



Kruskal-Wallis ANOVA n = 08,  $P \leq 0,05$

n = 08,  $P \leq 0,05$

Figura 16: Concentrações de ficocianina e de microcistina extraídas do cultivo em três diferentes pH de soluções tampões antes dos experimentos.

De acordo com a Figura 16, conforme proposto por Bennett & Bogorad (1973) e Baussiba & Richmond (1979), obteve-se uma maior extração de ficocianina quando se utilizou a solução tampão pH 9. As melhores reduções das concentrações de microcistina relacionadas com as relativas dosagens de peróxido de hidrogênio foram visualizadas a seguir. A Figura 17 representa as reduções das concentrações de microcistina quando se utilizou a solução tampão fosfato pH 9.

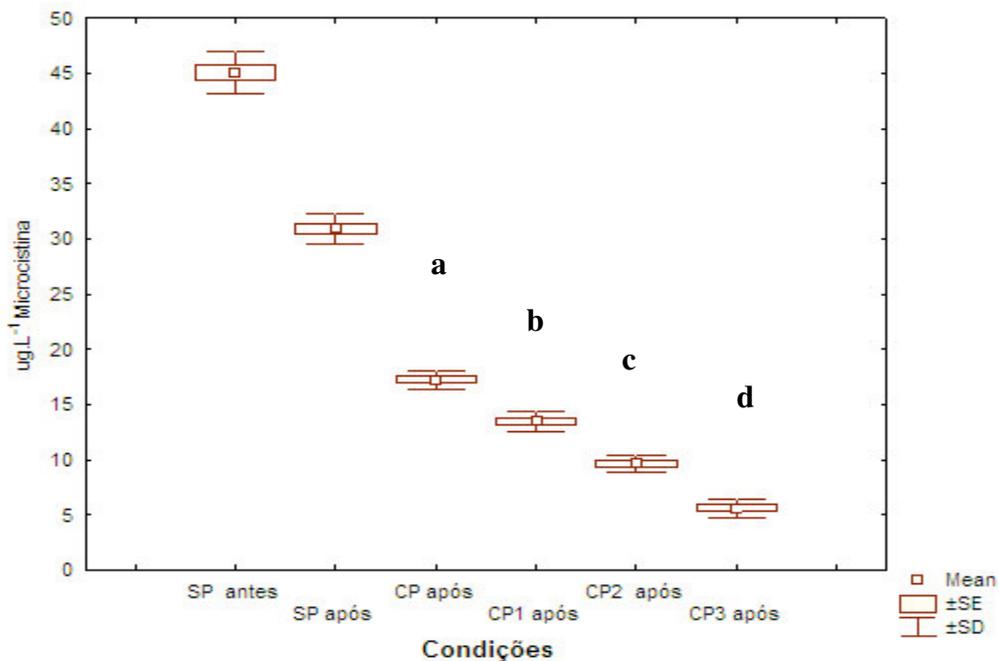


Figura 17: Concentrações de microcistina antes e após as amostras terem sido submetidas à luz e à pressão e a dosagem de peróxido de hidrogênio na solução tampão pH 9. Kruskal-Wallis ANOVA n = 08, letras minúsculas indicam diferenças significativas entre as dosagens.

**Legenda:** SP antes: amostras não pressurizadas no início do teste; SP após: amostras não pressurizadas no final do teste; CP após: amostras pressurizadas sem a dosagem de peróxido; CP1: amostras pressurizadas com 0,4 mg.L<sup>-1</sup> de peróxido; CP2: 0,8 mg.L<sup>-1</sup> de peróxido e CP3: 1,6 mg.L<sup>-1</sup> de peróxido.

Os resultados do mesmo teste utilizando o peróxido de hidrogênio, no entanto, quando em solução de tampão fosfato pH 7, estão expressos na Figura 18.

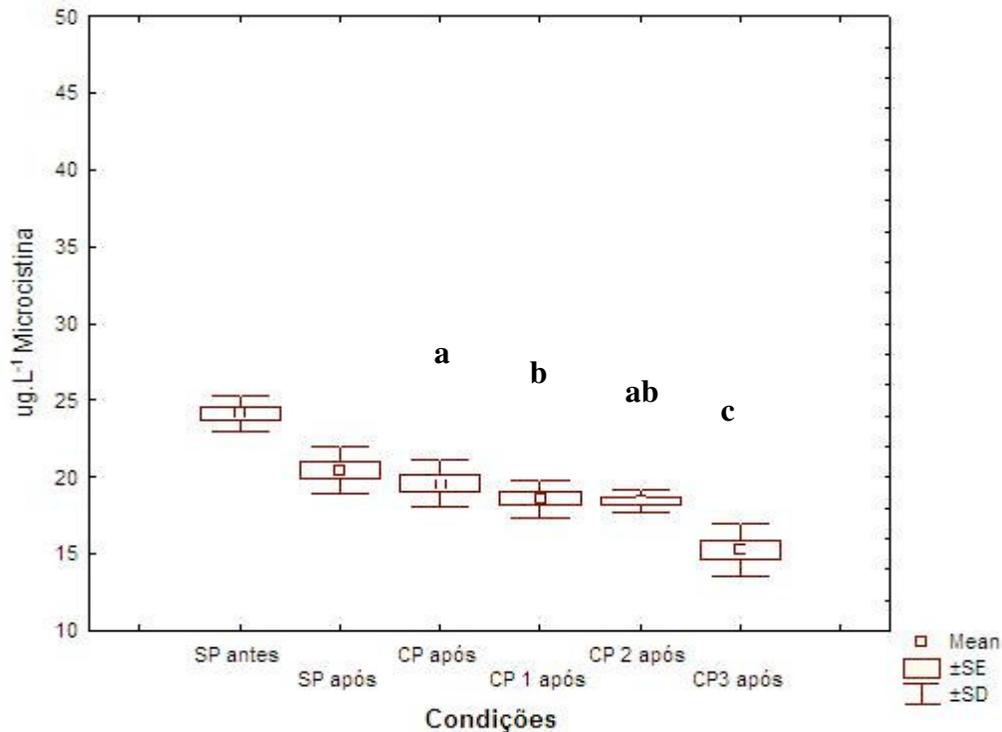


Figura 18: Concentrações de microcistina antes e após as amostras terem sido submetidas à luz e à pressão e a dosagem de peróxido de hidrogênio na solução tampão pH 7. Kruskal-Wallis ANOVA n = 08, letras minúsculas indicam diferenças significativas entre as dosagens.

**Legenda:** SP antes: amostras não pressurizadas no início do teste; SP após: amostras não pressurizadas no final do teste; CP após: amostras pressurizadas sem a dosagem de peróxido; CP1: amostras pressurizadas com 0,4 mg.L<sup>-1</sup> de peróxido; CP2: 0,8 mg.L<sup>-1</sup> de peróxido e CP3: 1,6 mg.L<sup>-1</sup> de peróxido.

Na solução tampão fosfato 7 a extração da microcistina foi menor do que quando se utilizou a solução tampão fosfato 9 e além disso, não foram observadas reduções significativas da concentração de microcistina nas diferentes dosagens de peróxido de hidrogênio, exceto para a dosagem maior que 1,6 mg.L<sup>-1</sup>.

Quando se utilizou para a extração da microcistina a solução tampão fosfato pH 4, a recuperação foi menor ainda quando comparada a extração realizada com as outras duas soluções tampões (pH 9 e pH 7), conforme pode ser visualizado por meio da Figura 19.

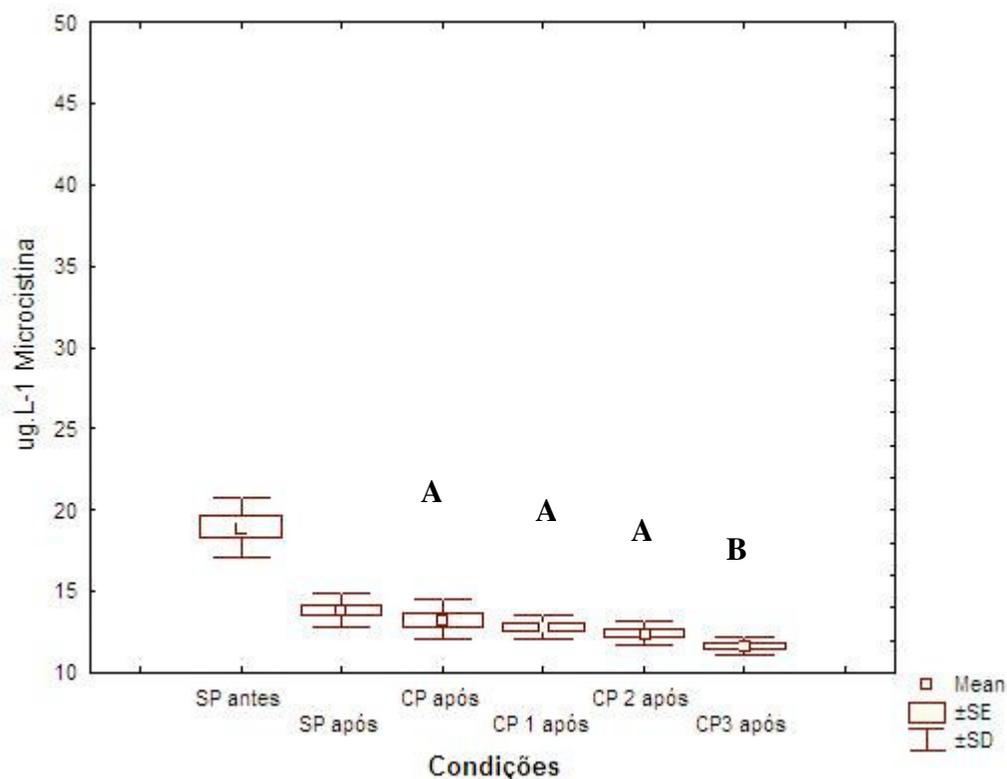


Figura 19 - Concentrações de microcistina antes e após as amostras terem sido submetidas à luz e à pressão e a dosagem de peróxido de hidrogênio na solução tampão pH 4. Kruskal-Wallis ANOVA n = 08, letras minúsculas indicam diferenças significativas entre as dosagens.

**Legenda:** SP antes: amostras não pressurizadas no início do teste; SP após: amostras não pressurizadas no final do teste; CP após: amostras pressurizadas sem a dosagem de peróxido; CP1: amostras pressurizadas com 0,4 mg.L<sup>-1</sup> de peróxido; CP2: 0,8 mg.L<sup>-1</sup> de peróxido e CP3: 1,6 mg.L<sup>-1</sup> de peróxido.

Notadamente a redução da concentração de microcistina foi estatisticamente significativa quando se utilizou a solução tampão pH 9 (ANOVA  $P \leq 0,05$ ). Observou-se também que a redução foi maior quando se utilizou a pressão e que foi diretamente proporcional ao aumento na dosagem de peróxido de hidrogênio.

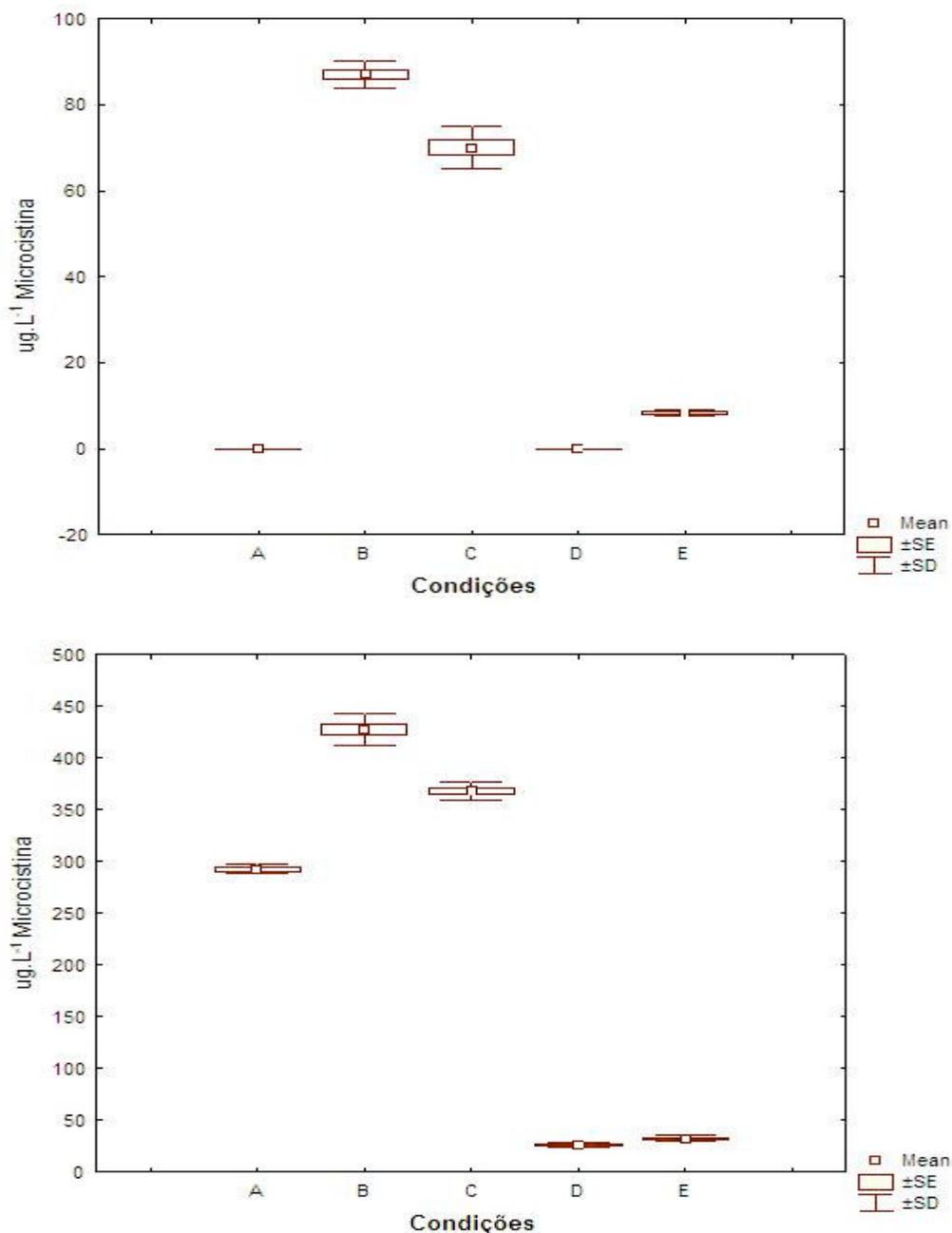
Qiao *et al* (2005) desenvolveram pesquisas avaliando a degradação da microcistina RR na presença de radiação UV como agente fotocatalítico e na presença de peróxido de hidrogênio. Esses autores observaram que o aumento da intensidade da radiação UV era diretamente proporcional à degradação da microcistina RR, no entanto, somente a dosagem de peróxido de hidrogênio não foi suficiente para que ocorresse a degradação da microcistina RR.

Esses autores verificaram também que a redução da concentração de microcistina foi mais eficiente quando foi utilizado o sistema da radiação UV e a dosagem de peróxido de hidrogênio. No entanto, o aumento na dosagem de peróxido de hidrogênio não foi diretamente proporcional à redução na concentração de microcistina como os resultados obtidos nesse trabalho. Os autores admitiram como a dosagem inicial a relação molar calculada para a microcistina e o peróxido de hidrogênio, já no presente trabalho, a dosagem inicial foi propositalmente menor do que a relação molar.

De acordo com o diagrama (Figura 1) da página 6, em condições naturais de uma floração ou de um cultivo controlado, cujo valor de pH é predominantemente alcalino, durante as horas de maior insolação no caso da floração (mais radiação UV), há predominantemente a presença de oxigênio singlete. As células das cianobactérias ao entrarem em senescência, (e até mesmo em cultivos velhos) liberam o peróxido de hidrogênio, a ficocianina e a microcistina. O oxigênio singlete, gerado a partir da redução do oxigênio molecular pela fotooxidação da ficocianina, de acordo com Thompson *et al.*, (1993) é a espécie ativa capaz de oxidar a ligação adda-dieno da microcistina.

Para que ocorra a formação do superóxido e dos radicais peridroxil e hidroxil seria necessário que ocorresse também uma protonação. Isto é, a entrada de hidrogênio (Figura 1 como H<sup>+</sup>) e essa protonação só seria possível por meio da ação de enzimas como a superóxido dismutase, a catalase e a glutathione peroxidase, que não reagem na faixa de pH alcalino (10,5 a 10,8).

Os resultados da influência da luz e da pressão sobre a microcistina solúvel que foi adicionada ao experimento, tanto sobre o extrato das células de *Sphaerocavum brasiliense* quanto no extrato de células de *M. protocystis*, estão expressos na Figura 20.



n = 8 : Kruskal-Wallis ANOVA  $P \leq 0,05$

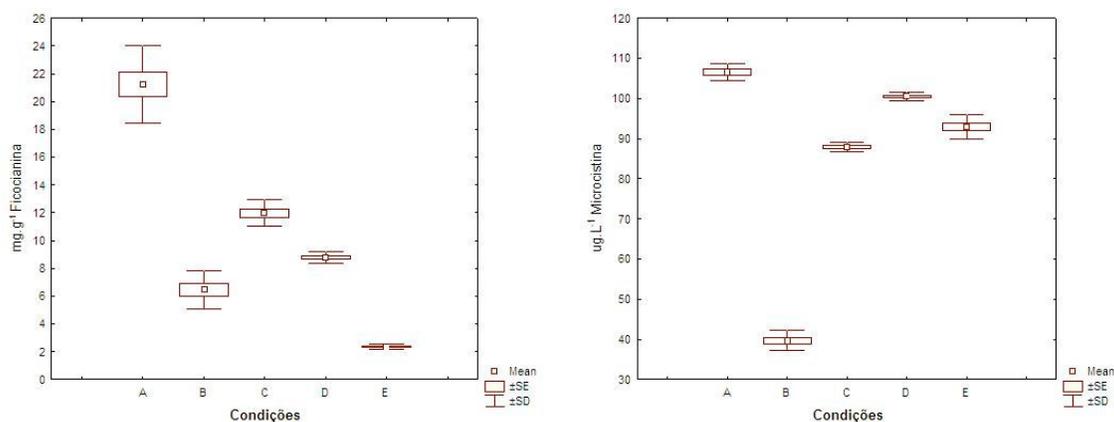
Fig. 20: Concentração de microcistina RR dos cultivos de *S. brasiliense* (primeiro gráfico) e de *M. protocystis* (segundo gráfico).

**Legenda:** A: amostra sem pressão; B: amostra + 100  $\mu\text{L}^{-1}$  microcistina sem pressão; C: amostra + 100  $\mu\text{L}^{-1}$  microcistina sem pressão exposta à luz.; D: amostra com pressão + luz; E: amostra + 100  $\mu\text{L}^{-1}$  microcistina amostra com pressão + luz.

Por meio da Figura 20 é possível observar que ocorreu redução na concentração de microcistina em ambos os extratos após as amostras terem sido submetidas à luz e isso foi potencializado após a pressurização das amostras. No cultivo de *Sphaerocavum brasiliense* não foi detectada a microcistina, no entanto, após a adição de 100  $\mu\text{L}$  de microcistina RR, na amostra que não foi pressurizada, a microcistina foi detectada. Já na

amostra exposta à luz e pressurizada a microcistina reduziu aproximadamente 93%. No experimento com *Microcystis protocystis*, verificou-se que o acréscimo de microcistina fez com que se aumentasse a sua concentração no experimento sem pressão. Já no experimento onde as amostras foram pressurizadas, observou-se uma redução de 91,3 % na concentração de microcistina.

Nos experimentos nos quais a ficocianina foi parcialmente removida por meio da exposição à luz, do extrato de células de *Sphaerocavum brasiliense* e foi então adicionada a microcistina com as amostras sendo mantidas ao abrigo e na presença de luz, foram encontrados os seguintes resultados apresentados na Figura 21.



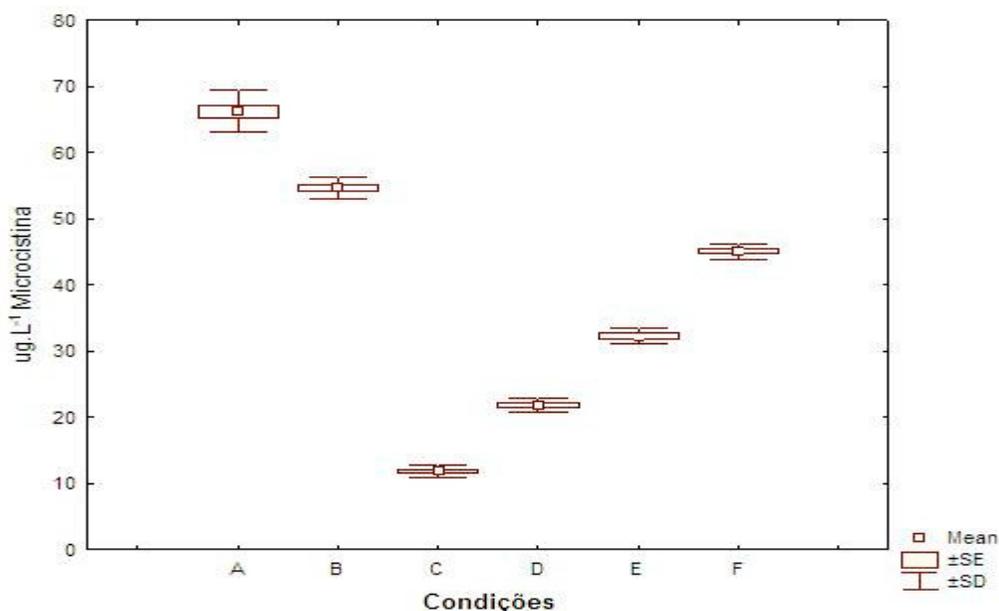
n = 10 : Kruskal-Wallis ANOVA  $P \leq 0,05$

n = 10 : Kruskal-Wallis ANOVA  $P \leq 0,05$

Fig. 21: Concentrações de ficocianina e de microcistina antes e após as amostras terem sido submetidas à pressão e a luz nos cultivos de *Sphaerocavum brasiliense* com experimentos realizados na luz e ao abrigo da luz. A: amostras mantidas ao abrigo da luz; B: amostras expostas à luz; C: amostras A mantidas ao abrigo da luz; D: amostras que iniciaram o experimento ficando expostas à luz; E: amostras B que passaram a ficar ao abrigo da luz.

A ANOVA realizada para a comparação dos resultados obtidos para a microcistina e para a ficocianina, nesse tratamento mostraram significantes ( $P \leq 0,05$ ). Ocorreram maiores reduções nas concentrações de ficocianina e de microcistina quando as amostras que estavam no escuro e foram expostas à luz (A para B). Para aquelas que estavam no escuro e continuaram nessa condição, a redução foi menor (C). Já para aquelas que iniciaram o experimento ficando expostas à luz, a redução da concentração de ficocianina foi notadamente maior (D) interferindo na redução da concentração de microcistina, que foi menor. Esses resultados repetiram o mesmo padrão para as amostras que estavam no claro e depois ficaram ao abrigo da luz (E).

Nos experimentos realizados com a adição do padrão de betacaroteno aos extratos de *Microcystis protocystis* verificou-se os seguintes resultados apresentados na Figura 22.



n = 10 : Kruskal-Wallis ANOVA  $P \leq 0,05$

Fig. 22: Concentração de microcistina antes (A), controle (B) e após (C) as amostras terem sido submetidas à luz e a pressão nos cultivos de *Microcystis protocystis* acrescidos de 1,0  $\mu\text{g.L}^{-1}$  (D); 2,0  $\mu\text{g.L}^{-1}$  (E) e 3,0  $\mu\text{g.L}^{-1}$  (F) de betacaroteno.

Foram observados aumentos significativos ( $P \leq 0,05$ ) nas concentrações de microcistina à medida que foram aumentando as concentrações de betacaroteno no experimento. Com esses resultados e baseando-se na capacidade antioxidante da molécula do betacaroteno, pode-se inferir indiretamente que esse pigmento acessório tenha agido como um sequestrador de espécies ativas de oxigênio, não permitindo a oxidação da microcistina.

#### 4 – DISCUSSÃO DO CAPÍTULO I

A série de experimentos conduzidos nesse trabalho com uma cultura de *Microcystis protocystis*, produtora de microcistina RR, mostraram que ocorreu uma redução na concentração de microcistina, e, por conseguinte, na toxicidade, após sua exposição à luz com uma intensidade de 40  $\mu\text{moles de f\u00f3tons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  e à uma pressão

contínua de 0,02 Mpa. Os bioensaios com camundongos mostraram que essa redução foi de aproximadamente 20 vezes, passando de uma faixa de elevada toxicidade para outra de baixa toxicidade.

A luz, como fator responsável pela degradação de microcistinas, já foi discutida anteriormente em outros trabalhos. Investigando o efeito da luz solar sobre as microcistinas LR e RR, Tsuji *et al.* (1994) concluíram que a radiação era capaz de reduzir, sozinha, a concentração das microcistinas em 14%, após 26 dias de exposição à luz. Porém, a adição de pigmentos fotosintéticos aumentou o processo de destruição para mais de 95% após 29 dias de exposição, sendo que a razão da destruição dependia da concentração de pigmentos, como a ficocianina, presentes nos experimentos.

Resultados semelhantes foram encontrados por Welker e Steinberg (1999) que mostraram uma potencial degradação fotolítica de microcistinas na presença de substâncias húmicas, quando irradiadas com a luz natural do sol. Embora esses autores não tivessem realizado testes de toxicidade, verificaram reduções significativas nas concentrações de microcistinas LR, RR e YR, quando expostas à luz e concluíram que sem a presença de substâncias húmicas essas reduções não ocorriam. A interação de outras substâncias com a luz merece, portanto atenção, por ser capaz de aumentar o efeito de decomposição sobre a molécula de microcistina, como será discutido posteriormente.

Espécies ativas de oxigênio ocorrem normalmente no metabolismo celular, porém, quando produzidas em excesso ou acumuladas tornam-se tóxicas as próprias células. No presente estudo, as células de *Microcystis protocystis* ao sofrerem um estresse osmótico induzido pela pressão, produziram peróxido de hidrogênio. No entanto, após a cultura de *M. protocystis* ter sido submetida às condições experimentais, observou-se uma redução da concentração de oxigênio dissolvido. Os trabalhos realizados por Robertson, Lawton & Cornish (1999), Lawton & Robertson (1999), Gadjdek *et al.* (2004) e Song, Bardowell & O'Shea (2007), mostraram ser a ficocianina o pigmento responsável para que ocorresse a fotooxidação da microcistina.

O presente trabalho vem corroborar essa conclusão, pois a fotooxidação das ficobiliproteínas (representadas pela ficocianina) pode ter contribuído para a redução da concentração do oxigênio dissolvido. Essa redução pode estar relacionada ao fornecimento de elétrons durante a fotooxidação das ficobiliproteínas. Isso foi confirmado, pois não ocorreram alterações significativas nas concentrações de clorofila *a* e de betacaroteno, mas ocorreram reduções significativas nas concentrações de ficocianina após o tratamento experimental.

A redução da concentração de nitrogênio amoniacal e o aumento da concentração de nitrato indicaram a ocorrência de um processo oxidativo. A redução da alcalinidade imposta pelo bicarbonato foi provavelmente devida a uma limitação de gás carbônico para a realização da fotossíntese e isso também pode ter induzido a fotoredução do oxigênio no fotossistema I, devido a uma limitação do oxigênio dissolvido. Essa constatação foi confirmada por meio dos resultados das análises de oxigênio dissolvido, cujas concentrações reduziram após os experimentos, mesmo com o aumento na concentração de peróxido de hidrogênio.

Teoricamente, o oxigênio singlete é a primeira espécie ativa de oxigênio a ser formada (Obinger *et al.*, 1998, Thompson *et al.*, 1993 e Resende *et al.*, 2003), originada de uma redução inicial sofrida pelo oxigênio molecular, por meio do fornecimento de elétrons da fotooxidação da ficocianina. Para ocorrer a formação de outras espécies ativas de oxigênio como os radicais superóxido, hidroperóxido e o hidroxil seria necessário que ocorresse algumas protonações, ou seja, a entrada de hidrônio ( $H^+$ ) e isso mais dificilmente ocorreria em águas mais alcalinas que são características durante as florações de algas durante o dia ou em culturas constantemente iluminadas. Por ser o oxigênio singlete ávido por duplas ligações, essa técnica de tratamento, por meio da indução a produção de radicais livres, pode ser aplicada a outras microcistinas ou para a oxidação de outros compostos que possuam esses grupos cromóforos, embora esses outros compostos não tenham sido experimentados no presente estudo.

Nos experimentos realizados *in vitro* foi possível verificar que ao adicionar o peróxido de hidrogênio nas amostras, ocorreu uma redução da concentração de microcistina e de ficocianina. Essa evidência apontou a influência da fotooxidação da

ficocianina com o conseqüente fornecimento de elétrons para reduzir o oxigênio molecular a oxigênio singleto. A pressão exercida sobre as culturas de *M. protocystis* por aproximadamente 12 horas atuou liberando a microcistina e a ficocianina das células que, sob a ação da luz (expostas também pelo mesmo período de tempo) foram fotoxidadas, acionando toda a explosão oxidativa que culminou com a redução da toxicidade da microcistina.

Nos experimentos onde a luz foi suprimida, verificou-se que mesmo assim ocorria também, embora em uma menor intensidade, remoções das concentrações de microcistina. Hattori & Fujita (1959) ao exporem culturas de *Tolypothrix tenuis* sob a luz, verificaram que ficocianina era produzida após a ocorrência de reações fotoquímicas. Esses autores concluíram que alguns precursores dos pigmentos são acumulados quando a cultura esta sob a luz e que esses são convertidos mais facilmente em pigmentos mesmo no escuro. Resultados semelhantes foram obtidos por Fujita, Ohki e Murakami (2001) quando expuseram culturas de cianobactérias em condições de estresse, incluindo o excesso de luz e logo depois suprimiram a luz dos experimentos.

Quando se acrescentou a microcistina solúvel ao experimento, essa sofreu a mesma redução da microcistina que havia dentro das células, desde que houvesse ficocianina no meio. Quando esse pigmento foi suprimido parcialmente dos experimentos, não ocorreram reduções significativas nas concentrações de microcistina, suportando a idéia do efeito da ficocianina na microcistina.

Halliwell & Gutteridge (1989), Asada & Takahashi (1987) e Assada (2006) provaram ser o betacaroteno um pigmento capaz de sequestrar espécies ativas de oxigênio. Esse trabalho sugere também que a adição de um sequestrador de espécies ativas de oxigênio, como o betacaroteno, nos experimentos, fizesse com que não ocorresse a redução da concentração de microcistina, pois possivelmente as espécies ativas de oxigênio oxidaram primerio as duplas ligações da molécula de betacaroteno em detrimento à ligação adda-dieno da molécula de microcistina.

Na análise por cromatografia líquida foi possível verificar um decréscimo nos picos de absorção do espectro UV a 238 nm, mas não o aparecimento de novos picos. O

mesmo resultado foi encontrado também por Welker e Steinberg (1999) e esses autores salientaram que um decréscimo na absorção do espectro UV da molécula de microcistina poderia indicar uma pequena alteração da estrutura molecular, embora não indicasse uma alteração do aminoácido Adda. Bourne *et al.* (1996) concluíram que o espectro UV das microcistinas não foi afetado pela linearização do anel peptídico ou pela supressão de três aminoácidos, com o aminoácido Adda permanecendo intacto. De acordo com Choi *et al.* (1993), as microcistinas acíclicas são 100 vezes menos tóxicas do que os compostos cíclicos equivalentes. No presente estudo, verificou-se por meio do espectro de massas, que após as amostras terem sido submetidas às condições experimentais, ocorreu a formação de grupos de aminoácidos que compõem a molécula da microcistina, com uma alteração na sequência do padrão de fragmentação, indicando possíveis alterações estruturais da molécula.

Todos os resultados encontrados antes e após a exposição à luz e à pressurização das amostras (aumento de nitrato, redução de nitrogênio amoniacal e de oxigênio dissolvido e a alteração no padrão de fragmentação da molécula da microcistina) indicam que ocorreu uma oxidação parcial dessa molécula. Song, Bardowell & O'Shea (2007) propuseram que a fototransformação das microcistinas poderia estar muito mais relacionada com uma “isomerização fotosensível” do adda-dieno do que com uma fotooxidação propriamente dita. Esses autores observaram que um aumento nas concentrações de oxigênio dissolvido proporcionava uma menor fototransformação das microcistinas. No presente estudo, a redução da concentração de oxigênio dissolvido se correlacionou positivamente com uma maior redução das concentrações de microcistinas.

Os bioensaios com camundongos mostraram que os subprodutos gerados após o tratamento experimental foram bem menos tóxicos do que quando se utilizou a cultura de *M. protocystis* sem tratamento.

Em águas superficiais, principalmente em ecossistemas aquáticos lênticos, as florações de cianobactérias constituídas por espécies de alguns gêneros da ordem Chroococcales (*Microcystis*, *Radiocystis*, etc), tendem a se manter na superfície da coluna d'água. Isso é devido principalmente à presença de bainhas mucilaginosas que

envolvem as colônias e também devido a presença de aerótopos (vesículas gasosas). Mas devido a ação de ventos ou de outros fatores que possam promover uma turbulência na coluna d'água, essas florações podem migrar para camadas inferiores, aonde certamente a pressão tende a ser superior a que foi utilizada nos experimentos (0,02 MPa), equivalente a uma pressão aproximada exercida de 2 metros abaixo da superfície da água. Isso poderia causar também a liberação de ficocianina e de microcistina, conforme constatado pelos experimentos, no entanto, as situações condicionais são bem distintas. Normalmente essa migração das florações em lagos e reservatórios é passageira não permanecendo por uma constância de 12 horas, tempo esse que foi utilizado nos experimentos. Além disso, durante a ocorrência de florações há uma redução da penetração da luz solar, reduzindo a possibilidade de ocorrer uma fotooxidação nas camadas mais profundas.

## 5 - MATERIAL E MÉTODOS DO CAPÍTULO II.

### 5.1 - Coleta e cultivo da amostra.

As condições de cultivo foram as mesmas descritas no item 2.1 do capítulo I, sendo as culturas mantidas em um reator com uma moderada aeração. Antes da realização dos experimentos, as células contidas em seis litros de cultura foram sempre coletadas na fase exponencial de crescimento (aproximadamente 10 dias).

### 5.2 – A pessurização das amostras.

Para avaliar a influência da pressão na redução da toxicidade da microcistina foi utilizado um aparato constituído de um tubo de PVC de cinco metros de altura e cinco centímetros de diâmetro. Na parte inferior do tubo foi adaptado um registro que era conectado a uma câmara formada por meio de um tubo de PVC com 10 cm de altura e com o mesmo diâmetro e com a parte inferior completamente vedada, de acordo com a Figura 23.

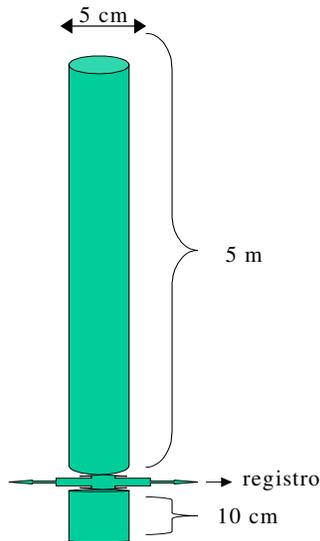


Fig. 23: Aparato utilizado para a pressurização das amostras.

Para a realização de cada experimento foram utilizados 24 sacos de plástico de 100 mL Nasco Whirl-Pak®. Sendo acondicionados em cada um dos sacos, 10 mL de cultura de *Microcystis protocystis*. Todos os 24 sacos foram lacrados e expostos à luz fria fluorescente ( $40 \mu\text{moles de f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ).

Ap\u00f3s aproximadamente 18 horas, 12 sacos foram colocados na c\u00e2mara de pressuriza\u00e7\u00e3o do aparato e os outros 12 sacos colocados em uma caixa de isopor tampada e deixada pr\u00f3ximo ao aparato. Para a pressuriza\u00e7\u00e3o do aparato, foram despejados aproximadamente 9,8 litros de \u00e1gua na parte superior do mesmo. O registro foi parcialmente aberto para que a \u00e1gua contida no tubo exercesse uma press\u00e3o sobre os sacos pl\u00e1sticos contendo as amostras. Essa press\u00e3o para uma coluna com cinco metros de coluna d'\u00e1gua (5 mca), foi estimada como sendo pr\u00f3xima a 0,5 atm ( $5 \text{ mca} = 0,5 \text{ Kgf/cm}^2$  ou  $0,05 \text{ MPa}$ ).

Ap\u00f3s aproximadamente 18 horas, os sacos contendo as amostras que ficaram na c\u00e2mara de pressuriza\u00e7\u00e3o e os sacos das amostras que ficaram dentro da caixa de isopor foram retirados e foi analisada a concentra\u00e7\u00e3o da microcistina das fra\u00e7\u00f5es sol\u00faveis e particuladas, com um kit imunoenzim\u00e1tico do tipo ELISA (*Enzyme-linked immunosorbent assay*) em placas (Beacon Analytical Systems. inc®).

Para a separa\u00e7\u00e3o das fra\u00e7\u00f5es sol\u00faveis e particuladas das amostras de cultivo foi utilizada uma centr\u00edfuga refrigerada da marca Nova Tecnica (modelo NT 825), sendo as

amostras centrifugadas a  $4^{\circ}\text{C}$ , por 10 minutos a uma velocidade de  $3.000\text{ g min}^{-1}$ . O sobrenadante dos tubos foi retirado e mantido na geladeira para a posterior análise da microcistina e o sedimentado dos tubos foi seco por liofilização em um liofilizador (marca EC Apparatus Inc., modelo Micromodulyo). Após a completa liofilização o sedimentado foi pesado e solubilizado com uma solução de metanol 75%. Novamente o conteúdo dos tubos foi centrifugado nas mesmas condições acima descritas e foi medida a concentração de microcistina no sobrenadante dos tubos após serem filtrados em filtro seringa para solvente com o diâmetro de poro de  $0,45\text{ }\mu\text{m}$ . A Figura 24 ilustra o esquema do experimento.

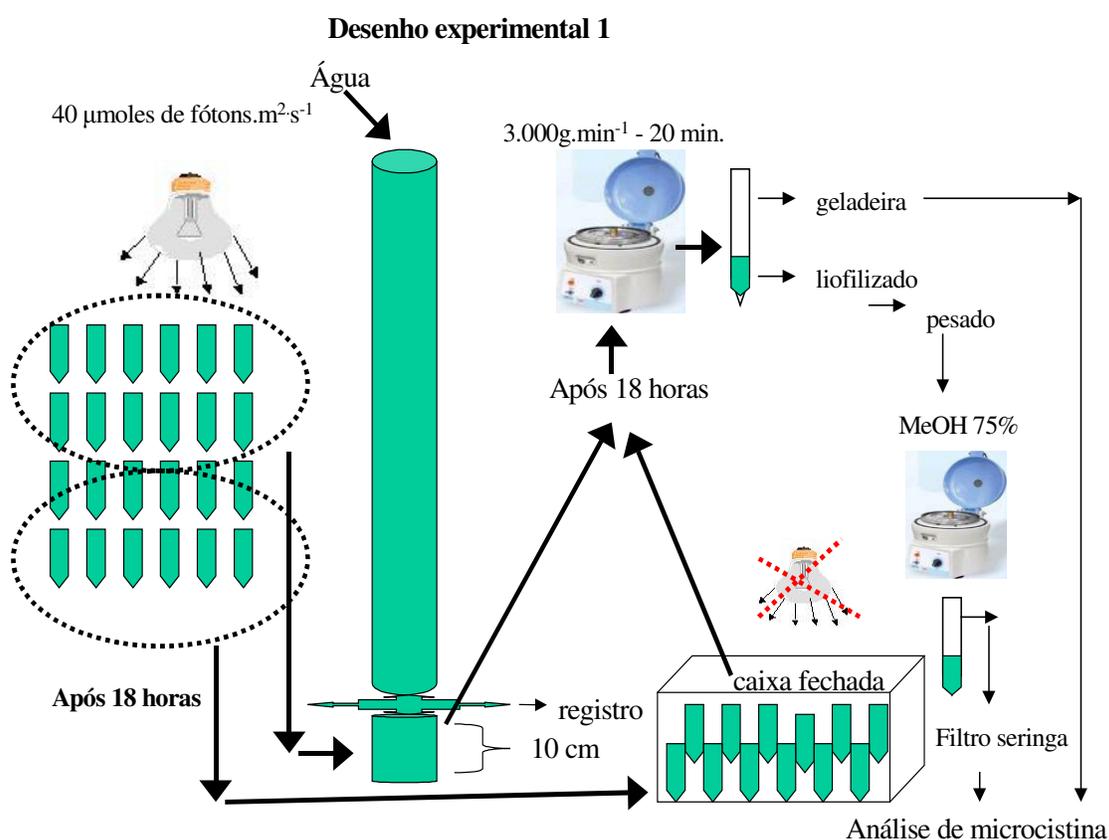


Fig. 24: Esquema do experimento para a pressurização das amostras.

### 5.3 - A escolha do coagulante

Para a definição do melhor tipo de coagulante a ser utilizado durante uma simulação de uma floração de *Microcystis protocystis*, produtora de microcistina, foram utilizados três coagulantes, que geralmente são selecionados avaliando-se

principalmente a economia, adequabilidade à água bruta, tecnologia de tratamento, custo e preservação de tanques e dosadores (Libânio *et al.*, 1997). Foram testados os seguintes coagulantes comerciais com as respectivas concentrações de acordo com a Tabela 3.

Tabela 3 – Produtos químicos utilizados como coagulantes e as suas concentrações.

Produto químico	Concentração estoque (%)	Solução de trabalho (%)
Sulfato de alumínio líquido	50	2
Sulfato ferroso clorado	17,5	17,5
Cloreto férrico	40	4

Esses coagulantes foram dosados em uma água sintética preparada utilizando 100 mL da cultura de *Microcystis protocystis* que possuía em torno de  $10^7$  células.mL<sup>-1</sup>, das amostras pressurizadas na câmara de pressurização e das amostras deixadas fora da câmara de pressurização. Esse volume (de 100 mL) foi diluído em 1.900 mL de água destilada e os testes realizados em quadruplicata. Esse procedimento foi repetido para os seis jarros do aparelho de teste de jarros (*jar-test*). O aparelho utilizado foi o da marca Nova Ética, modelo 218 LDB, com seis paletas (com 75 mm x 20 mm) com velocidade variável e seis jarros quadrados de acrílico com a capacidade de 2 litros de acordo com a Figura 25.



Fig. 25: Aparelho de teste de jarros utilizado para a dosagem dos coagulantes.

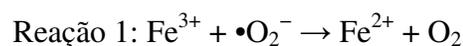
Os dois litros de água sintética contidos nos jarros foram agitados ao mesmo tempo a uma velocidade de 360 rotações por minuto (rpm) com um gradiente de mistura rápida ( $G$ ) de  $800s^{-1}$ . Após 30 segundos, a velocidade foi reduzida para 50 rpm ( $G = 30s^{-1}$ ).

<sup>1</sup>) e o tempo de mistura foi de 25 minutos, para permitir a floculação. O tempo de sedimentação adotado foi de 7 minutos, correspondentes a velocidade de sedimentação de 1 cm.min<sup>-1</sup> para uma taxa de escoamento superficial de até 14,4 m<sup>3</sup>.m<sup>-2</sup>.dia<sup>-1</sup>, taxa essa relativamente baixa. De acordo com a norma ABNT NB 592, para uma estação de tratamento de água com uma capacidade de até 1000 m<sup>3</sup>.dia<sup>-1</sup>, essa taxa deveria ser de 25 m<sup>3</sup>.m<sup>-2</sup>.dia<sup>-1</sup>, o que corresponderia a uma velocidade de sedimentação aproximada de 1,74 cm.min<sup>-1</sup>. Salienta-se aqui que, os resultados que forem obtidos com a velocidade de sedimentação adotada de 1 cm.min<sup>-1</sup> se forem satisfatórios, poderão ser adotados em uma escala real. Essa mesma velocidade já foi utilizada para testes por Di Bernardo *et al.* (2002) e PROSAB 5 (2006). Para a coleta da água decantada foi utilizado o orifício localizado a 7 centímetros da lâmina d'água (aproximadamente a 8,5 cm de altura em cada jarro).

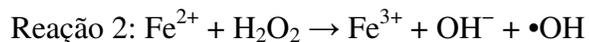
Os testes para se encontrar o melhor coagulante e a dosagem ótima foram realizados com o cultivo não pressurizado, onde a princípio, foram avaliadas as remoções de cor e turbidez e foi medido o pH. Após a escolha do melhor coagulante e da dosagem ótima os testes foram repetidos com a utilização de amostras de cultivo pressurizadas. A temperatura ambiente da sala onde foram realizados os testes de jarros se manteve na faixa de 25°C a 27°C durante o período e a temperatura das amostras de água sintética se mantiveram na faixa de 25°C a 26°C. De acordo com Di Bernardo *et al.* (2002) não foi necessário aquecer ou resfriar a água para a correção do gradiente de velocidade.

5.3.1 – Avaliação prévia da remoção na concentração de microcistina e a reação de foto-Fenton das amostras que foram pressurizadas na bancada pelo artefato (Figura 5, pag.16).

A primeira fase do ciclo catalítico da reação de foto-Fenton envolve a reação de redução do íon férrico para ferroso de acordo com a reação 1:



A segunda fase é a reação de Fenton (Zepp, Faust e Hoigné, 1992) de acordo com a reação 2:



Foi realizado um experimento para a verificação da ocorrência da reação de foto-Fenton durante o processo de coagulação com cloreto férrico. Em seis béqueres de 250 mL foram adicionados 10 mL da cultura de *Microcystis protocystis* em cada um e o volume de cada béquer foi completado para 190 mL com água deionizada sendo que se obteve no final uma água sintética contendo aproximadamente  $841.075 \text{ cels.mL}^{-1}$  ( $\pm 10\%$ ). Para avaliar a interferência da reprodução celular durante o experimento foram retiradas as seguintes subamostras: a água sintética contida em dois dos béqueres foi analisada imediatamente após o preparo, sendo mensurados os seguintes parâmetros: pH, número de células por mililitro e concentração de microcistina solúvel e particulada.

Dos quatro béqueres restantes, dois foram submetidos à pressão de 0,02 MPa por aproximadamente 18 horas e todos os seis béqueres ficaram expostos a luz artificial ( $40 \mu\text{moles de f\u00f3tons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ) pelo mesmo período de tempo. Após as 18 horas, foram dosados  $18 \text{ mg.L}^{-1}$  de uma solução de cloreto férrico a 4%, em um dos dois dos béqueres que não foram submetidos à pressão e em um dos dois béqueres que foram submetidos à pressão.

De acordo com Freitas (2008) que utilizou o processo foto-Fenton para a oxidação de  $50 \mu\text{g.L}^{-1}$  de microcistina-LR, a partir de 60 minutos de exposição à luz, já se obteve concentrações inferiores à  $1 \mu\text{g.L}^{-1}$  de microcistina.

No dia seguinte ao experimento (dia do teste) foram medidos novamente o pH, o número de células.mL<sup>-1</sup> e a concentração de microcistina nas frações solúveis e particuladas das amostras. Para a separação dessas frações particuladas e solúveis, após a agitação foram pipetados 60 mL de amostra de cada béquer e filtrados em filtros de

membrana com o diâmetro de poro (retenção) de 0,2 µm da marca Schleicher & Schuell previamente pesados.

O filtrado (solúvel) foi guardado na geladeira até o dia seguinte. Os filtros com o particulado retido foram secos por liofilização em um liofilizador da marca EC Apparatus Inc., modelo Micromodulyo. Esses filtros foram pesados e triturados em tubos centrífuga contendo três mL da solução de metanol 75%. Foram então centrifugados em uma centrífuga da marca Nova Técnica, modelo NT825 e o sobrenadante dos tubos filtrados em filtros seringa descartáveis. Antes da análise de microcistina foram adicionados a cada tubo 100 µL de EDTA 0,1 M para complexar o ferro presente nas amostras, propiciando assim uma menor interferência desse metal durante a análise imunoenzimática (Magalhães & Azevedo, 2004).

O experimento pode ser melhor visualizado por meio da Figura 26.

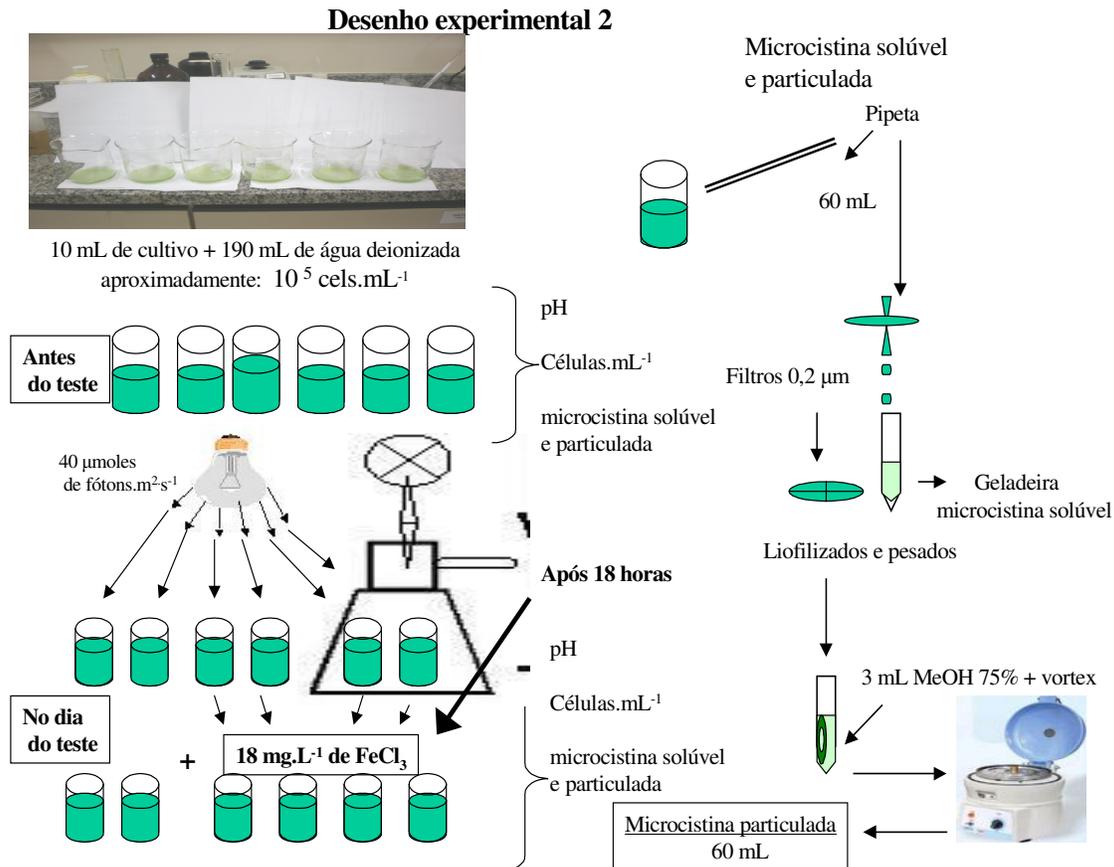


Fig. 26: Esquema dos experimentos para a verificação da reação de foto-Fenton durante a coagulação com cloreto férrico e a pressão.

A microcistina contida nos filtrados foi analisada pelo método do imunoensaio utilizando o kit ELISA em placas (Beacon Analytical Systems. inc®).

5.3.2 – Avaliação da remoção na concentração de microcistina nas frações solúveis e particuladas das amostras de água dos testes de jarros que foram pressurizadas por meio do aparato da Figura 23, pag. 47.

Nessa etapa dos testes, quando se utilizou o cloreto férrico, foi considerada fração solúvel da água decantada, aquela que foi coletada imediatamente após 7 minutos e a 7 cm de altura em relação ao nível da água. Já a fração particulada foi considerada como sendo aquela que sedimentou no fundo dos jarros após o mesmo tempo. Para a coleta dessa fração utilizou-se uma pipeta graduada com a capacidade de 10 mL e foi esse o volume de lodo utilizado para a realização da análise de microcistina. Para a avaliação da remoção da microcistina foram também medidos os seguintes parâmetros de qualidade da água cujas metodologias estão descritas na Tabela 4:

Tabela 4 – Metodologia utilizada para a avaliação dos parâmetros de controle da qualidade da água.

<b>Parâmetros</b>	<b>Método</b>	<b>Referências</b>
pH	Eletrométrico	APHA 4500 H <sup>+</sup> B
Alcalinidades	Titulação potenciométrica	APHA 2320 B
Turbidez	Nefelométrico	APHA 2130 B
Cor aparente	Colorimétrico Pt-Co	APHA 2120 B
Temperatura da água	Termômetro Celsius (Hg)	APHA 2550 B
Contagem de células	Câmaras de Sedgwick-Rafter	APHA 10200 C, e F

OBS: APHA (2005).

Durante o período dos testes foi medida a temperatura ambiente e da água com um termômetro de bulbo de mercúrio calibrado com um termômetro digital (marca Poli, modelo PM 1010).

A concentração final de ferro total nas amostras onde se utilizou o cloreto férrico como coagulante foi medida por absorção atômica, cujas amostras foram atacadas com ácido nítrico concentrado (APHA 3111 B, 2005). Os resultados encontrados das concentrações de ferro foram utilizados para uma avaliação sanitária da água decantada

final durante os testes de jarros e para o cálculo da concentração de EDTA (ácido etileno diamínico) utilizado para complexar o ferro durante as análises imunoenzimáticas de microcistina.

As concentrações iniciais e finais de microcistina foram também avaliadas de acordo com o tópico 5.3.1. Geralmente, a cal hidratada é adicionada nos testes antes da dosagem de coagulantes para se obter um pH ótimo de floculação, quando se dosa na água o sulfato de alumínio. Como o melhor coagulante encontrado foi o cloreto férrico, não foi necessário utilizar a chamada cal reação, mas desasa forma, o pH da água decantada obtido foi de 4 (Tabela 5). Soluções químicas com esse pH não são aplicadas na prática por serem muito corrosivas, por isso, adotou-se uma intercalinização (dosagem de cal na água decantada e não na água bruta ou nesse caso, sintética) por meio de uma suspensão de cal hidratada na concentração de 1%. Salienta-se que essa medida operacional é amplamente adotada em estações de tratamento de água.

#### 5.4 - O tratamento do lodo gerado nos testes de jarros.

De acordo com Brandão *et al.* (*in press*) células de *Microcystis aeruginosa* quando depositadas no fundo de decantadores podem liberar grandes quantidades de microcistina, por isso, visando reduzir a concentração de microcistina no lodo gerado no processo de tratamento, foram avaliadas três formas de tratamento do lodo.

A primeira foi a exposição de 10 mL do lodo à luz artificial ( $40 \mu\text{moles de fótons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) por um período de cinco dias, em placas de Petri, sendo o lodo coletado a cada dia para a análise da microcistina. A segunda foi similar à primeira, mas com a adição de 2 mL de água destilada visando manter o lodo umedecido. Já a terceira, foi com a adição de cal hidratada (0,5% - nas concentrações de:  $6,0 \text{ mg.L}^{-1}$ ;  $12,5 \text{ mg.L}^{-1}$ ,  $17,5 \text{ mg.L}^{-1}$  e  $22,5 \text{ mg.L}^{-1}$ ) no lodo e com o mesmo período de exposição.

Embora mostrado por alguns autores (Benchokroun, Imzilm & Hassani, 2003 e Davies-Colley *et al.*, 1999) a capacidade da luz em inativar bactérias em águas contendo elevada concentração de substâncias húmicas e elevado pH, foi também realizada no

mesmo experimento, uma avaliação conjunta da degradação do lodo exposto à luz por essa via. Para isso, nas três formas de tratamento do lodo acima mencionadas, foram utilizadas placas de Petri para esse controle. Essas placas continham o lodo e permaneceram ao abrigo da luz no mesmo intervalo de tempo das placas que ficaram expostas à luz. Ao final dos testes foi também medida a concentração de microcistina no lodo contido nas placas do controle.

Para a análise da microcistina, foram adicionados a cada placa de Petri, 2 mL de uma solução de metanol 75%, sendo o lodo (com o metanol) raspado com o auxílio de uma alça de raspagem (rodinho). Essa mistura de lodo e metanol foi transferida para tubos de ensaio e levada a um aparelho de vórtex da marca *Vision Scientific* na agitação máxima de 3.000 rpm por 5 minutos. Após a agitação, os tubos foram centrifugados a 4°C, a 3.000 g min<sup>-1</sup> por 20 minutos e o sobrenadante filtrado em filtros seringa descartáveis com membrana durapore HV de 0,45 µm de poro da marca Millipore. A microcistina contida nos filtrados foi analisada no kit imunoenzimático ELISA. O desenho experimental está apresentado na Figura 27.

### Desenho experimental 2

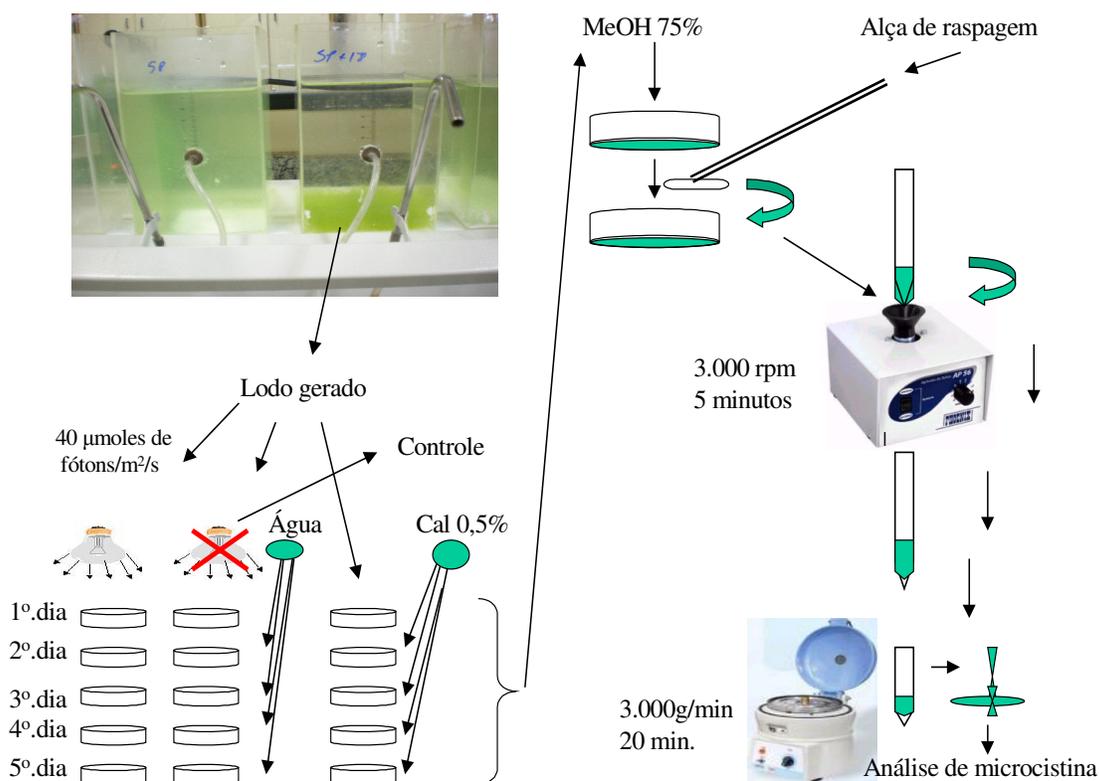


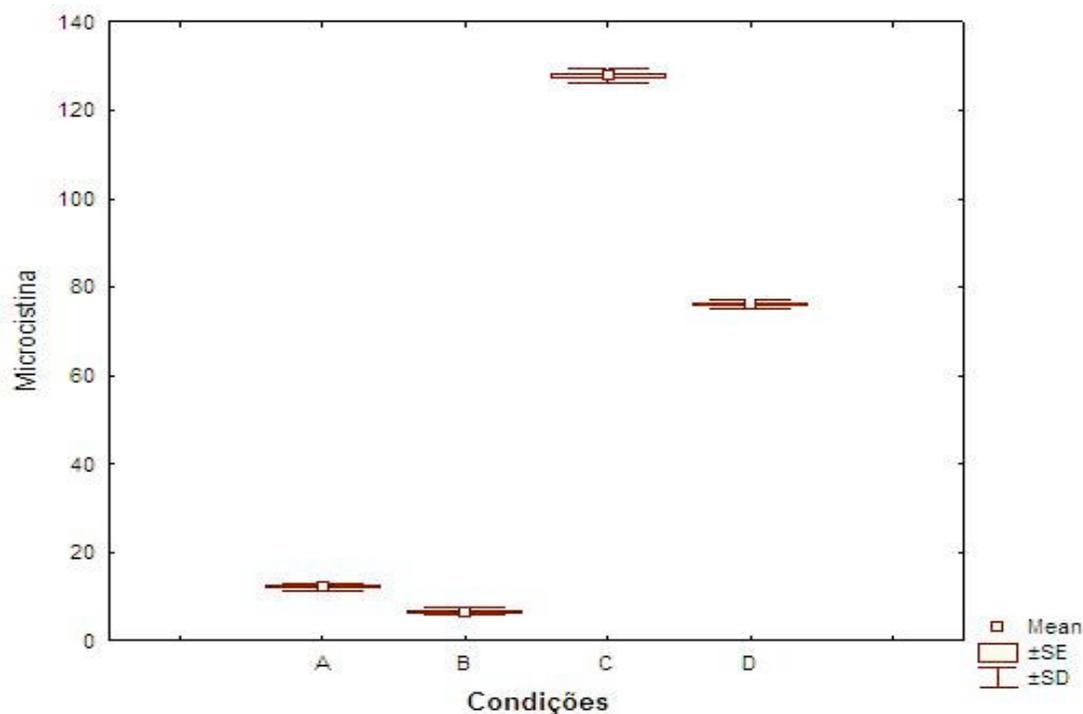
Fig. 27: Esquema dos experimentos para o tratamento do lodo.

Antes da análise de microcistina foram adicionados a cada tubo 2,5 mL de EDTA (ácido etilenodiamino tetracético) 0,1 M para complexar o ferro presente nas amostras, propiciando assim uma menor interferência desse metal durante a análise imunoenzimática (Magalhães & Azevedo, 2004).

## 6 - RESULTADOS DO CAPÍTULO II.

### 6.1 - Concentração da microcistina na câmara de pressurização.

Nas amostras que ficaram pressurizadas observou-se uma redução da concentração de microcistina em relação àquelas que ficaram fora da câmara de pressurização de acordo com a Figura 28.



n = 10 : Kruskal-Wallis ANOVA  $P \leq 0,05$

Fig. 28: Concentração de microcistina das amostras antes e após o experimento. A: fração solúvel antes ( $\mu\text{g.L}^{-1}$ ); B: fração solúvel após ( $\mu\text{g.L}^{-1}$ ); C: fração particulada antes ( $\mu\text{g.g}^{-1}$ ); D: fração particulada após ( $\mu\text{g.g}^{-1}$ ).

Observou-se uma redução na concentração de microcistina de aproximadamente 63% nas frações solúveis das amostras que foram expostas à luz e submetidas à pressão e de aproximadamente 60% na fração particulada das mesmas amostras.

## 6.2 - Resultados dos testes de jarros – amostras não pressurizadas.

Os resultados obtidos com os testes de jarros relativos às dosagens ótimas dos coagulantes, os percentuais de remoção de cor e de turbidez e o pH da água decantada após o tempo de 7 minutos (velocidade de um centímetro/min) das amostras que não foram submetidas à pressão estão expressos na Tabela 5.

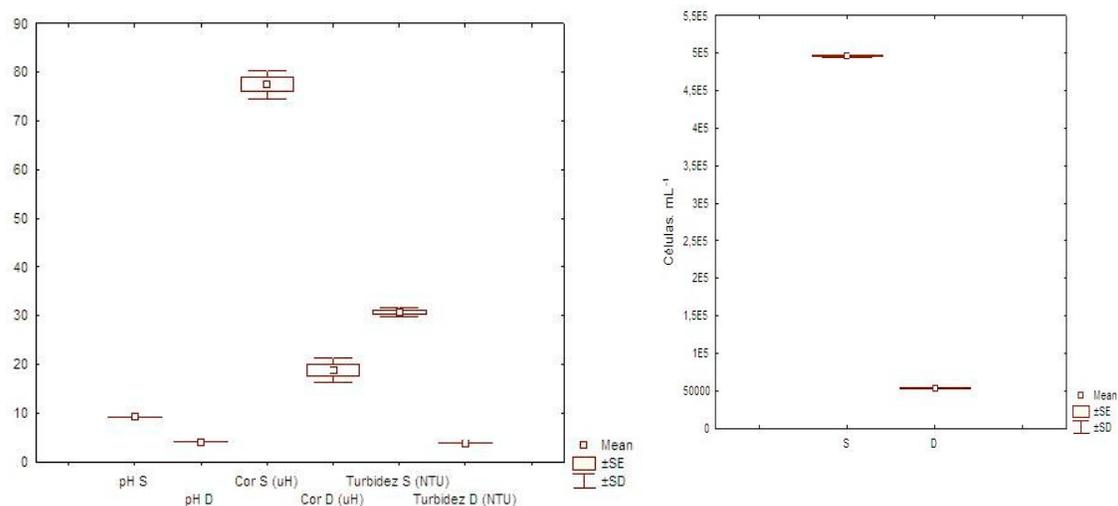
Tabela 5 – Dosagens ótimas dos produtos químicos coagulantes e os percentuais de remoção de cor, turbidez e o pH em amostras de cultivo não submetidas à pressão.

Coagulantes	Sulfato de alumínio (50%)	Sulfato ferroso clorado (17,5%)	Cloreto férrico (40%)
Dosagem ótima (mg/L)	20	27	18
Turbidez inicial (NTU)	27,4	30	30
Turbidez final (NTU)	27,6	10	3,9
remoção de turbidez (%)	- 0,7	68,8	87
Cor inicial (uH)	80	80	80
Cor final (uH)	70	110	20
remoção de cor (%)	12,5	- 37,5	75
pH inicial	9	9,2	9,2
pH final	4,8	4	4,0

Na Tabela 5 pode-se observar que o cloreto férrico foi o coagulante que mais removeu a cor e a turbidez, parâmetros importantes para uma primeira avaliação. Trabalhos realizados por Pádua & Di Bernardo (2000) provaram que o floco formado quando se utiliza o cloreto férrico como coagulante é maior e mais pesado do que quando da utilização de sulfato de alumínio. Wagner & Hudson (1982) utilizaram o cloreto férrico com excelentes resultados quando da ocorrência de algas na água bruta.

De acordo com CETESB (1973) a água após passar pelo decantador deverá já ter removido pelo menos 90% da turbidez da água coagulada. De acordo com a Tabela 5 essa remoção foi de 87% em relação à água bruta. Em relação à cor, a sua remoção é inversamente proporcional ao consumo de água de lavagem dos filtros, ou seja, quanto maior a sua remoção, menor será a colmatação dos filtros e, por conseguinte, menor será

o consumo de água de lavagem dos mesmos. No experimento acima a remoção da cor foi de 75%, no entanto, o valor encontrado foi 20 uH, considerado elevado para uma água a ser filtrada, isso significa que haverá um consumo maior com a água de lavagem dos filtros. Os resultados do experimento da amostra de água bruta sintética cujo cultivo não foi submetido à pressão estão expressos na Figura 29.



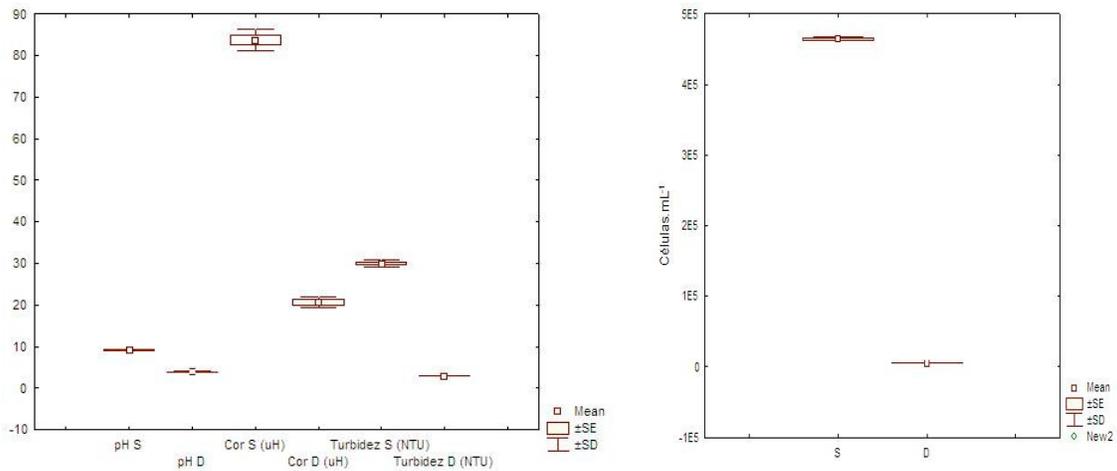
n = 04 : Kruskal-Wallis ANOVA  $P \leq 0,05$

Fig. 29: Resultados dos testes realizados com o cloreto férrico como coagulante nas amostras que não foram pressurizadas. S: água sintética; D: água decantada.

O número de células.mL<sup>-1</sup>, após a diluição do cultivo para o preparo da água sintética, chegou a 480.000. Na água decantada foram obtidos valores em torno de 52.700 células.mL<sup>-1</sup>, uma redução aproximada de 89%.

### 6.3 - Resultados dos testes de jarros – amostras pressurizadas.

Os resultados dos testes com as amostras que foram pressurizadas estão representados na Figura 30.



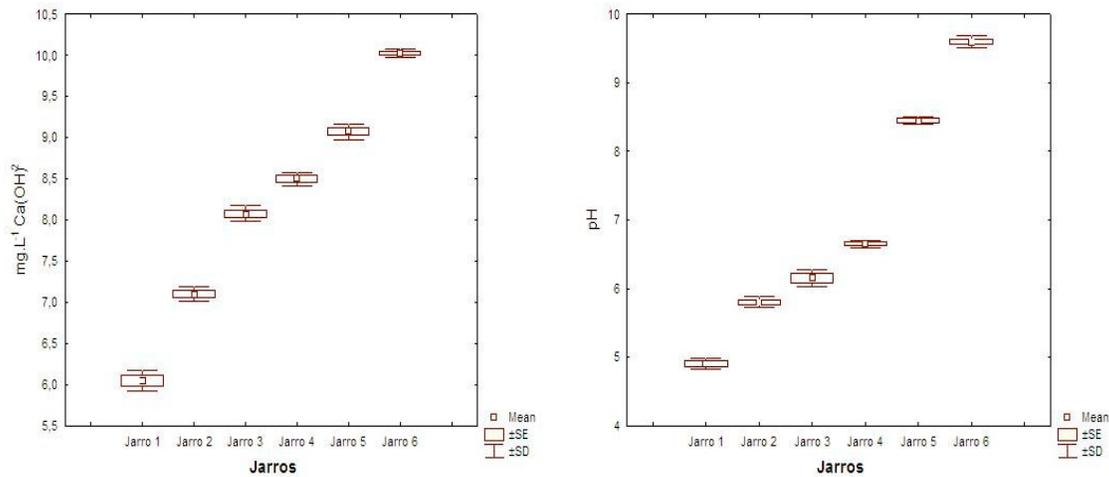
n = 04 : Kruskal-Wallis ANOVA  $P \leq 0,05$

Fig. 30: Resultados dos testes realizados com o cloreto férrico como coagulante nas amostras que foram pressurizadas. S: água sintética; D: água decantada.

Nos resultados dos testes realizados com as amostras que foram previamente pressurizadas quando comparados com os resultados das amostras que não foram (Figuras 29 e 30), não foram observadas diferenças significativas na remoção de nenhum parâmetro, exceção feita para a remoção de células que foi 10 vezes mais. Isso pode ter sido devido ao fato de que a pressão exercida sobre as células tenha propiciado a saída de gás dos aerótopos, com o consequente aumento do número de células que sedimentaram.

#### 6.4 - Resultados dos testes de intercalinização das amostras.

Embora tenha ocorrido uma redução do número de células de aproximadamente 99% quando se utilizou a amostra de água que foi submetida à pressurização, o pH da água decantada ficou em torno de 4,0. Os resultados obtidos com a intercalinização da água decantada para aumentar o pH estão expressos na Figura 31.



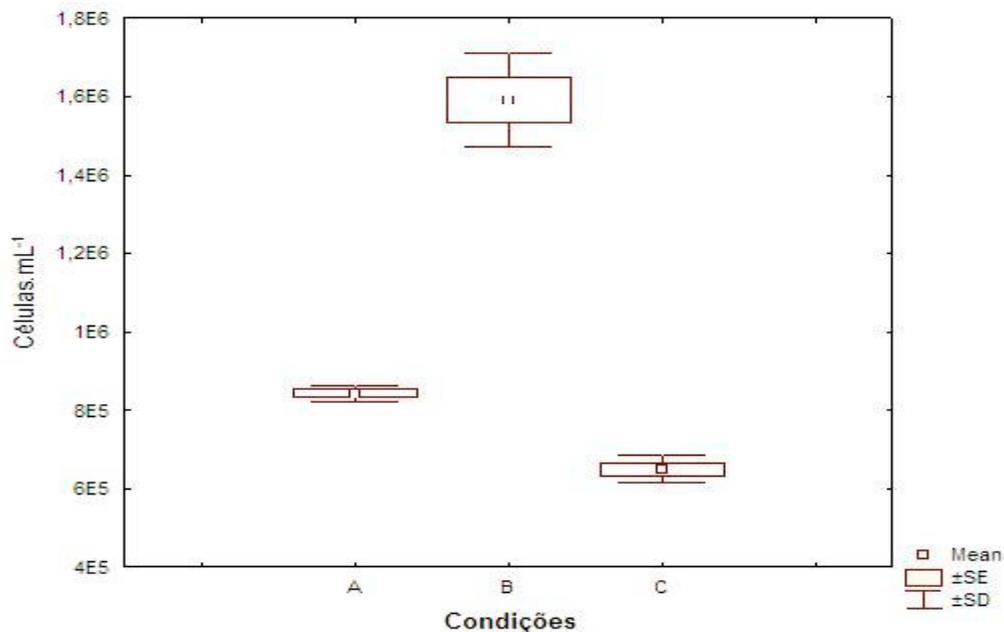
n = 04: Kruskal-Wallis ANOVA  $P \leq 0,05$

Fig. 31 - Resultados dos testes realizados com a intercalinização da água decantada nos testes de jarros.

A partir desse resultado verificou-se que dosagens de cal hidratada entre 8,5 a 9,0  $\text{mg.L}^{-1}$  podem elevar o pH da água decantada de 4,0 para o intervalo de 6,6 a 8,5 garantindo assim uma menor agressividade às instalações da estação de tratamento de água. O resultado da análise de alcalinidade para essa dosagem de cal na água decantada foi de 4,0  $\text{mg.L}^{-1}$  de  $\text{CaCO}_3$ .

#### 6.5 - Resultados dos testes de remoção de células e de microcistina no experimento para a reação de foto-Fenton.

Nos testes realizados para a verificação da ocorrência da reação de foto-Fenton, referentes aos experimentos com a adição de cloreto férrico, foram obtidos os seguintes resultados para a contagem de células apresentados na Figura 32.

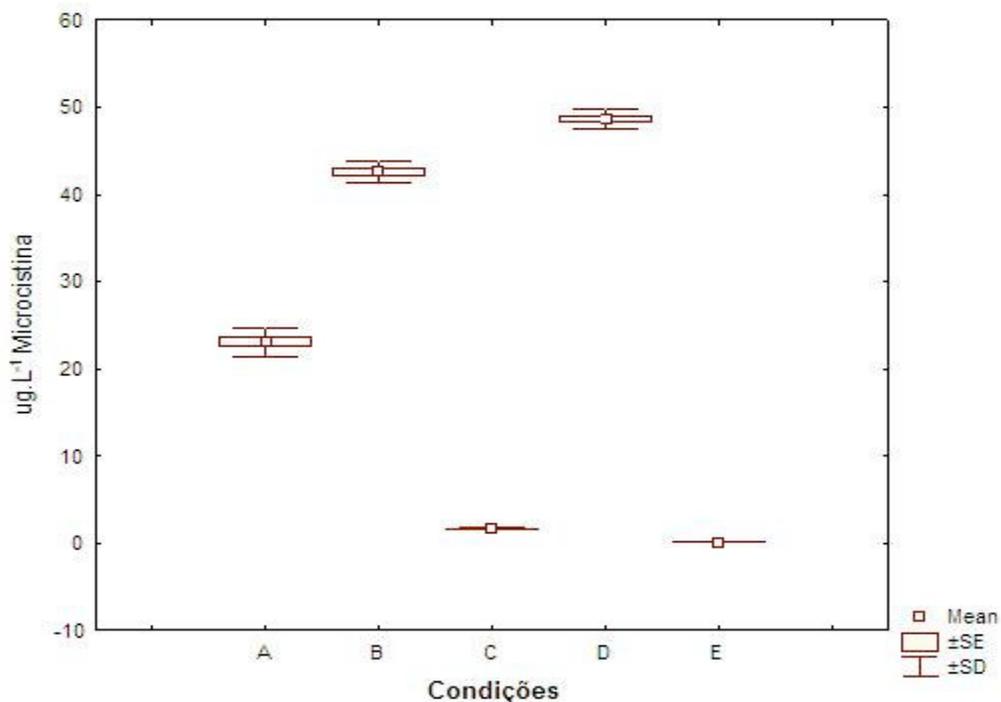


n = 04 : Kruskal-Wallis ANOVA  $P \leq 0,05$

Fig. 32: Resultados das contagens de células. A: água sintética; B: água sintética após 18 horas de exposição à luz; C: B após a adição de 18mg.L<sup>-1</sup> de cloreto férrico.

Verificou-se nesse experimento que o número de células de *Microcystis protocystis* apresentou um aumento exponencial no tratamento sem cloreto (B) devido a reprodução celular, que duplicou em 18 horas. No tratamento com o cloreto férrico, observou-se uma significativa redução.

A Figura 33 apresenta os resultados das concentrações de microcistina nas frações solúveis do experimento onde a amostra foi pressurizada na bancada.



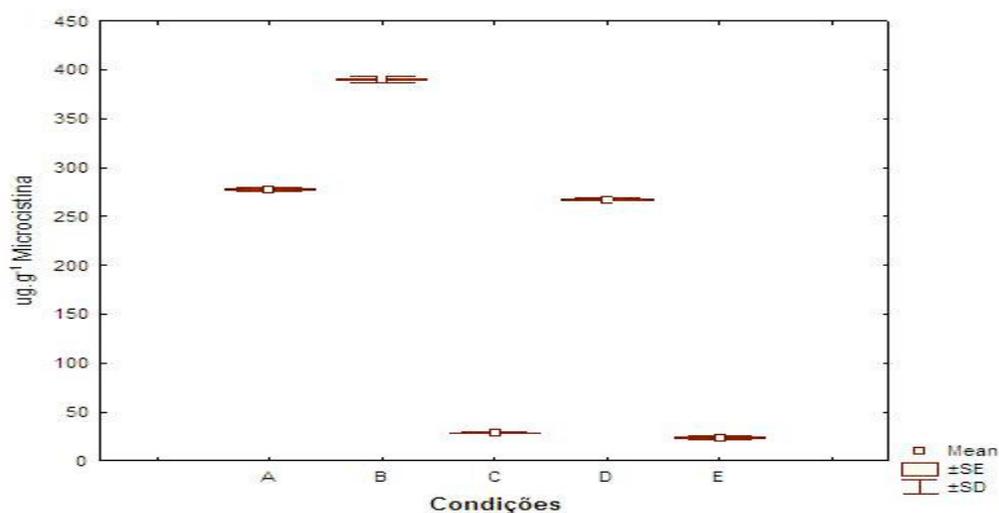
n = 10 : Kruskal-Wallis ANOVA  $P \leq 0,05$

Fig. 33: Concentração de microcistina nas frações solúveis. A: amostra sem pressão antes do experimento; B: amostra sem pressão no dia do experimento; C: B + 18mg.L<sup>-1</sup> de cloreto férrico; D: amostra com pressão no dia do experimento; E: D + 18mg.L<sup>-1</sup> de cloreto férrico.

As diferenças nas concentrações de microcistina na fração solúvel entre a amostra que foi analisada no dia anterior ao experimento (A) e aquela que foi analisada no dia do experimento, sem e com a aplicação do cloreto férrico (B e C, respectivamente) foram significativas ( $P \leq 0,05$ ). Primeiro ocorreu um aumento de aproximadamente o dobro da concentração de microcistina que passou de 21,4  $\mu\text{g.L}^{-1}$  para 41,7  $\mu\text{g.L}^{-1}$ , devido possivelmente à reprodução celular, pois todo o experimento ficou exposto à luz. Na fração de amostra onde se dosou o cloreto férrico, a redução da concentração de microcistina foi muito significativa, em torno de 98,8%, passando de 41,7  $\mu\text{g.L}^{-1}$  para 1,7  $\mu\text{g.L}^{-1}$ , mas ainda assim, essa concentração de microcistina ficou acima do limite estipulado para uma água tratada pela portaria 518 do Ministério da Saúde, que é de 1,0  $\mu\text{g.L}^{-1}$ .

Já nas frações solúveis das amostras que foram submetidas à pressão, no dia do experimento (D) e na que foi dosado o cloreto férrico (E), observou-se que ocorreu um aumento significativo de 41,7  $\mu\text{g.L}^{-1}$  para 45,5  $\mu\text{g.L}^{-1}$  na concentração da microcistina ( $P \leq 0,05$ ). Esse aumento foi devido possivelmente ao estresse osmótico sofrido pelas

células de *M. protozois*, fazendo com que a microcistina saísse de dentro para a fora das células. Na fração solúvel, onde se dosou o cloreto férrico (E), observou-se uma redução da concentração de microcistina que alcançou valores abaixo do limite estipulado para uma água tratada, pela portaria 518 do Ministério da Saúde, que é de 1,0  $\mu\text{g.L}^{-1}$ . Quanto às frações particuladas das amostras, observou-se o mesmo padrão das frações solúveis. No entanto, apesar de ter ocorrido uma redução de aproximadamente 93%, a microcistina particulada no final do tratamento, a remoção entre a concentração de microcistina no tratamento com pressão e com o cloreto férrico (C) foi muito baixa quando comparada ao tratamento sem pressão e com o cloreto (E). Nesse caso, a influência da pressão sobre a remoção da microcistina na fração particulada foi pouco eficiente conforme pode ser evidenciado por meio da Figura 34.

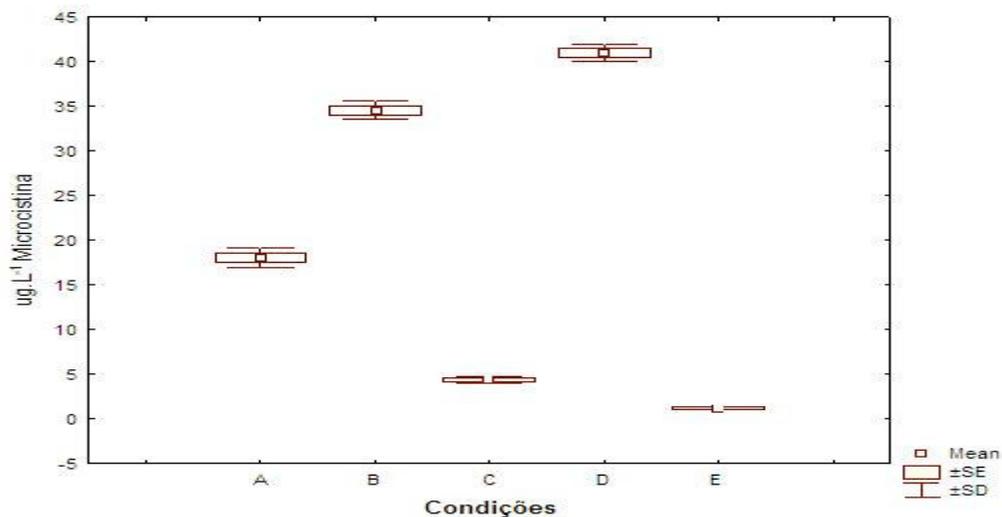


n = 10 : Kruskal-Wallis ANOVA  $P \leq 0,05$

Fig. 34: Concentração de microcistina nas frações particuladas. A: amostra sem pressão antes do experimento; B: amostra sem pressão no dia do experimento; C: B +  $18\text{mg.L}^{-1}$  de cloreto férrico; D: amostra com pressão no dia do experimento; E: D +  $18\text{mg.L}^{-1}$  de cloreto férrico.

### 6.5.1 - Resultados das avaliações da remoção na concentração de microcistina nas frações solúveis e particuladas das amostras de água da câmara de pressurização.

Os resultados das análises de microcistina solúvel das amostras após o teste de jarros estão expressos por meio da Figura 35.

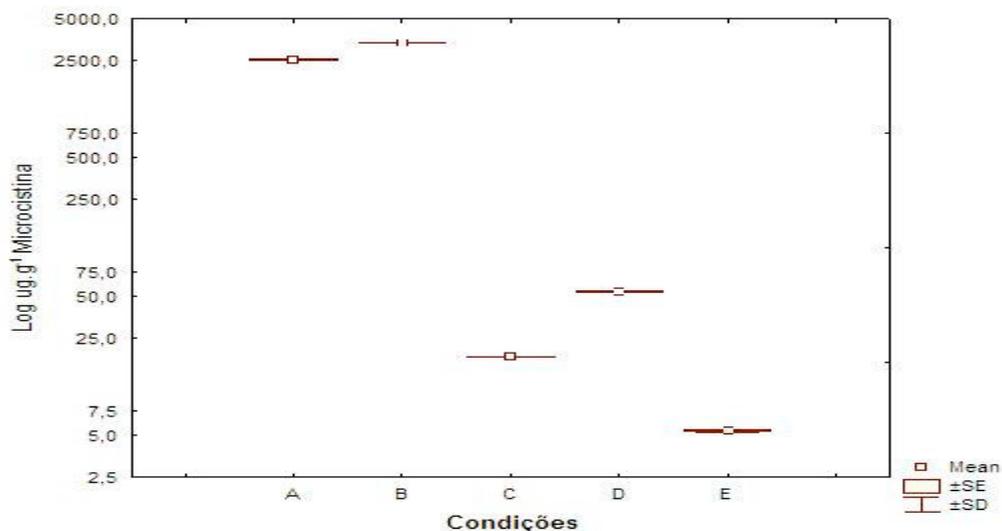


n = 04 : Kruskal-Wallis ANOVA  $P \leq 0,05$

Fig. 35: Concentração de microcistina nas frações solúveis. A: amostra sem pressão antes do experimento; B: amostra sem pressão no dia do experimento; C: B + 18mg.L<sup>-1</sup> de cloreto férrico; D: amostra com pressão no dia do experimento; E: D + 18mg.L<sup>-1</sup> de cloreto férrico.

Quando se compara a Figura 35 com a Figura 33 observou-se um mesmo padrão para a remoção da microcistina nas frações solúveis dos experimentos, tanto o que foi realizado com a pressurização na bancada e para aquele que foi realizado com as amostras pressurizadas na câmara de pressurização.

Já a remoção de microcistina nas frações particuladas foram bem mais significativas para as amostras que foram submetidas a pressurização na câmara, de acordo com a Figura 36.



n = 04 : Kruskal-Wallis ANOVA  $P \leq 0,05$

Fig. 36: Concentração de microcistina nas frações particuladas. A: amostra sem pressão antes do experimento; B: amostra sem pressão no dia do experimento; C: B + 18mg.L<sup>-1</sup> de cloreto férrico; D: amostra com pressão no dia do experimento; E: D + 18mg.L<sup>-1</sup> de cloreto férrico.

A partir dos dados da Figura 36, observou-se que as concentrações de microcistina nas frações particuladas das amostras que não foram submetidas à pressão, foram aproximadamente 9 vezes mais concentradas, quando comparadas as mesmas frações das amostras de cultura que não foram pressurizadas (Figura 34). Salienta-se que nesse experimento, para a análise de microcistina das frações particuladas, o lodo do fundo dos jarros foi coletado já concentrado. No experimento anterior (Figura 34), com uma dosagem ideal de  $18,0 \text{ mg.L}^{-1}$  de cloreto férrico e  $9,0 \text{ mg.L}^{-1}$  de cal hidratada, as amostras foram agitadas (fração solúvel e particulada) e foram filtradas, reduzindo assim a concentração de lodo. O experimento quando realizado no teste de jarros, onde o lodo foi coletado diretamente do fundo dos jarros, verificou-se uma maior concentração de microcistina, enfatizando assim que o lodo de estações de tratamento de água durante as florações de cianobactérias produtoras de microcistina devem merecer uma maior atenção antes da sua disposição.

Por meio da realização dos testes de jarros verificou-se que ocorreu uma maior remoção de microcistina quando a amostra foi previamente pressurizada, tanto na fração solúvel, quanto na fração particulada e essa remoção foi maior com a dosagem do cloreto férrico como coagulante. De acordo com o que foi proposto por Baker & Orlandi (1999) a produção de espécies ativas de oxigênio está diretamente ligada ao pH do meio, à presença de ferro na água e à exposição à luz. O diagrama apresentado na Figura 1 (capítulo I) ilustra a rota de produção das espécies ativas de oxigênio a partir do momento em que a célula sofre alguma injúria.

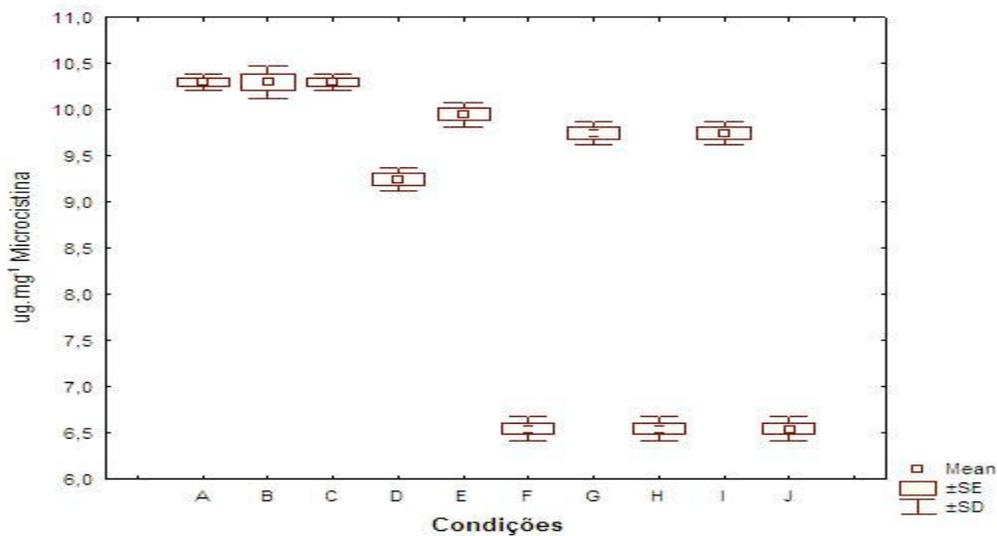
Como pode ser observada nessa mesma Figura 1, uma reação chamada Haber-Weiss ocorre em condições mais ácidas do meio (presença de hidrônio). A partir dessa reação (reação 2 e Figura 1) podem ser gerados os radicais hidroxil ( $\text{OH}^\cdot$ ) devido a redução do peróxido de hidrogênio. Essa reação ocorre nas células sendo a fonte do estresse oxidativo, é muito lenta, mas é catalizada pelo ferro.

As células de tecidos animais ou vegetais, quando agredidas, liberam peróxido de hidrogênio para que se inicie a explosão oxidativa com a produção de espécies ativas de oxigênio, dificultando assim a atuação de antígenos. De acordo com Thompson *et al.* (1993) as espécies ativas de oxigênio são capazes de oxidar a ligação adda dieno da

microcistina. Essas reações explicam a uma maior redução da microcistina nas amostras que foram pressurizadas e após a adição do cloreto férrico como coagulante.

#### 6.6 - Resultados dos tratamentos aplicados ao lodo gerado no processo de coagulação/sedimentação.

Verificou-se nas frações particuladas das amostras, tanto das que foram pressurizadas quanto na fração onde foi dosado o cloreto férrico, uma concentração residual elevada de microcistina. Como essas frações representam o lodo gerado no decantador durante o processo do tratamento, que nesse caso equivaleu a aproximadamente 20% do volume do decantador, os resultados da redução da microcistina do lodo (seco), gerado no tratamento realizado com a amostra de cultivo pressurizada e coagulada com cloreto férrico após a exposição à luz artificial, estão expressos na Figura 37.



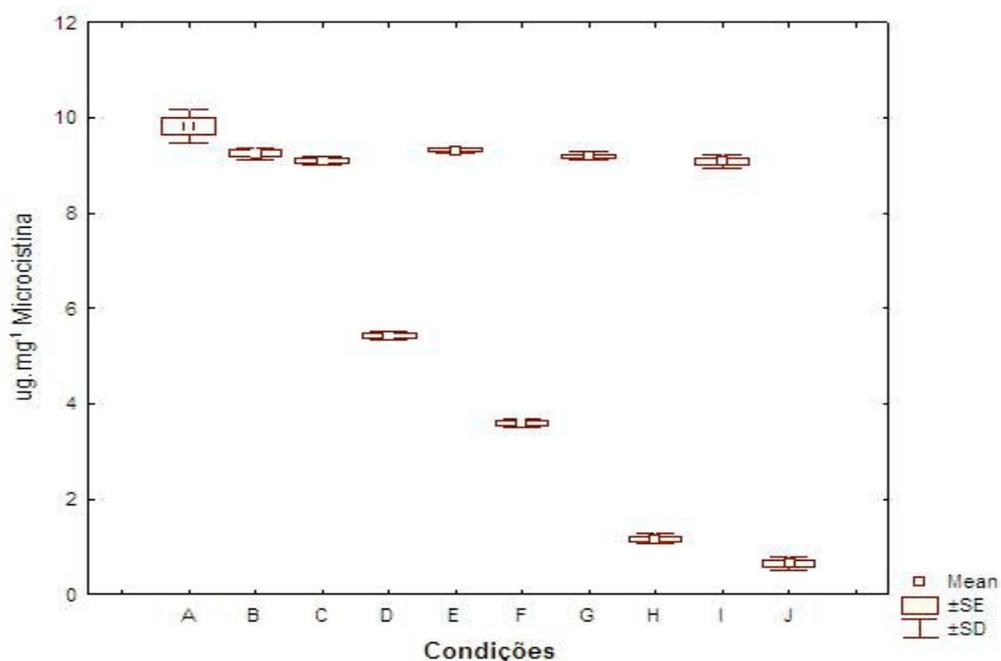
n = 04 : Kruskal-Wallis ANOVA  $P \leq 0,05$   $P \leq 0,05$   $P \geq 0,05$   $P \geq 0,05$

Fig. 37: Resultados das análises de microcistina no lodo seco do fundo dos jarros (das amostras que foram pressurizadas) com 7 minutos de sedimentação após exposição à luz em pH 4. A e B: controle (ao abrigo da luz) e amostra 1º dia; C e D: controle e amostra 2º dia; E e F: controle e amostra 3º dia; G e H: controle e amostra 4º dia; ; I e J: controle e amostra 5º dia.

Observou-se que com a secagem do lodo durante o período de exposição a redução da concentração de microcistina foi somente no segundo dia de exposição, passando de 10,4  $\mu\text{g.mg}^{-1}$  para 9,0  $\mu\text{g.mg}^{-1}$  para e permanecendo em 6,5  $\mu\text{g.mg}^{-1}$  a partir

do terceiro dia. Observou-se também por meio desse experimento que a degradação da microcistina devida a outros fatores, que não aqueles impostos pelas condições do teste, como por exemplo, a degradação bacteriana, ficou bem delimitada aos resultados obtidos com os controles que ficaram ao abrigo da luz.

Com o lodo sendo exposto nas mesmas condições, mas permanecendo umedecido com água destilada a remoção da microcistina foi de  $9,4 \mu\text{g.mg}^{-1}$  para  $0,7 \mu\text{g.mg}^{-1}$  no quinto dia de exposição à luz, concentração essa inferior ao limite estabelecido pela portaria 518 para uma água tratada, conforme pode ser observado na Figura 38



n = 04 : Kruskal-Wallis ANOVA  $P \leq 0,05$   $P \leq 0,05$   $P \leq 0,05$   $P \leq 0,05$

Fig. 38: Resultados das análises de microcistina no lodo umedecido do fundo dos jarros (das amostras que foram pressurizadas) com 7 minutos de sedimentação após exposição à luz em pH 4. A e B: controle (ao abrigo da luz) e amostra 1º dia; C e D: controle e amostra 2º dia; E e F: controle e amostra 3º dia; G e H: controle e amostra 4º dia; ; I e J: controle e amostra 5º dia.

Esses resultados podem ser devidos à ocorrência da reação de foto-Fenton, que utiliza o ferro como catalizador. Nesse experimento como no anterior a utilização do controle mantido ao abrigo da luz foi de extrema importância para mensurar a degradação da microcistina devida a outros fatores.

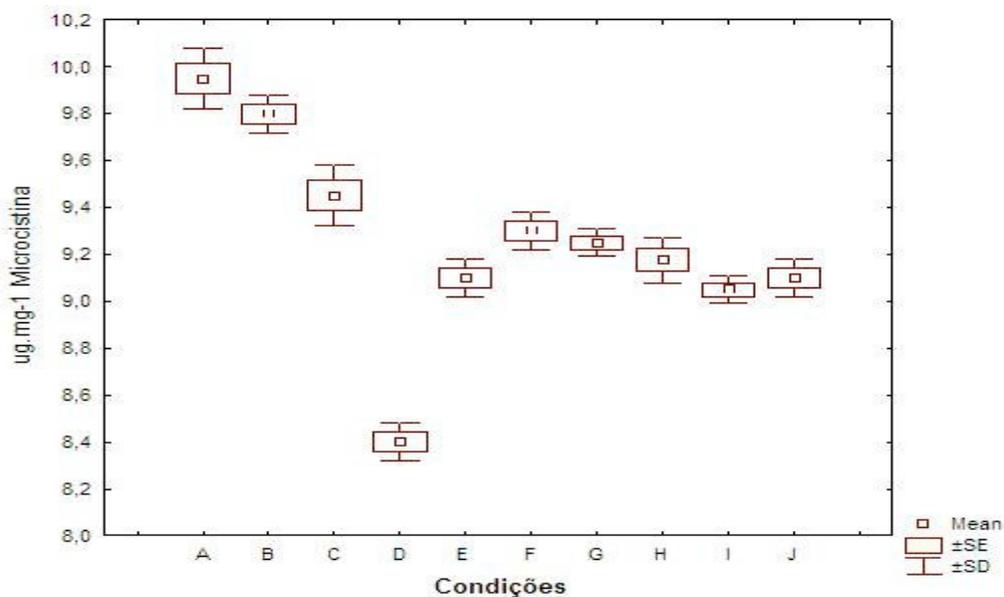
O ferro total foi então analisado e os resultados estão representados na Tabela 6.

Tabela 6 – Resultados das análises de ferro total realizadas após a dosagem de cloreto férrico:

Condições	Ferro total (mg.L <sup>-1</sup> )
Amostra de cultivo sem a aplicação da pressão	0,24
Amostra de cultivo após a aplicação da pressão	0,22
Amostra de cultivo sem a aplicação da pressão com 18 mg/L de cloreto férrico (sobrenadante)	1,9
Amostra de cultivo sem a aplicação da pressão com 18 mg/L de cloreto férrico (fundo)	14,2
Amostra de cultivo com a aplicação da pressão com 18 mg/L de cloreto férrico (sobrenadante)	2,10
Amostra de cultivo com a aplicação da pressão com 18 mg/L de cloreto férrico (fundo)	15,0

A presença de uma elevada concentração de ferro no lodo do fundo pode ter agido como um catalizador da reação de Fenton.

No teste de calagem, a redução da concentração de microcistina foi menor do que quando o experimento foi realizado sem a presença de cal, conforme pode ser visualizado pela Figura 39.



n = 04: Kruskal-Wallis ANOVA  $P \leq 0,05$   $P \leq 0,05$   $P \geq 0,05$   $P \geq 0,05$

Fig. 39: Resultados das análises de microcistina no lodo do fundo dos jarros (das amostras que foram pressurizadas) com 7 minutos de sedimentação após exposição à luz e as dosagens de cal. A e B: controle (ao abrigo da luz) e amostra sem a dosagem de cal; C e D: controle e amostra com 6 mg.L<sup>-1</sup> de cal; E e F: controle e amostra com 9 mg.L<sup>-1</sup> de cal; G e H: controle e amostra com 12,5 mg.L<sup>-1</sup> de cal; I e J: controle e amostra com 22,5 mg.L<sup>-1</sup> de cal.

Observou-se nesse experimento que a redução da concentração de microcistina se deu principalmente com a dosagem de  $6,0 \text{ mg.L}^{-1}$  de uma suspensão de cal a 0,5% e mesmo com o aumento das dosagens de cal, não ocorreram remoções de microcistina acima daquela que foi obtida com essa dosagem.

Salienta-se que todos esses tratamentos do lodo foram realizados em uma escala laboratorial e esses resultados quando utilizados em uma escala real deverão considerar a altura da lâmina de lodo nos leitos de secagem. Uma medida muito adotada na prática para umedificar leitos de secagem é o revolvimento do lodo com jatos de água.

## 7 - DISCUSSÃO DO CAPÍTULO II

A utilização de luz para a redução da toxicidade da microcistina foi bem demonstrada no primeiro capítulo desse trabalho e também por outros autores (Lawton & Robertson, 1999; Robertson, Lawton & Cornish, 1999 e Welker & Steinberg, 1999). No entanto, o que se mostrou nesse trabalho, foi que a utilização de uma pressão de 0,05 Mpa em amostras de cultura de *Microcystis protocystis*, produtora de microcistina RR, após a exposição à luz por 18 horas, foi suficiente para que as ficobiliproteínas (representadas principalmente pela ficocianina) e a microcistina fossem parcialmente extraídas das células. A fotooxidação das ficobiliproteínas fez com que fossem geradas espécies ativas de oxigênio, a partir da redução do oxigênio molecular. Os resultados sugerem que essas EAO's causassem a redução das concentrações de microcistina nas frações solúveis e particuladas. Com essa constatação, na prática, pode-se sugerir que florações de cianobactérias que produzem a microcistina, podem se tornar menos tóxicas quando expostas a luz e após serem submetidas a pressão, que no presente estudo foi de 0,05 MPa. Essa informação nos remete ao uso dessa técnica aplicada à florações sob à luz do sol e que são introduzidas em adutoras de água bruta, podendo ocorrer assim a redução da concentração de microcistina.

Nos testes de bancada utilizando-se um aparelho de teste de jarros entre os coagulantes testados (sulfato de alumínio, sulfato ferroso clorado e o cloreto férrico), o cloreto férrico em uma dosagem de  $18,0 \text{ mg.L}^{-1}$  mostrou uma maior eficiência na remoção de células de uma cultura de *Microcystis protocystis*, reduzindo também a turbidez e a cor da água decantada. Nos trabalhos realizados por Libânio *et al.* (1997) e Pádua & Di Bernardo (2000) o uso do cloreto férrico como coagulante mostrou uma maior eficiência na remoção de cor e turbidez. Embora os trabalhos realizados por Drikas *et al.* (2001) mostraram que é possível a remoção de células de *Microcystis aeruginosa* e de microcistina com o uso de sulfato de alumínio em elevadas dosagens, Chow *et al.* (1999) provaram que essa remoção foi mais efetiva do que quando se dosou na água cloreto férrico, devido principalmente à ampla faixa de pH (4 a 11) para permitir a floculação, contrária à estreita faixa atribuída a essa possibilidade para o sulfato de alumínio que é de 6,5 a 8,5. No entanto, o uso do cloreto férrico no presente estudo resultou em um pH mais ácido na água decantada. A dosagem de uma suspensão de  $9,0 \text{ mg.L}^{-1}$  de cal hidratada fez com que esse pH passasse de 4,0 para 8,5 garantindo uma menor agressividade da água decantada. O uso da pressão associado à dosagem de cloreto férrico e a dosagem de cal, fez com que ocorresse uma redução na concentração de microcistina nas frações solúveis e particuladas das amostras.

Uma das preocupações desse trabalho focou na possibilidade real do acúmulo de microcistina no lodo do decantador, que no caso seria o mesmo sedimentado no fundo dos jarros durante o teste de jarros. Pois de acordo com uma comunicação pessoal de Brandão *et al.* (*in press*) células de *Microcystis aeruginosa* quando depositadas no fundo de decantadores podem liberar grandes quantidades de microcistina. Nos testes realizados para a redução da concentração de microcistina na fração particulada, verificou-se que a exposição do lodo umedecido à luz promoveu uma redução para valores menores do que  $1 \mu\text{g.L}^{-1}$ . Essa redução se deu principalmente devido a liberação de ferro pela dissolução do cloreto férrico e ao pH ácido após a dosagem desse sal. Sob essas condições ocorreu a indução da reação de foto-Fenton, inclusive com a possibilidade de geração de espécies ativas de oxigênio, como os radicais superóxido, hidroperóxido e hidroxil. Obviamente que para a utilização dessa técnica em uma escala real deverá ser considerada a necessidade do uso de extensas áreas para a exposição do lodo à luz solar. Além disso, a umedificação desse lodo deverá ser realizada com o uso

de jatos de água para que ocorra sempre o seu revolvimento, permitindo assim que a maior parte do lodo seja exposto a luz solar.

O uso da cal hidratada se mostrou eficiente no controle do pH da água decantada nos jarros, garantindo assim uma menor agressividade às estruturas e instalações de uma estação de tratamento de água.

Conforme o que foi constatado por Jurczak *et al.* (2005) o uso de coagulantes de ferro são mais eficientes na remoção de microcistinas quando há uma associação de técnicas de tratamento. O presente estudo mostrou também que o uso do cloreto férrico como coagulante pode liberar ferro na água e esse metal agiu como um catalizador para a reação de foto-Fenton. Isso foi possível de ser avaliado quando as amostras de cultura contendo esse coagulante ficaram expostas à luz, ocorrendo uma maior remoção de microcistina. Todas essas técnicas associadas mostraram uma boa eficiência podendo, portanto, serem testadas em uma estação de tratamento de água convencional.

## 8 – CONCLUSÕES

De acordo com o objetivo proposto para o capítulo I foi possível observar que a redução da toxicidade de florações e de culturas de *M. protocystis*, produtoras de microcistina RR, tinha uma possível relação com o processo de fotooxidação das ficobiliproteínas, principalmente pela ficocianina. A pressão criada no interior de frascos de coleta ou nos experimentos de bancada, favoreceu a solubilidade da ficocianina e da microcistina em meio alcalino. Essas duas moléculas quando expostas à luz sofreram degradação após os experimentos. Os experimentos sugeriram que a degradação da microcistina foi maior com a presença da ficocianina.

Quimicamente não ficou definido, no presente estudo, qual foi o efeito da degradação na molécula da microcistina, se foi por linearização e/ou por isomerização da molécula, embora houve uma redução de sua toxicidade. Também não ficou definido quais foram as espécies ativas de oxigênio responsáveis pela oxidação, possivelmente por dificuldades metodológicas de mensuração, devido a vida curta das mesmas. No

entanto, foi possível observar a produção de peróxido de hidrogênio pelas células de *M. protozoists* ao sofrerem um estresse osmótico.

No segundo capítulo, objetivou-se associar o processo de oxidação acima descrito a outras metodologias convencionais do tratamento da água. As células de cianobactérias, nas florações produzem a microcistina e ao serem iluminadas e introduzidas em tubulações fechadas, como em adutoras, por exemplo, podem sofrer um estresse osmótico e isso poderia favorecer a redução da toxicidade da microcistina. Enfatiza-se aqui que em condições ambientais em um lago ou em uma represa, por exemplo, a pressão exercida naquelas células que ficam abaixo da superfície não é constante como a que foi mantida durante os experimentos. Por isso, em ambiente natural, a microcistina e as ficobiliproteínas não vão estar saindo livremente das células. Outra consideração a ser feita é relativa ao longo tempo de exposição utilizado nos experimentos quando for transportado para uma escala real. Para isso, há a necessidade de novos estudos onde possam ser testados os tempos de exposição à luz, as intensidades luminosas em vários gradientes de pressão. Esses estudos inclusive permitirão uma avaliação sobre os custos desse procedimento, objetivo esse que não foi almejado no presente estudo.

Quando essa técnica foi utilizada junto com os processos convencionais de tratamento da água, como o uso de sais coagulantes, o cloreto férrico apresentou uma maior eficiência na remoção de células e, por conseguinte da microcistina. No entanto, como a microcistina removida ficou retida na fração particulada, ou no interior das células, no fundo dos jarros, foi necessário o tratamento desse lodo antes de dispô-lo na natureza. O tratamento do lodo umedecido quando exposto à luz, conseguiu reduzir a concentração de microcistina. Estes resultados mostram que esta metodologia poderia ser uma opção complementar aplicável ao tratamento da água para a remoção de microcistinas.

## 9 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION (APHA). (2005). *Standard methods for the examination of water and wastewater*. 21<sup>a</sup> ed. Washington, APHA/WEF/AWWA.
2. Almeida, V. S.; Cogo, K.; Tsai, S. M.; Moon, D. H. (2006). Colorimetric test for the monitoring of microcystins in cyanobacterial culture and environmental samples from southeast – Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*. **37**: 192-198.
3. Asada, K. & Takahashi, M. (1987). Production and scavenging of active oxygen in chloroplasts. In: Kyle, D. J; Osmond, C. B. & Arntzen, C. J (Eds). *Photoinhibition*. Elsevier, Amsterdam, p. 227-287.
4. Asada, K. (2006). Production and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts and their functions. *Plant Physiology*. **141**(2):391-396.
5. ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS (1989). *NBR 592 – Projeto de Estação de Tratamento de Água para o Abastecimento público*. Rio de Janeiro, Brasil, 19p.
6. Azevedo, S. M. F. O.; Evans, W. R.; Carmichael, W. W.; Namikoshi, M. (1994). First report of microcystins from a Brazilian isolate of the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. *Journal of Applied Phycology*, **6**(3):261-265.
7. Azevedo, S. M. F. O.; Carmichael, W. W.; Jochimsen, E. M.; Rinehart, K. L.; Lau, S.; Shaw, G. R.; Eaglesham, G. K. (2002). Human intoxication by microcystins during renal dialysis treatment in Caruaru – Brazil. *Toxicology*. **181-182**:441-446.
8. Babica, P.; Bláha, L.; Marsálek, B. (2006). Exploring the natural role of microcystins: a review of effects on photoautotrophic organisms. *Journal of Phycology*, **42**(1):9-20.
9. Baker, C. J. & Orlandi, E. W. (1999). Active oxygen and pathogenesis in plants. In: Stacey, G. & Keen, N. T. (Eds.). *Plant Microbe Interactions*. St. Paul, Minnesota. APD Press. p. 81-119.
10. Benchokroun, S.; Imzilin, B. & Hassani, L. (2003). Solar inactivation of mesophilic *Aeromonas* by exogenous photooxidation in high-rate algal pond treating waste water. *Journal of Applied Microbiology*, **94**:531-538.
11. Bennett, A. & Bogorad, L. (1973). Complementary chromatic adaptation in a filamentous blue-green alga. *Journal of Cell Biology*, **58**(2):419-435.
12. Bodemer, U. (2004). Variability of phycobiliproteins in cyanobacteria detected by delayed fluorescence excitation spectroscopy and its relevance for determination of phytoplankton composition of natural water samples. *Journall of Plankton Research*, **26**(10):1147:1162.

13. Bourne, D. G.; Jones, G. J.; Blakeley, R. L.; Jones, A.; Negri, A. P.; Riddles, P. (1996). Enzymatic pathway for the bacterial degradation of the cyanobacterial cyclic peptide toxin microcystin LR. *Applied and Environmental Microbiology*, **62**(11):4086-4094.
14. Boussiba, S. & Richmond, A. E. (1979). Isolation and characterization of phycocyanins from the blue-green alga *Spirulina platensis*. *Archives of Microbiology*, **120**(2):155-159.
15. Brandão, C. C. S; Borges, E, L.; Araújo, J. V. C. Estudo da lise de *Microcystis aeruginosa* e liberação de microcistinas com o tempo de armazenamento de lodo em decantadores: avaliação em escala de bancada usando sulfato de alumínio e cloreto férrico como coagulantes. 25º. Congresso Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental, Recife, PE. Brasil. (comunicação pessoal).
16. BRASIL. (2001). Ministério da Saúde - Portaria n.º 1469 de 19 de fevereiro de 2001. Estabelece os procedimentos e responsabilidades relativos ao controle e vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade, e dá outras providências. *Diário Oficial*, Poder Executivo, Brasília, DF.
17. BRASIL. (2004). Ministério da Saúde. Portaria n.º 518 de 25 de março de 2004. Estabelece os procedimentos e responsabilidades relativos ao controle e vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade, e dá outras providências. *Diário Oficial*, Poder Executivo, Brasília, DF.
18. Carmichael, W. W.; Beasley, V. R.; Bunner, D. L.; Eloff, J. N.; Falconer, I.; Gorham, P.; Harada, K. I.; Krishnamurth, T.; Yu, M. J.; Moore, R. E.; Rinehart, K.; Runnegar, M.; Skulberg, O. M.; Watanabe, M. (1988). Naming of cyclic heptapeptide toxins of cyanobacteria (blue-green algae). *Toxicon.*, **26**(11):971-973.
19. Carmichael, W. W. (1992). Cyanobacteria secondary metabolites – the cyanotoxins. *Journal of Applied Bacteriology*, **72**(6):445-459.
20. Choi, B. W.; Namikoshi, M.; Sun, F.; Rinehart, K. L.; Carmichael, W. W.; Kaup, A. M.; Evans, W. R.; Beasley, V. R. (1993). Isolation of linear peptides related to the hepatotoxins nodularin and microcystins. *Tetrahedron Letters*, **34**(49):7881-7884.
21. Chorus, I. & Bartram, J. (Eds.). (1999). *Toxic Cyanobacteria in water: A guide to their public health consequences, monitoring and management*. Published on the behalf of *World Health Organization* by E & FN Spon. London. 400 p.
22. Chow, C. W. K.; Drikas, M.; House, J.; Burch, M. D.; Velzeboer, R. M. A. (1999). The impact of conventional water treatment processes on cells of the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. *Water Research*, **33**(15):3253-3262.

23. COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL (CETESB). (1973). Operação e manutenção de ETA, vol. I e II, bnh/cetesb, São Paulo.
24. Cook, D. & Newcombe, G. (2002). Removal of microcystins variantes with powdered activated carbon. *Water Science and Technology: water Supply*. ISSN 1606-9749.
25. Dahlmann, J.; Budakowski, W. R.; Luckas, B. (2003). Liquid chromatography-electrospray ionization-mass spectrometry based method for the simultaneous determination of algal and cyanobacterial toxins in phytoplankton from marine waters and lakes followed by tentative structural elucidation of microcystins. *Journal of Chromatography A*, **994**:45-57.
26. Davies-Colley, R. J.; Donnison, A. M.; Speed, D. J.; Ross, C. M.; Nagels, J. W. (1999). Inactivation of faecal indicator micro-organisms in waste stabilization ponds: interactions of environmental factors with sunlight. *Water Research*, **33**:1220-1230.
27. Di Bernardo, L.; Dantas, A. D. B.; Di Bernardo, A. S.; Centurione Filho, P. L. (2002). Ensaio de Tratabilidade de Água e dos Resíduos Gerados em Estações de Tratamento de Água. 1ª. ed. São Carlos: RIMA. v. 1. 237 p.
28. Donati, C.; Drikas, M.; Hayes, R.; Newcombe, G. (1994). Microcystin-LR adsorption by powdered activated carbon. *Water Research*, **28**(8):1735-1742.
29. DOQ-CGRE-008. (2007). Orientação sobre validação de métodos de ensaios químicos – documento de caráter orientativo. Rev. 02 –INMETRO/ABNT.
30. Drikas, M.; Chow, C. W. K.; House, J.; Burch, M. D. (2001). Using coagulation, flocculation and settling to remove toxic cyanobacteria. *Journal American Water Works Association*, **93**(2):100-111.
31. Edwards, C.; Lawton, L. A.; Coyle, S. M.; Ross, P. (1996). Automated purification of microcystins. *Journal of Chromatography A*, **734**(1):175-182.
32. Fastner, J.; Flieger, I.; Neumann, U. (1998). Optimised extraction of microcystins from field samples – a comparison of different solvents and procedures – Technical Note. *Water Research*, **32**(10):3177-3181.
33. Freitas, A. M. (2008) Utilização de processos oxidativos avançados para remediação de águas contaminadas por toxinas produzidas por cianobactérias. Curitiba. **Tese de Doutorado** - Departamento de Ciências Exatas - Universidade Federal do Paraná.
34. Fujita, Y., Ohki, K., Murakami, A. (2001) Acclimation of photosynthetic light energy conversion to the light environments. In: Rai LC and Gaur JP (eds) *Algal Adaptation to Environmental Stresses: Physiological, Biochemical and Molecular Mechanisms*. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg. **6**: 135–171.

35. Gajdek, P.; Bober, B.; Mej, E.; Bialczyk, J. (2004) Sensitised decomposition of microcystin-LR using UV radiation. *Journal of Photochemistry and Photobiology B biology*, **76**(1-3):103-106.
36. Gorham, P. R., Mclachlan, J., Hammer, U. T., Kim, W. K. (1964). Isolation and culture of toxic strains of *Anabaena flos-aquae* (Lyngb.) de Bréb. *Verh. Int. Verein. Theor. Angew. Limnol.*, **15**:796-804.
37. Harada, K. I.; Ogawa, K.; Matsuura, K.; Murata, H.; Suzuki, M.; Watanabe, M. F.; Itezono, Y.; Nakayama, N. (1990). Structural determination of geometrical isomers of microcystins -LR and -RR from cyanobacteria by two-dimensional NMR spectroscopic techniques. *Chemical Research in Toxicology*, **3**(5):473-481.
38. Harada, K. I.; Murata, H.; Qiang, Z.; Suzuki, M.; Kondo, F. (1996). Mass spectrometric screening method for microcystins in cyanobacteria. *Toxicon*, **34**(6): 701-710.
39. Halliwell, B. & Gutteridge, J. M. C. (1989). *Free radicals in Biology and Medicine*. Oxford: Clarendon Press, 543p.
40. Hattori, A. & Fujita, Y. (1959). Effect of pre-illumination on the formation of phycobilin pigments in a blue-green alga, *Tolypothrix tenuis*. *The Journal of Biochemistry*, **46**:1259 - 1261.
41. Hishimoto, S.; Ioriya, T.; Otsuki, A. (1995). Differentiation of phycocyanins of *Microcystis aeruginosa* in two different eutrophic lakes using electrospray ionization mass spectrometry. *Journall of Plankton Research*, **17**(10):1951:1958.
42. Hou, C-r.; Hu, W.; Rui-bao, J.; Pei-qi, L. (2008). The Mechanism of Cyanobacterium (*M. aeruginosa*) Microcystins releasing by chemical oxidation in drinking water treatment. *Bioinformatics and Biomedical Engineering – The second International Conference*. **16**(18): 3734-3737
43. Hu, Z. Q.; Liu, Y. D.; Li, D. H.; Dauta, A. (2005). Growth and antioxidant system of the cyanobacterium *Synechococcus elongatus* in response to microcystin-RR. *Hydrobiologia*, **534**(1-3):23-9.
44. Jardim, F. A. & Azevedo, S. M. F. O. (2006). Cianobactérias em Águas para abastecimento público e o cumprimento da legislação brasileira. *Boletim da Sociedade Brasileira de Limnologia*, **35**(3):86-91. ISSN: 1980-8976.
45. Jardim, F. A, Machado, J. N. A., Schembri, M. C. A. C; Azevedo, S. M. F. O., Sperling, E. V. (2000) A experiência da COPASA no monitoramento, detecção e adoção de medidas mitigadoras para as cianobactérias tóxicas em estações de tratamento de água - Minas Gerais – Brasil. In: CONGRESSO INTERAMERICANO DE ENGENHARIA SANITÁRIA E AMBIENTAL, 27, 2000, Porto Alegre, RS (Brasil). [Anais eletrônico...]. AIDIS, 2000. 1 CD-ROM.

46. Jardim, F. A. & Viana, T. H. (2003). Análise de algas, cianobactérias e cianotoxinas como parâmetro de controle do tratamento da água para abastecimento. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA SANITÁRIA E AMBIENTAL, 22., 2003, Joinville-SC, Brasil. *Anais...* Joinville-SC, Brasil: ABES.
47. Jia, R. B.; Zhang, X. H.; Zhang, W. H.; Zhang, G. M.; Wang, Z. S. (2003) Fluctuation of microcystins in water plant. *Journal of environmental science and health*, **38**(12): 2867-2875.
48. Jurczak, T.; Tarczyska, M.; Izydorzyk, K.; Mankiewicz, J.; Zalewski, M.; Meriluoto, J. (2005). Elimination of microcystins by water treatment process – examples from Sulejow Reservoir, Poland. *Water Research*, **39**:2394-2406.
49. Keijola, A. M.; Himberg, K.; Esala, A. L.; Sivonen, K.; Hiis-Virta, L. (1988). Removal of cyanobacterial toxins in water treatment processes: Laboratory and pilot-scale experiments. *Toxicity Assessment*, **3**(5):643-656.
50. Krishnamurthy, T.; Carmichael, W. W.; Sarver, E. W. (1986). Toxic peptides from freshwater cyanobacteria (blue-green algae). I. Isolation, purification and characterization of peptides from *Microcystis aeruginosa* and *Anabaena flos-aquae*. *Toxicon.*, **24**(9):865-873.
51. Kusumi, T.; Ooi, T.; Watanabe, M. M.; Takahashi, H.; Kakisawa, H. (1987). Cyanoviridin RR, a toxin from the cyanobacterium (blue-green algae) *Microcystis viridis*. *Tetrahedron Letters*, **28**(40):4695-4698.
52. Lam, A. K. - Y.; Prepas, E. E.; Spink, D.; Hrudey, S. E. (1995). Chemical control of hepatotoxic phytoplankton blooms: implications for human health. *Water Research*, **29**(8):1845-1854.
53. Lambert, T. W.; Holmes, C. F. B.; Hrudey, S. E. (1996). Adsorption of microcystin-LR by activated carbon and removal in full scale water treatment. *Water Research*, **30**(6):1411-1422.
54. Lawton, L. A.; Beattie, K. A.; Hawser, S. P.; Campbell, D. L.; Codd, G. A. (1994) Evaluation of assay methods for the determination of cyanobacterial hepatotoxicity. In: Codd, G. A.; Jefferies, T. M.; Keevil, C. W.; Potter (Eds.). *Detection Methods for Cyanobacterial Toxins*. Special Publication n°. 149, the Royal Society of Chemistry, Cambridge, p. 111-116.
55. Lawton, L. A. & Robertson, P. K. J. (1999) Physico-chemical treatment methods for the removal of microcystins (cyanobacterial hepatotoxins) from potable waters. *Chemical Society Reviews*, **28**:217-224.
56. Libânio, M.; Pereira, M. M.; Vorcaro, B. M.; Reis, R. C.; Heller, L. (1997) Avaliação do emprego de sulfato de alumínio e do cloreto férrico na coagulação de águas naturais de turbidez média e cor elevada. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA SANITÁRIA E AMBIENTAL, 19, 1997, Foz do Iguaçu-PR, Brasil. *Anais...* Foz do Iguaçu-PR, Brasil: ABES. p. 1365-1373.

57. Magalhães, V. F & Azevedo, S. M. F. O. (2004). Interference of iron in microcystins analysis: Considerations on the water treatment for hemodialysis. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON TOXIC CYANOBACTERIA, 6. Bergen, Norway. *Proceedings...* Bergen, Norway.
58. Mendham, J.; Denney, R. C.; Barnes, J. D.; Thomas, M. J. K. (2002). *Vogel: Análise Química Quantitativa*. 6a. edição (traduzido por Afonso, J. C. *et al.*, UFRJ), Rio de Janeiro, LTC-Logman, 462 p.
59. Metcalf, J. S. & Codd, G. A. (2000). Microwave oven and boiling waterbath extraction of hepatotoxins from cyanobacterial cells. *FEMS Microbiology Letters*, **184**(2):241-246.
60. Obinger, C.; Regelsberger, G.; Pircher, A.; Strasser, G.; Peschek, G. A. (1998). Scavenging of superoxide and hydrogen peroxide in blue-green algae (cyanobacteria). *Physiologia Plantarum*, **104**(4):693-698.
61. Pádua, V. L. & Di Bernardo, L. (2000). Método comparativo do tamanho dos flocos formados após coagulação com sulfato de alumínio e cloreto férrico. In: CONGRESSO INTERAMERICANO DE ENGENHARIA SANITÁRIA E AMBIENTAL, 27, 2000, Porto Alegre-RS, Brasil. *Anais...* Porto Alegre-RS, Brasil: ABES/AIDIS.
62. Pendleton, P.; Chumann, R.; Wong, S. H. (2001). Microcystin – LR adsorption by activated carbon. *Journal of Colloid and Interface Science*, **240**(1): 1-8.
63. PROSAB, EDITAL 5, TEMA 1. (2006). Diretrizes extraídas da reunião realizada em Belo Horizonte/MG. Ata da reunião de 13 e 14/07/2006, não publicado. 6 p.
64. Qiao, R-P., Li, N., Qi, X-H., Wang, Q-S., Zhuang, Y-Y. (2005). Degradation of microcystin-RR by UV radiation in the presence of hydrogen peroxide. *Toxicon*, **45**, 745-752.
65. Ramanan, S.; Tang, J.; Velayudhan, A. (2000). Isolation and preparative purification of microcystins variants. *Journal of Chromatography*, **883**:103-112.
66. Reisner, M.; Carmeli, S.; Werman, M.; Sukenik, A. (2004). The cyanobacterial toxin cylindrospermopsin inhibits pyrimidine nucleotide synthesis and alter cholesterol distribution in mice. *Toxicological Sciences*, **82**: 620-627.
67. Resende, M. L. V.; Salgado, S. M. L.; Chaves, Z. M. (2003). Espécies ativas de oxigênio na resposta de defesa de plantas a patógenos. *Fitopatologia Brasileira*, **28**(2):123-130.
68. Rinehart, K. L.; Namikoshi, M.; Choi, B. W. (1994). Structure and biosynthesis of toxins from blue-green algae (cyanobacteria). *Journal of Applied Phycology*, **6**(2):159-176.

69. Robertson, P. K. J.; Lawton, L. A.; Cornish, B. J. P. A. (1999). The involvement of phycocyanin pigment in the photodecomposition of the cyanobacterial toxin, microcystin-LR. *Journal of Porphyrins and Phthalocyanines*, **3**(6):544-551.
70. Robertson, P. K. J.; Liu, I.; Lawton, L. A.; Bahnemann, D. (2005) The Photocatalytic Decomposition of microcystin-LR on selected Titanium Dioxide Materials. In the *Proceedings of Novel Surfaces - New Catalytic Chemistry*.
71. Rositano, J. (1996). The destruction of cyanobacterial peptide toxins by oxidants used in water treatment. *Report 110*, Urban water research association of Australia.
72. Sant'Anna, C. L.; Azevedo, M. T. P.; Senna, P. A. C.; Komárek, J.; Komárková, J. (2004). Planktic Cyanobacteria from São Paulo State, Brazil: Chroococcales. *J. Revista Brasileira de Botânica*, **27**(2):213-227.
73. Sant'Anna, C. L.; Azevedo, M. T. P.; Werner, V. R.; Dogo, C. R.; Rios, F. R.; de Carvalho, L. R. (2008). Review of toxic species of cyanobacteria in Brazil. *Algological Studies*, **126**:251-265.
74. Schreiber, U. & Neubauer, C. (1990). O<sub>2</sub>-dependent electron flow, membrane energization and the mechanism of non-photochemical quenching of chlorophyll fluorescence. *Photosynthesis Research*, **25**(3):279-293.
75. Schumann, R.; Wong, S. H.; Pendleton, P.; Mulcahy, D.; Levay, G. (1997). Activated carbon properties controlling removal of blue-green algae hepatotoxins from water. In: FEDERAL CONVENTION OF AUSTRALIAN WATER AND WASTE WATER ASSOCIATION, 17., 1997, Sydney. *Proceedings...* Sydney: AWWWA. v. 2, p. 574-581.
76. Sivonen, K. (1990). Effects of light, temperature, nitrate, orthophosphate, and bacteria on growth of and hepatotoxin production by *Oscillatoria agardhii* strains. *Applied and Environmental Microbiology*, **56**(9):2658-2666.
77. Sivonen, K. (1996). Cyanobacterial toxins and toxin production. *Phycologia*, **35**(Supplement 6):12-14.
78. Song, W.; de la Cruz, A. A.; Rein, K.; O'Shea, K. E. (2006). Ultrasonically induced degradation of microcystin RR: Identification of products, effect of pH, formation and destruction of peroxides. *Environ. Sci. Technol.*, **40**(12):3941-3946.
79. Song, W.; Bardowell, S. & O'Shea, K. E. (2007). Mechanism study and the influence of oxygen on the photosensitized transformations of microcystins (cyanotoxins). *Environ. Sci. Technol.*, **41**(15):5336-5341.
80. Spoo, L., Vesterkvist, P., Lindholm, T., Meriluoto, J. (2003). Screening for cyanobacterial hepatotoxins, microcystins and nodularin in environmental water samples by reverse-phase liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry. *Journal of chromatography, A* **10200**:105-119.

81. Statistica 6,1 Statsoft, Inc., Tulsa, USA, 2003.
82. Stotts, R. R.; Namikoshi, M.; Haschek, W. M.; Rinehart, K. L.; Carmichael, W. W.; Dahlem, A. M.; Beasley, V. R. (1993). Structural modifications imparting reduced toxicity in microcystins from *Microcystis* spp. *Toxicon*, **31**(6):783-789.
83. Takenaka, S. (1993). Covalent glutathione to cyanobacterial hepatotoxin microcystin LR by F344 rat cytosolic and microsomal glutathione S-transferases. *Environ. Tox. Pharmacol.* **9**: 135-139.
84. Teixeira, M. G. L. C.; Costa, M. C. N.; Carvalho, V. L. P.; Pereira, M. D. S.; Hage, E. (1993). Epidemia de gastroenterite na área da barragem de Itaparica, Bahia. *Boletín de la Oficina Sanitaria Panamericana*, **114**(6):502-512.
85. Thompson, K. M.; Griffith, W. P.; Spiro, M. (1993). Mechanism of bleaching by peroxides. Part 1: Kinetics of bleaching of phenolphthalein by hydrogen peroxide at high pH. *Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions*, **89**(8):1203-1209.
86. Tsen, K-T.; Tsen, S-W, D.; Kiang, J. G. (2006) Lycopene is more potent than beta carotene in the neutralization of singlet oxygen: role of energy transfer probed by ultrafast Raman spectroscopy. *J. Biomed. Opt.*, **11**: 064025.
87. Tsuji, K.; Naito, S.; Kondo, F.; Ischikawa, N.; Watanabe, M. F.; Suzuki, M.; Harada, K.-I. (1994). Stability of microcystins from cyanobacteria: Effect of light on decomposition and isomerization. *Environ. Sci. Technol.*, **28**:173-177.
88. Tsuji, K.; Watanuki, T.; Kondo, F.; Watanabe, M. F.; Suzuki, S.; Nakazawa, H.; Suzuki, M.; Uchida, J.; Harada, K.-I. (1995). Stability of microcystins from cyanobacteria. II: Effect of UV light on decomposition and isomerization. *Toxicon.*, **33**(12):1619-1631.
89. Tsuyoshi, M.; Kato, H.; Imanishi, S.; Kawasaki, Y.; Hasegawa, M.; Harada, K.-I. (2006). Structural characterization of microcystins by LC/MS/MS under trap conditions. *Journal of Antibiotics*, **59**(11): 710-719.
90. Utikilen, H. & Gjørlme, N. (1992). Toxin production by *Microcystis aeruginosa* as a function of light in continuous cultures and its ecological significance. *Appl. Environ. Microbiol.*, **58**: 1321:1325.
91. Vermaas, W. F. J.; Timlin, J. A.; Jones, H. D. T.; Nieman, M. L. T.; Hamad, S. W.; Melgaard, D. K.; Haaland, D. M. (2008). *In vivo* hyperspectral confocal fluorescence imaging to determine pigment localization and distribution in cyanobacterial cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **105**(10): 4050-4055.
92. Wagner, E. G. & Hudson Jr., H. E. (1982). Low-dosage high-rate direct filtration. *Journal American Water Works Association*, **74**(5):256-261.

93. Welker, M. & Steinberg, C. (1999). Indirect photolysis of cyanotoxins: one possible mechanism for their low persistence. *Water Research*, **33**(5):1159-1164.
94. Welker, M. & Steinberg, C. (2000). Rates of humic substance photosensitized degradation of microcystin LR in natural waters. *Environ. Sci. Technol.*, **34**(16): 3415–3419.
95. Wilson, A. E.; Wilson, W. A.; Hay, M. E. (2006). Intraspecific variation in growth and morphology of the bloom-forming cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. *Applied and Environmental Microbiology*, **72**(11): 7386-7389.
96. Yuan, M.; Namikoshi, M.; Otsuki, A.; Rinehart, K. L.; Sivonen, K.; Watanabe, M. F. (1999). Low-energy collisionally activated decomposition and structural characterization of cyclic heptapeptide microcystins by electrospray ionization mass spectrometry. *Journal of mass spectrometry*, **34**:33-43.
97. Zepp, R. G.; Faust, B. C.; Hoigné, J. (1992). Hydroxyl radical formation in aqueous reactions (pH 3-8) of iron (II) with hydrogen peroxide: the photo-fenton reaction. *Environmental Science and Technology*, **26**:313–319.
98. Zweigenbaum, J. A.; Henon, J. D.; Beattie, K. A.; Codd, G. A.; Poon, G. K. (2000) Direct analysis of microcystins by microbore liquid chromatography electrospray ionization ion-trap tandem mass spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and biomedical analysis*, **23**:723-733.